



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIA HUMANAS E NATURAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

NELSON SALGADO TAVARES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOQUÍMICA DA
ADAPTAÇÃO DE UMA VARIEDADE COMERCIAL DE TOMATE
(*Solanum lycopersicum* L.) AO SISTEMA DE PRODUÇÃO DA
AGRICULTURA NATURAL**

VITÓRIA-ES
2017

NELSON SALGADO TAVARES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOQUÍMICA DA
ADAPTAÇÃO DE UMA VARIEDADE COMERCIAL DE TOMATE
(*Solanum lycopersicum* L.) AO SISTEMA DE PRODUÇÃO DA
AGRICULTURA NATURAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. José Aires Ventura

Coorientador: Prof. Dr. Vagner Augusto Benedito

VITÓRIA-ES
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

T213c Tavares, Nelson Salgado, 1959-
Caracterização molecular e bioquímica da adaptação de uma
variedade comercial de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) ao sistema de
produção da agricultura natural / Nelson Salgado Tavares -2017.
161 f.: il.

Orientador: José Aires Ventura.

Coorientador: Vagner Augusto Benedito.

Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Agricultura natural. 2. Tomate 3. Agricultura orgânica. 4.
Biologia molecular. 5. Fenóis. I. Ventura, José Aires, 1954-. II.
Benedito, Vagner Augusto. III. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV.
Título.

CDU: 57

Nelson Salgado Tavares

“Caracterização molecular e bioquímica da adaptação de uma variedade comercial de tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) ao sistema de produção da agricultura natural”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Biologia Vegetal.

Aprovada em 26 de maio de 2017.

Comissão Examinadora:



Dr. José Aires Ventura (UFES)
Orientador e Presidente da Comissão



Dra. Maria do Carmo Batitucci (UFES)
Examinadora interna



Dr. Hildegardo Seibert França (UFES)
Examinador interno



Dr. Helcio Costa (INCAPER)
Examinador externo



Dr. João Batista Silva Araújo (INCAPER)
Examinador externo

Ao Rafael Ribeiro Tavares eu dedico

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço

A Deus e Meishu-sama

Ao apoio incondicional de minha esposa Tereza

À torcida de meus filhos Daricque e Hugo por bons resultados

Às orações de meus pais pelo sucesso dos resultados deste trabalho

Ao Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária - INCRA

À Universidade Federal do Espírito Santo-UFES

Ao Programa de Pós-graduação de Biologia Vegetal-PPGBV

Ao Instituto Federal do Espírito Santo-IFES Campus Vila Velha.

Ao Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Metodologias para Caracterização de Óleos Pesados-UFES/LabPetro

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES que subsidiou a bolsa de pesquisa e projeto de pesquisa e pelo financiamento de minha estadia nos EUA para o doutorado sanduíche na West Virginia University – WVU

À West Virginia University pela hospitalidade e acolhimento.

Ao meu orientador Dr. José Aires Ventura pelos ensinamentos e confiança depositada em mim e no meu trabalho

Ao meu coorientador Dr. Vagner Augusto Benedito por ter me recebido tão bem na West Virginia University e pelo afeto com que recebeu a mim e a minha esposa no seio de sua linda família

Aos amigos Lucas Gontijo Silva Maia e Adolfo Luís dos Santos pela amizade e por terem sido minhas mãos e meus olhos no Laboratório de Genética Molecular da West Virginia University.

Ao casal amigo Rita e Elson por terem me cedido o sítio Alice para condução de meus experimentos com tomates.

Aos Dr. James Kotcon, Dr. Sven Verlinden, Dr^a. Tiffany Fess e Marvin Clark por terem cooperado com meu experimento na Fazenda de Agricultura Orgânica da West Virginia University - WVUOAF

Ao Dr. Ben Dawson-Andoh e ao Dr. Emmanuel-Atta-Obeng por terem me orientado nos trabalhos feitos no laboratório da Divisão de Floresta e Recursos Naturais da West Virginia University

À Sue Myers e à Gail Sikorsky pela solicitude com que me atenderam na Casa de Vegetação do Campus Evansdale da West Virginia University.

“Vem por aqui” - dizem-me alguns com os olhos doces
Estendendo-me os braços, e seguros
De que seria bom que eu os ouvisse
Quando me dizem: "vem por aqui!"
Eu olho-os com olhos lassos,
E cruzo os braços,
E nunca vou por ali...

Não, eu não vou por aí! Só vou por onde
Me levam meus próprios passos...
Se ao que busco saber nenhum de vós responde
Por que me repetis: "vem, vem por aqui!"?

Corre, nas vossas veias, sangue velho dos avós,
E vós amais o que é fácil!
Eu amo o Longe e a Miragem,
Amo os abismos, as torrentes, os desertos...

Ide! Tendes estradas,
Tendes tratados, tendes filósofos, tendes sábios...
Eu tenho a minha loucura !
Levanto-a, como um facho, a arder na noite escura,

Ah, que ninguém me dê piedosas intenções,
Ninguém me peça definições!
Ninguém me diga: "vem por aqui!"
A minha vida é um vendaval que se soltou,
É uma onda que se alevantou,
É um átomo a mais que se animou...
Não sei por onde vou,
Não sei para onde vou
Sei que não vou por aí!

RESUMO

Avaliou-se a adaptação e produção de tomateiros cultivados sem e com adubos orgânicos em plantios da variedade comercial ‘Especial para Salada’ cujas sementes foram produzidas pela Topseed® (T0) e selecionadas com as técnicas da agricultura natural em 15 plantios consecutivos (T15). Foram feitas comparações entre T15 e T0 nos sistemas de plantio da agricultura natural sem adubo (NF) e da agricultura orgânica com adubo orgânico (OF) e sem o uso de defensivos, ambos não irrigados. Os cultivos foram realizados na Fazenda de Agricultura Orgânica da West Virginia University-WVUOAF (EUA), divididos em dois tratamentos, não adubados (NF-T15, NF-T0) e dois adubados com composto orgânico (OF-T0 e OF-T15), no delineamento experimental de blocos casualizados, com cinco repetições e cinco plantas por repetição, determinou-se a produção e as características moleculares das plantas. Para os estudos bioquímicos foi feito um plantio com os mesmos tratamentos no município de Marechal Floriano-ES. As plantas não adubadas NF-T15 e NF-T0 apresentaram as melhores produtividades com as menores perdas de frutos lesionados por doenças e pragas. Os tomateiros NF-T15 apresentaram defesas mais eficientes apesar de terem os menores teores de lignina, 6%, nos frutos e menos flavonoides nas folhas. Os tomateiros adubados OF-T0 e OF-T15 tiveram mais lignina nos frutos e mais flavonoides nas folhas, porém tiveram as maiores perdas na produção. Os resultados da atividade dos genes avaliados em T15 e T0 cultivados sem nitrato mostram que os tomateiros T0 tiveram os mesmos níveis de expressão que as plantas T15, em cinco dos seis genes estudados nas raízes, revelando que T0 se adaptou à ausência do nitrogênio inorgânico na adubação. Independente do meio com ou sem nitrato, a atividade do gene NRT1 nas folhas foi a maior em T0 e a menor em T15. Esse resultado pode ser relacionado à suscetibilidade das plantas adubadas e as defesas das não adubadas. Os tomateiros NF-T15 produziram 29 t/ha e NF-T0 nas mesmas condições produziu 38 t/ha. Os resultados mostraram que T0 obteve rápida adaptação nesse primeiro cultivo sem adubos e que T15 cultivada há muitos anos sem adubos apresentou resistência mais eficiente nos tomateiros não adubados. O adubo orgânico contribuiu para a menor atividade dos genes associados à defesa nas plantas adubadas, por este motivo a adubação foi prejudicial à produtividade dos tomateiros cultivados no sistema de plantio orgânico.

Palavras-chave: Agricultura Natural · tomate · agricultura orgânica · biologia molecular · fenóis

ABSTRACT

This study addressed the adaptation and production of tomato plants grown with and without organic fertilizers in crops of the commercial variety “Especial para Salada”, whose seeds were produced by Topseed® (T0) and selected using the techniques of nature farming in 15 consecutive plantings (T15). Comparisons were made between T15 and T0 in the non-irrigated planting systems nature farming without fertilizer (NF) and organic agriculture with organic fertilizer (OF) and without the use of pesticides. Cultivation was carried out at West Virginia University Organic Agriculture Farm - WVUOAF (USA) divided into two treatments: non-fertilized (NF-T15, NF-T0); and two fertilized with organic compost (OF-T0 and OF-T15). In the experimental design of randomized blocks with five replicates and five plants per replicate, the production and the molecular characteristics of the plants were determined. For the biochemical studies, planting with the same treatments was performed in the municipality of Marechal Floriano, ES, Brazil. The non-fertilized plants NF-T15 and NF-T0 showed the best yields with the lowest losses of fruits damaged by diseases and pests. The NF-T15 tomato plants showed more efficient defenses despite having the lowest lignin contents (6%) in the fruits, and fewer flavonoids in the leaves. The fertilized tomato plants OF-T0 and OF-T15 had more lignin in the fruits and more flavonoids in the leaves, but they had the highest yield losses. The results of gene activity of T15 and T0 grown without nitrate showed that T0 tomatoes had the same levels of expression as the T15 plants in five of the six genes studied in the roots, which shows that T0 adapted to the absence of inorganic nitrogen. Regardless of the medium with or without nitrate, the NRT1 gene activities in the leaves were the highest in T0 and the lowest in T15. This result can be related to the susceptibility of the fertilized plants and the defenses of the non-fertilized plants. The NF-T15 tomatoes produced 29 t/ha, and the NF-T0 under the same conditions yielded 38 t/ha. The results showed that T0 achieved fast adaptation in this first crop without fertilizers and that T15 cultivated for many years without fertilizers showed more efficient resistance in the non-fertilized tomato plants. The organic fertilizer contributed to lower gene activity associated to the defense in the fertilized plants. For this reason, fertilization was harmful to the productivity of tomato plants grown in the organic planting system.

Keywords: Nature farming · tomato · organic agriculture · molecular biology · phenols

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Caracterização externa e interna do fruto do tomateiro	24
Figura 2	Campo experimental na Fazenda de Agricultura Orgânica da West Virginia University – WVUOAF	62
Figura 3	Parcela experimental da agricultura natural, bandeiras azuis representam tomateiros T15, bandeiras laranjas indicam tomateiros T0 e plantas sem bandeiras são as bordaduras	65
Figura 4	Escala de maturação de tomates. Da esquerda para direita: Verde maduro, Pintado, Rosado, Vermelho, Vermelho maduro e Vermelho passado (FERREIRA, 2004)	66
Figura 5	Produtividade, frutos comercializáveis por hectare dos quatro tratamentos	68
Figura 6	Produtividade total no topo da coluna, frutos comercializáveis somados aos frutos descartados por lesões nos quatro tratamentos	70
Figura 7	Produtividade total dos sistemas de produção da agricultura natural (NF) e da agricultura orgânica (OF)	70
Figura 8	Frutos lesionados do cultivo orgânico	72
Figura 9	Perdas de frutos por lesões causadas por pragas ou doenças nos quatro tratamentos	73
Figura 10	Perdas de frutos por lesões causadas por pragas ou doenças na agricultura natural (NF) e na agricultura orgânica (OF)	73
Figura 11	Tomates nos estágios verde maduro, pintado e rosado, cinco dias após a colheita	74
Figura 12	Tomates nos estágios vermelho, vermelho maduro e vermelho passado, vinte e seis dias após a colheita.	74
Figura 13	Tempo de prateleira dos frutos entre os estágios pintado e vermelho maduro (Figura 4) dos dois sistemas de produção, agricultura natural (NF) e agricultura orgânica (OF)	75
Figura 14	Perda de peso dos frutos dos quatro tratamentos	75

Figura 15	Teores de lignina dos frutos	78
Figura 16	Matéria seca dos frutos dos quatro tratamentos	80
Figura 17	Plântulas de tomateiros T15 (superior) e T0 (inferior) produzidas em areia e água pura (A) e T15 (superior) e T0 (inferior) produzidas em areia e água pura com 500 μ M de KNO ₃ (B)	90
Figura 18	Confirmação da extração de RNA das 3 repetições das raízes das amostras adubadas com nitrato T15-KNO ₃ e T0-KNO ₃ e das não adubadas T15-H ₂ O e T0-H ₂ O	94
Figura 19	Confirmação da extração do RNA das 3 repetições das folhas de amostras adubadas com nitrato T15-KNO ₃ e T0-KNO ₃ e das não adubadas T15-H ₂ O e T0-H ₂ O	94
Figura 20	Expressão do gene PAL em raízes (A) e folhas (B) do tomate ‘Especial para Salada’	97
Figura 21	Expressão do gene AAP2 em raízes (A) e folhas (B) de tomate ‘Especial para Salada’	99
Figura 22	Expressão do gene LHT1 em raízes (A) e folhas (B) de tomate ‘Especial para Salada’	102
Figura 23	Expressão do gene NRT1 em raízes (A) e em folhas (B) de tomate ‘Especial para Salada’	107
Figura 24	Expressão do gene NRT2 em raízes (A) e em folhas (B) de tomate ‘Especial para Salada’	108
Figura 25	Expressão do gene NR em raízes (A) e em folhas (B) de tomate ‘Especial para Salada’	110
Figura 26	Placa de CCD com as frações: 1 -Sobrenadante NF-T15; 2 -Precipitado NF-T15; 3 - Precipitado NF-T15 + H ₂ O; 4 -Sobrenadante NF-T0; 5 -Precipitado NF-T0; 6 -Sobrenadante OF-T0; 7 -Precipitado OF-T0; 8 -Sobrenadante OF-T15; 9 -Nulo; 10 -Extrato bruto NF-T15; 11 -Extrato bruto NF-T0; 12 -Extrato bruto OF-T0 e 13 -Extrato bruto OF-T15	124
Figura 27	CCD dos extratos etanólicos de folhas de tomateiro nos tratamentos 1 -NF-T15, 2 -NF-T0, 3 -OF-T0, 4 -OF-15 e 5 -sólido purificado	124
Figura 28	Espectro de RMN ¹ H da rutina isolada das folhas de tomateiro	125

Figura 29	Amplificação da parte aglicona do flavonol	126
Figura 30	Ampliação do carbono anomérico da porção glicopiranosídeo ligada ao flavonol, assim como a porção rhamnosídeo ligada ao glicopiranosídeo	126
Figura 31	Ampliação mostrando os grupos metilenos e o grupamento metila da porção rhamnosídeo	127
Figura 32	Amostras de EBEs (10 mg/mL). 1 -NF-T15, 2 -NF-T0, 3 -OF-T0, 4 -OF-T0, 5 -Miricetina-3-O-beta-arabinosídeo, 6 -Quercetina, 7 -Kaempferol, 8 -Ácido Clorogênico, 9 -Quercitrina, 10 -Miricetina, 11 -Hiperosídeo e 12 -Rutina	128
Figura 33	Folhas dos tomateiros da variedade comercial ‘Especial para Salada’ sob raios UV. Na sequência da esquerda para direita têm-se os tratamentos NF-T15, NF-T0, OF-T0 e OF-15	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção Mundial e Brasileira no período de 2010 a 2014	21
Tabela 2	Diferenças entre os sistemas de cultivo natural, orgânico e convencional.	28
Tabela 3	Cultivo de 1 hectare de tomate no estado do Espírito Santo.	50
Tabela 4	Insumos utilizados pelos sistemas de cultivo convencional, orgânico e natural.	51
Tabela 5	Análises dos solos do sistema de cultivo da agricultura natural	61
Tabela 6	Análises dos solos do sistema de cultivo da agricultura orgânica, ou seja, solos do talhão <i>low input</i> após a aplicação de 22,42 t/ha de adubo orgânico da WVUAOF.	61
Tabela 7	Análises química do composto orgânico usado na WVUAOF	62
Tabela 8	Primers usados na genotipagem de tomateiros	89
Tabela 9	Sequência dos primers para análise de qRT-PCR.	94

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 O TOMATEIRO (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	20
2.1.1 No Brasil e no mundo.....	20
2.2 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS E FENOTÍPICAS DO TOMATEIRO.....	23
2.3 CULTIVO E MANEJO.....	26
2.3.1 Agricultura natural.....	28
2.3.1.1 Baixos aportes na agricultura natural.....	31
2.3.1.2 Variedades localmente adaptadas pela agricultura natural.....	32
2.3.1.3 Repetição de cultura.....	33
2.3.1.4 Benefícios do cultivo mínimo do solo na agricultura natural.....	37
2.3.1.4.1 Retenção do carbono no solo.....	37
2.3.1.4.2 Criação e manutenção da estrutura do solo.....	38
2.3.1.4.3 Controle de ervas invasoras.....	39
2.3.1.5 Água para as plantas na agricultura natural.....	40
2.3.1.6 Nutrientes do solo <i>versus</i> nutrientes dos adubos.....	40
2.3.1.7 Compostos fenólicos como proteção das plantas.....	48
2.3.1.8 Qualidade nutricional.....	49
2.3.1.9 Custos energéticos da agricultura natural <i>versus</i> os sistemas de produção orgânica e convencional.....	50
2.3.2 Agriculturas adubadas.....	51
2.3.2.1 Agricultura orgânica.....	52
2.3.2.2 Agricultura convencional.....	53
3 OBJETIVOS.....	56
3.1 OBJETIVO GERAL.....	56
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56
4 CAPÍTULO 1. PRODUTIVIDADE DOS TOMATEIROS ‘ESPECIAL PARA SALADA’ CULTIVADOS NOS SISTEMAS DE PRODUÇÃO DAS AGRICULTURAS NATURAL E ORGÂNICA.....	57
RESUMO.....	57
4.1 INTRODUÇÃO.....	58

4.2 OBJETIVOS.....	58
4.2.1 Objetivo geral.....	58
4.2.2 Objetivos específicos.....	59
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
4.3.1 Origem da variedade ‘Especial para SaladaT15’ ou variedade ‘Terezas’ (2004-2015).....	59
4.3.2 Seleção das variedades.....	59
4.3.3 Cultivos nos sistemas de agriculturas natural e orgânica na WVUOAF.....	60
4.3.3.1 Solos.....	60
4.3.3.2 Distribuição espacial das parcelas experimentais.....	62
4.3.3.3 Agricultura natural.....	63
4.3.3.4 Agricultura orgânica.....	64
4.3.3.5 Produtividade.....	64
4.3.3.6 Produção de sementes para o próximo cultivo.....	65
4.3.4 Tempo de prateleira e perda de peso dos frutos.....	65
4.3.5 Massa seca e teores de lignina nos frutos e nas folhas.....	66
4.3.6 Análises estatísticas.....	67
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4.4.1 Produtividade e produtividade total.....	68
4.4.2. Perdas.....	71
4.4.3 Tempo de prateleira e perda de peso dos frutos.....	74
4.4.4 Teores de lignina nas folhas e nos frutos.....	76
4.4.5 Matéria seca dos frutos e das folhas.....	80
4.5 CONCLUSÕES.....	81
4.6 REFERÊNCIAS.....	82
5 CAPÍTULO 2. DIFERENÇAS MOLECULARES ENTRE RAÍZES E FOLHAS DOS TOMATEIROS ‘ESPECIAL PARA SALADA’ T15 E T0 COM E SEM FERTILIZAÇÃO DE NITRATO.....	85
RESUMO.....	85
5.1 INTRODUÇÃO.....	86
5.2 OBJETIVOS.....	87
5.2.1 Objetivo geral.....	87
5.2.2 Objetivo específico.....	87
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	88

5.3.1 Genotipagem dos tomateiros T15 e T0.....	88
5.3.2 Estudos da expressão dos genes PAL, AAP2, LHT1, NRT1, NRT2 e NR em raízes e folhas dos tomateiros T15 e T0.....	89
5.3.2.1 Produção das amostras.....	89
5.3.2.2 Extração do material genético.....	90
5.3.2.3 Desenho dos primers.....	94
5.3.2.4 Análises quantitativas da expressão dos genes em qRT-PCR.....	95
5.3.2.5 Análises estatísticas.....	95
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
5.4.1 Genotipagem de tomateiros.....	96
5.4.2 Estudos da atividade dos genes PAL, AAP2, LHT1, NRT1, NRT2 e NR em raízes e folhas dos tomateiros T15 e T0.....	96
5.4.2.1 Gene PAL – Fenilalanina amônia-liase.....	96
5.4.2.2 Gene AAP2 – Permease de Aminoácidos 2.....	98
5.4.2.3 Gene LHT1 – Transportador de Lisina e Histidina 1.....	101
5.4.2.4 Genes NRT1 e NRT2 – Transportadores de Nitrato 1 e 2.....	102
5.4.2.5 Gene NRT2 – Transportador de Nitrato 2.....	107
5.4.2.6 Gene NR – Redutase do Nitrato.....	109
5.4.2.7 Interatividade dos genes PAL, AAP2, LHT1, NRT1, NRT2 e NR.....	110
5.5 CONCLUSÕES.....	112
5.6 REFERÊNCIAS.....	114
6 CAPÍTULO 3. COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NAS FOLHAS DE TOMATEIROS ‘ESPECIAL PARA SALADA’ SELECIONADOS PELA TOPSEED® E PELA AGRICULTURA NATURAL.....	118
RESUMO.....	118
6.1 INTRODUÇÃO.....	119
6.2 OBJETIVOS.....	121
6.2.1 Objetivo geral.....	121
6.2.2 Objetivos específicos.....	121
6.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	121
6.3.1 Cultivos dos tomateiros T15 e T0 sob as condições de manejo da agricultura natural e da agricultura orgânica em Marechal Floriano-ES.....	121
6.3.2 Material vegetal.....	122
6.3.3 Preparação dos extratos.....	122

6.3.4 Ensaio fitoquímico.....	122
6.3.5 Espectro de ressonância magnética nuclear-RMN ¹ H.....	123
6.3.6 Exposição das folhas aos raios ultravioletas.....	123
6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	123
6.4.1 Cromatografia em camada delgada-CCD.....	123
6.4.2 Análise de RMN ¹ H para o precipitado.....	124
6.4.3 Respostas fitoquímicas dos tomateiros T15 e T0 cultivados nos sistemas de cultivos das agriculturas natural e orgânica.....	128
6.4.4 Exposição das folhas aos raios ultravioletas.....	129
6.5 CONCLUSÕES.....	132
6.6 REFERÊNCIAS.....	133
7 CONCLUSÕES FINAIS.....	136
8 REFERÊNCIAS.....	138
APÊNDICES.....	154
APÊNDICE A.....	155
APÊNDICE B.....	156
APÊNDICE C.....	157
APÊNDICE D.....	158

1 INTRODUÇÃO

Uma floresta que se mantém exuberante sem ser adubada. Os tomateiros saudáveis, resistentes e produtivos que são encontrados nos ambientes naturais dos Andes, seu centro de origem. Um cultivo de tomates em que as pulverizações de potentes agrotóxicos são quase diárias e adubações químicas quinzenais. Avaliando-se os dois primeiros cenários percebe-se que há algo errado no cultivo de tomateiros adubados. A diferença principal entre a floresta, o centro de origem dos tomateiros e um cultivo de tomates adubado é o próprio adubo, é o tipo de nutriente fornecido a essas plantas que as deixaram saudáveis ou tão frágeis ao ponto das chuvas se tornarem uma ameaça para os plantadores de tomateiros fartamente adubados. Mokiti Okada (1987) ensina que as plantas na Natureza se alimentam dos nutrientes do solo e que por isso se mantêm saudáveis e produtivas e que o contrário ocorre com as plantas adubadas que passam a se nutrir com os nutrientes dos adubos, e assim, com a simplicidade que lhe é peculiar, Mokiti Okada (1987) nos informa que a causa do aparecimento de pragas e doenças, em qualquer lavoura, é o adubo convencional ou o orgânico.

Mokiti Okada (1882-1955), um pensador japonês, preconizou a Agricultura Natural em 1930. Este ensinamento, por sua simplicidade, encontra dificuldade até os nossos dias para ser reconhecido e implementado como um método agrícola eficiente e de baixo custo. A relutância em reconhecer seu valor se dá quando Okada afirma que o solo puro, livre de adubos e agrotóxicos, tem tudo o que a planta precisa para produzir com abundância, deixando claro que os fertilizantes alóctones são desnecessários por serem, na verdade, prejudiciais às plantas e aos homens que as consomem. A humanidade vem usando há 8.000 anos adubos orgânicos (MAZOYER; ROUDART, 2010) para fazer as plantas crescerem rapidamente em direção ao sol e aos olhos do agricultor. Os métodos da agricultura natural reproduzem com exatidão o que ocorre na Natureza e por isto as sementes lançadas aos solos sem adubos, nas sementeiras ou diretamente no campo, produzem primeiramente mais raízes que galhos e folhas, dando a sensação que a agricultura natural não é um bom método, pois o agricultor logo após à germinação de sua cultura não vê a parte aérea da planta crescer com rapidez. Plantas em solos sem adubos, com apenas os teores autóctones de nutrientes, investem mais recursos em seus sistemas radiculares, enquanto plantas em solos adubados investem mais recursos na parte aérea (CHAPIN III; MATSON; MOONEY, 2002; CHAPIN III; MATSON; VITOUSEK, 2011; GROSSMAN; RICE, 2012; SCHEIBLE et al., 1997a; SCHEIBLE et al., 1997b) e isto vem dando ao agricultor a certeza de que adubar é o correto.

As raízes, em solos não adubados da agricultura natural, primeiramente vão em direção às profundezas do solo e simultaneamente têm um menor crescimento de folhas e galhos. Para o agricultor este padrão de desenvolvimento não é bom, pois lhe dá a impressão de que as plantas não estão crescendo e, portanto, este método não é útil para o sustento do homem do campo e da cidade. Ver o rápido crescimento das plantas adubadas e sem pragas e doenças por estarem protegidas pelos agrotóxicos tranquiliza qualquer agricultor.

A agricultura natural é um sistema de produção agrícola em que cada atividade executada e cada decisão tomada estão revestidas de função e missão que beneficiam o todo e melhoram a qualidade e quantidade da produção final. Trata-se de um sistema em que se tem a real noção do malefício dos adubos usados pelos agricultores até nossos dias. Para a agricultura natural não existe a hipótese de se testar a eficiência dos adubos, pois os manejos adotados por este método os tornam dispensáveis e inúteis diante dos procedimentos que visam fazer a interação solo-planta-microrganismo trabalharem a favor do agricultor, e não contra, como ocorre nas agriculturas adubadas. Para que o agricultor se beneficie das interações solo-planta-microrganismo, que ocorrem há milhões de anos sobre a Terra, a agricultura natural aplica, sistematicamente, nos campos agrícolas a metodologia que compreende o cultivo com baixos aportes, a criação de cultivares localmente adaptados, a repetição de cultura, o cultivo mínimo do solo, pouca ou nenhuma irrigação e, por fim, uma produção agrícola feita com os nutrientes do solo e nunca com os nutrientes dos adubos. Estes manejos culturais apresentam resultados promissores ao serem usados simultaneamente nos campos da agricultura natural.

Eliminar os adubos usados por todas as gerações de pais, avós e bisavós do dia a dia dos agricultores atuais é difícil. A condição de obediência às hierarquias vem nos mantendo civilizados até hoje, mas ao mesmo tempo não nos deixa avançar em certos aspectos evolutivos negados por quem mantém as regras. A negação do novo é apenas uma questão de segurança para o grupo, não se trata de uma maldade. Para os produtores a agricultura sem adubos é possível logo após a derrubada de uma mata e por apenas três ou quatro anos. Passados os poucos anos de fertilidade criada pelo ciclo da matéria orgânica da floresta derrubada, os conhecimentos tradicionais passados de pai para filhos no meio rural são todos alicerçados na adubação orgânica ou convencional. O novo seria saber como produzir sem adubos o que desde a criação da agricultura é considerado muito difícil, quase impossível pelo senso comum. A convivência dos agricultores com os adubos e agrotóxicos para produzir alimentos tem que ser profundamente respeitada, pois fora repassada pelos antepassados de nossos agricultores como algo bom, sem nenhuma maldade, para manter a segurança alimentar até os nossos dias.

Este trabalho tem como objetivos investigar se a adubação é a causa da diminuição da produtividade devido às perdas ocasionadas por pragas e doenças, e também se a partir das variedades cultivadas comercialmente, excetuando-se os híbridos e transgênicos, a agricultura natural pode criar cultivares produtivos e adaptados aos solos com estrutura granular bem desenvolvida e livres de fertilizantes alóctones.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L.)

2.1.1 No Brasil e no mundo

O tomate foi cultivado e consumido no México muito antes da chegada dos espanhóis ao continente americano. A sua introdução e difusão na Europa foi acompanhada por uma domesticação que desenvolveu tipos diferentes associados com usos e sistemas de produção novos. Como resultado, um aumento no rendimento e na qualidade dos frutos ocorreu durante este período. Mais recentemente, a exploração da heterose e o desenvolvimento de cultivares adaptadas ao processamento e a exploração da variabilidade extraespecífica, especialmente da relacionada à resistência ao estresse biótico e abiótico, têm atualmente dado origem ao desenvolvimento de variedades de mesa originadas dos tipos *Beefsteak*, *American Bush Beefsteak*, *Marmande*, *Vemone*, Francês. *MoneyMaker*, *Cocktail* e *Cereja*. O tomate passou de uma aceitação incerta na sua chegada à Europa para a ocupação do primeiro lugar no mundo entre as culturas olerícolas no presente (PROHENS; NUEZ, 2008).

A família Solanaceae inclui várias espécies de importância agrônômica, como o tomate que é o produto olerícola de maior difusão de uso no mundo para consumo fresco ou processado, juntamente com a batata, a cebola e o alho (CAMARGO; CAMARGO FILHO, 2008). De acordo com os dados divulgados pela FAOSTAT (2016), os maiores produtores mundiais de tomate são: China, Índia, Estados Unidos, Turquia, Egito, Irã, Itália, Espanha, Brasil e México, respectivamente. Estes países produzem 76,40% da produção mundial de tomate. O Brasil se destaca como o nono maior produtor de tomate no mundo.

A produção de tomate aumentou nos últimos anos. Segundo a FAOSTAT (2016), em 1990, a produção mundial era de 76,33 milhões de toneladas, em 2014, alcançou-se uma produção de 171 milhões de toneladas numa área cultivada de aproximadamente 5 milhões de hectares, uma expansão de 124% nos últimos 25 anos. O aumento da produção foi seguido pelo aumento do consumo. Conforme os dados fornecidos pela FAOSTAT (2016), em 2009 o consumo mundial de tomate foi 20,5 kg per capita ao ano, um aumento de 173% comparado ao ano de 1963 que foi de apenas 7,5 kg per capita. Esta cultura representa também um dos principais produtos da indústria alimentar mundial. Em 2011 o consumo mundial foi de 139 milhões de toneladas de tomate *in natura* e processado, com a produção total de 158 milhões de toneladas em 4,68 milhões de hectares. Além disso, o tomate é um modelo vegetal importante, por fazer

associações com micorrizas, para numerosos estudos de genética, bioquímica, morfologia e anatomia, mutagênese e outros (PÉREZ; AHMED; CABEZAS, 2013).

Em 2015 o Brasil produziu 3.467.990 toneladas de tomate o que corresponde a cerca de 2,50% da produção mundial FAOSTAT (2016). No Brasil, a difusão de técnicas de irrigação, as inovações no processo de produção, o uso intensivo de insumos, a introdução de tomateiros melhorados geneticamente para serem mais produtivos e com menos perdas pós-colheita foram os principais fatores que contribuíram para o aumento da produtividade do tomate nacional, já que a área colhida não sofreu grandes variações (INCAPER, 2010). Dados da FAOSTAT (2016) mostram que entre 2004 e 2014, a produção, a área colhida e a produtividade aumentaram 22%, 7% e 14%, respectivamente.

Quanto aos estados brasileiros, dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola de 2016 do IBGE (Tabela 1) mostram que o estado de Goiás é o maior produtor nacional de tomate, contribuindo, em média, com 23,86% da produção total, porém neste estado predomina a produção de tomate para indústria. O tomate de mesa é produzido principalmente na região Sudeste. Os estados de São Paulo (19,87%) e Minas Gerais (15,27%) foram os dois maiores produtores desta região e ocuparam o segundo e o terceiro lugar, respectivamente, na produção nacional de tomate. O Espírito Santo se destaca como o nono maior produtor brasileiro (3,93%). Desta maneira, a região Sudeste do Brasil é a maior produtora de tomate, com aproximadamente 43,67% da produção do país (IBGE, 2016).

Tabela 1 - Produção Mundial e Brasileira no período de 2010 a 2014.

Região	2012 (t)	2013 (t)	2014 (t)	2015 (t)	2016 (t)	Média (ton.)
Mundo ¹	161.791.707	163.719.357	170.750.767	Dados não divulgados		165.420.610
Brasil ¹	3.873.985	4.187.646	4.302.777	4.187.729	3.737.925	4.058.012
Sudeste ²	1.432.770	1.564.080	1.919.438	2.144.550	1.799.478	1.772.064
São Paulo ²	656.055	675.196	849.052	1.097.937	753.283	806.305
Minas Gerais ²	444.615	559.871	674.962	715.890	702.510	619.570
R. de Janeiro ²	195.665	181.923	207.424	185.889	189.611	192.102
Esp. Santo ²	136.435	147.090	188.000	144.834	154.074	154.087

¹FAOSTAT (2016) <http://www.fao.org/faostat/en/#data/CC>

²IBGE (2012, 2013, 2014, 2015 e 2016)

No Espírito Santo, apenas o tomate de mesa é cultivado, e as principais regiões produtoras caracterizam-se pela presença de poucos grandes produtores e a dominância de pequenas propriedades com mão de obra de base familiar e localizadas próximas ao mercado consumidor

da Grande Vitória, dividindo com a cafeicultura a primazia da importância agrícola dos principais municípios produtores. O tomate de mesa ocupa posição de importância no cenário da olericultura capixaba, e na safra de 2016 atingiu uma área de cerca de 2.511 hectares, com uma produtividade média estimada de 61,36 toneladas por hectare. Os principais municípios produtores são Santa Teresa, Laranja da Terra, Venda Nova do Imigrante, Afonso Claudio, Domingos Martins, Santa Maria de Jetibá, Castelo e Alfredo Chaves (IBGE, 2016; INCAPER, 2010).

Apesar do avanço da produtividade, o brasileiro consome pouco tomate e por isso produção interna de tomate de mesa atende à demanda anual do Brasil. O último levantamento feito pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, em 2011, mostra que os brasileiros consomem apenas 20,37 kg de tomate por ano, comparado a outros países como Grécia, Espanha e Estados Unidos que consomem 76,86, 42,58 e 37,81 kg/per capita/ano, respectivamente (FAOSTAT, 2016) <http://www.fao.org/faostat/en/#data/CC>.

Todos os anos, o Grupo de Trabalho Ambiental (EWG) produz uma lista de frutas e legumes com os mais altos níveis de resíduos de pesticidas, conhecida como Dirty Dozen. Os tomates salada e os tomates cereja são frequentemente encontrados nessa lista, levando o EWG a sugerir que as pessoas comprem tomate orgânico, sempre que possível, a fim de minimizar a exposição aos agrotóxicos. Em 2016, os tomates salada e cereja ocuparam a 9ª e 11ª posições da Dirty Dozen, respectivamente. Essa classificação se baseia em resultados de mais de 35.200 amostras de 48 espécies vegetais alimentícias testadas pelo Departamento de Agricultura dos EUA-USDA e pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA-FDA (<http://www.medicalnewstoday.com/whitelist-mnt>).

Os resíduos de agrotóxicos nos tomates produzidos no Brasil, assim como em várias partes do mundo, também é um problema. Das 730 amostras do fruto do tomateiro analisadas pela ANVISA, entre 2013 a 2015, 200 amostras apresentaram agrotóxicos não autorizados para uso na cultura de tomate. Dentre os agrotóxicos detectados como não autorizado para a cultura, o clorpirifós e o acefato apresentaram o maior índice de detecções, tendo sido encontrados, respectivamente, em 13,4% e 22,3% das amostras monitoradas. Em todo o Brasil foram detectados 63 agrotóxicos nas amostras de tomate sendo 13 agrotóxicos não autorizados para essa cultura. No Espírito Santo, de modo geral, os resultados do programa estadual foram similares aos resultados do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos-PARA. Foram achados resíduos de agrotóxicos em 74% das amostras analisadas, sendo encontrados resíduos irregulares em 33% delas. A irregularidade mais comumente detectada

nas amostras de alimentos foi a presença de resíduo de agrotóxico não autorizado para a cultura, assim como no PARA. (ANVISA, 2016).

2.2 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS E FENOTÍPICAS DO TOMATEIRO

O tomateiro pertence à família Solanaceae juntamente com outras espécies importantes como a batata, a pimenta e a berinjela. O tomateiro foi classificado por Linnaeus em 1753 como *Solanum lycopersicum* e por Miller em 1754 como *Lycopersicon esculentum* sendo atualmente validada a primeira classificação: *Solanum lycopersicum* (PERALTA; SPOONER; KNAPP, 2008). O tomateiro é uma espécie diploide com $2n = 2x = 24$ cromossomos. O genoma do tomateiro é composto de, aproximadamente, 950 milhões de pares de base de DNA, sendo que mais de 75% é composto de heterocromatina desprovida de genes ativos (PROHENS; NUEZ, 2008). O centro de origem do gênero *Solanum* é a região andina da Colômbia, do Equador, do Peru, da Bolívia e do Chile, onde crescem espontaneamente diversas espécies do gênero. O antepassado mais provável do tomateiro cultivado é um pequeno tomate silvestre *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (Dun.) que cresce facilmente nas regiões tropicais e subtropicais da América e da Europa. No período pré-colombiano, alguns espécimes foram introduzidos na América Central e no México durante os movimentos migratórios indígenas. A palavra tomate originou-se de tumatl ou tomatl – termo de um dialeto indígena mexicano que significa, genericamente, plantas de frutos globulares com muitas sementes e polpa aquosa. O México é considerado um centro de domesticação do tomateiro, onde a planta passou a ser cultivada e melhorada geneticamente. O tomate tornou-se parte integrante da dieta mexicana séculos antes da chegada dos conquistadores espanhóis. Quando a conquista se iniciou, o tomate já estava integrado às culturas asteca e de povos indígenas da América Central, que o cultivavam, comercializavam e o consumiam. Os incas e outras tribos andinas utilizavam os frutos de formas silvestres apenas esporadicamente. Introduzido na Europa através da Espanha e a partir do México, entre 1523 e 1554, já havia alcançado um nível avançado de domesticação, apresentando tipos diversificados. Inicialmente foi introduzido como planta ornamental e medicinal, passando em fins do século XVIII a ser cultivado e consumido como hortaliça na Espanha de onde ocorreu a disseminação pelo globo (FILGUEIRA, 2003; PROHENS; NUEZ, 2008).

O tomate é um fruto carnososo, macio, com dois ou mais lóbulos, protegido por uma cutícula quase impermeável a gases e a água, que contém internamente uma cavidade locular (Figura 1) (FILGUEIRA, 2003; PROHENS; NUEZ, 2008).

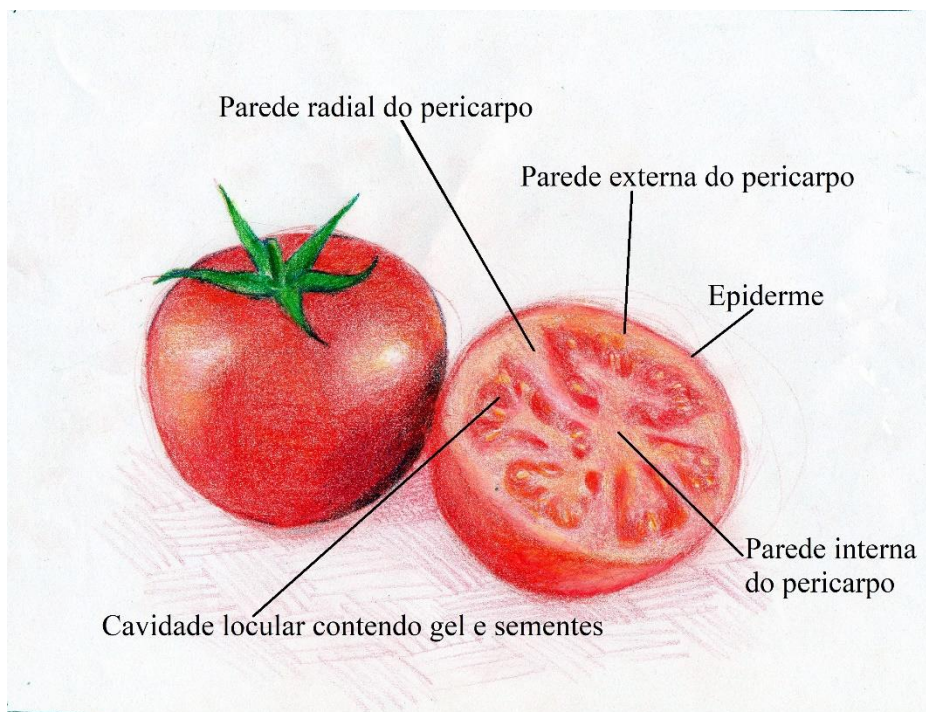


Figura 1 - Caracterização externa e interna do fruto do tomateiro (PROHENS; NUEZ, 2008). Desenho de Hugo G. Tavares.

O tomateiro é uma planta vascular cujas flores geram frutos carnosos com sementes de dois cotilédones e assim é classificado como pertencente ao reino Plantae (plantas), sub-reino Tracheobionta (plantas vasculares), superdivisão Spermatophyta (plantas com sementes), divisão: Magnoliophyta (plantas com flores), classe Magnoliopsida (dicotiledôneas), subclasse: Asteridae, ordem: Solanales, família: Solanaceae, gênero: *Solanum* L., espécie: *Solanum lycopersicum* L. (<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=SOLY2>).

O tomateiro é uma planta perene de porte arbustivo que se cultiva como anual, é uma planta herbácea, de caule flexível e incapaz de suportar, na posição vertical, o peso da parte vegetativa e dos frutos. Há dois tipos principais de hábito de crescimento. O hábito determinado é característico das cultivares destinadas à agroindústria conduzidas em cultura rasteiras com as plantas em forma de moita. As hastes atingem 1,00 m no máximo, terminando por um cacho de flores. O hábito indeterminado ocorre na maioria das cultivares comerciais para produção de frutos para mesa, com o tomateiro apresentando porte alto e crescimento contínuo, podendo

ultrapassar 2,50 m. Ocorre a dominância da gema apical sobre as gemas laterais, resultando em menor desenvolvimento destas. O desenvolvimento da planta é vigoroso e contínuo, acontecendo simultaneamente a floração e a frutificação. O hábito indeterminado de crescimento é característico do grupo Salada, sendo as plantas conduzidas sob tutoramento nas regiões produtoras do Brasil (FILGUEIRA, 2003; PROHENS; NUEZ, 2008).

O ciclo cultural varia de 4 a 7 meses, da semeadura até a produção de novas sementes, incluído o período de colheita que pode variar de 1 a 3 meses. As flores se agrupam em cachos, são hermafroditas o que favorece a autopolinização, sendo o tomateiro uma planta autógama. Entretanto, a fecundação cruzada pode ocorrer através de insetos (zoocoria) embora em pequena escala. Na maioria das situações se observa que é relativamente fácil manter as cultivares geneticamente puras, isenta de cruzamentos indesejáveis. Após a germinação, que ocorre entre 3 a 5 dias, a plântula exibe duas folhas cotiledonares típicas, alongadas e estreitas, concomitantemente desenvolve-se a raiz principal, pivotante, posteriormente se desenvolvem as raízes laterais quase tanto quanto a principal. Em solos profundos a raiz pivotante pode atingir ou ultrapassar 2,50 m de profundidade no início da colheita. Posteriormente, desenvolvem-se as folhas definitivas, que são grandes, pecioladas, compostas por número ímpar de folíolos desenvolvidos. No ponto de inserção das folhas com o caule surgem brotos laterais que podem desenvolver-se, ramificar-se e produzir frutos (FILGUEIRA, 2003; PROHENS; NUEZ, 2008).

Os frutos são bagas carnosas, suculentas, variando em aspecto, tamanho e peso – de 10 g até 500 g, dependendo da cultivar. Também varia o formato, podendo ser globular, cilíndrico, piriforme ou oblongo. O número de lóculos é variável de 2 (biloculares) até 10 (pluriloculares). A maioria das cultivares produz frutos de coloração vermelha bem viva, resultante da combinação da coloração rosada da polpa com a película amarela. A coloração do fruto é determinada por dois pigmentos: licopeno de cor vermelha e o caroteno de coloração amarela que dependem das condições climáticas, sendo o primeiro favorecido por temperaturas amenas, e o segundo pelo calor (FILGUEIRA, 2003; PROHENS; NUEZ, 2008).

A cultivar ‘Especial para Salada’ é do tipo *Beefsteak* cujos frutos se caracterizam por serem globulares e ligeiramente achatados, multiloculares e com o pericarpo espesso (PROHENS; NUEZ, 2008).

O tomate é tido como um alimento funcional, um alimento que vai além de fornecer apenas nutrição básica. Devido aos seus fitoquímicos benéficos, como o licopeno, os antioxidantes, as

vitaminas A e C e o ácido fólico, os tomates também desempenham um papel na prevenção de doenças crônicas e oferecem outros benefícios à saúde humana. O tomate possui em sua composição de 93% a 95% de água. Nos 5% a 7% restantes, encontram-se compostos inorgânicos, ácidos orgânicos, açúcares, sólidos insolúveis em álcool e outras substâncias (NEPA, 2011). Os frutos dos tomateiros são ricos em licopeno, uma substância responsável pela coloração vermelha e associado com a diminuição do risco de doenças cardiovasculares, câncer de próstata e câncer de mama. O licopeno é conhecido como um dos melhores supressores biológicos de radicais livres, especialmente aqueles derivados do oxigênio (FRIEDMAN, 2013).

As variedades devem ser resistentes às doenças e atender ao tamanho e à uniformidade dos frutos. Esta cultura requer um clima relativamente ameno, entre 21°C a 24°C, para uma produção de melhor qualidade. O tomateiro necessita de uma área ensolarada, porém acima de 35°C há uma tendência de dificuldade na formação do tubo polínico o que diminuirá a autofecundação das flores com a consequente diminuição da produtividade. A maioria dos cultivares de tomateiro é sensível a temperaturas muito elevadas que causam o abortamento de flores e também não suportam temperaturas muito reduzidas que podem comprometer as folhas. Com relação ao solo, para a cultura do tomate recomenda-se solos férteis, porosos, bem drenados e ricos em matéria orgânica. O tomateiro é medianamente tolerante à acidez, mas é exigente em cálcio e magnésio. Além disso, é aconselhável plantar o tomate em um solo que não tenha sido cultivado antes com tomate ou outra solanácea para evitar doenças (FILGUEIRA, 2003; INCAPER, 2010; PROHENS; NUEZ, 2008).

2.3 CULTIVO E MANEJO

A demanda crescente de alimentos e energia, associada à preservação ambiental e à disponibilidade limitada de terra, exige estudos focados em diferentes meios de produção. Aumentar a produtividade e garantir a sustentabilidade econômica, ambiental e social na agricultura sempre foi um grande desafio agrícola. Neste contexto, podem-se destacar dois sistemas de produção: convencional e orgânico.

Desde a Revolução Verde iniciada na década de 1960, a agricultura brasileira veio fazendo uso constante, progressivo e, conseqüentemente, intensivo de máquinas agrícolas, de sementes melhoradas, corretivos de solo, adubos e agrotóxicos para produzir alimentos. Este sistema de produção degrada os solos, compromete a qualidade e quantidade dos recursos hídricos, devasta

florestas e campos nativos, empobrece a diversidade genética de plantas e animais, além de contaminar os alimentos produzidos para a população. Existe consenso entre os especialistas de que o sistema de produção agrícola derivado da Revolução Verde está em crise e que é necessário mudar a forma de se produzir e de se relacionar com o meio ambiente (HESPANHOL, 2008). Em resposta aos impactos negativos causados por este sistema de produção, surgem diversos movimentos em prol de uma agricultura mais sustentável, ambiental e socialmente justa. Entre estes movimentos, pode-se destacar o movimento orgânico, biodinâmico, natural, regenerativo, permacultura, dentre outros. Cada um com suas especialidades, porém todos voltados para práticas agrícolas que respeitam os recursos naturais e o conhecimento tradicional (KAMIYAMA, 2011).

Devido à ausência de agrotóxicos usados na agricultura convencional, a agricultura orgânica tende a produzir alimentos para atender à crescente demanda mundial por alimentos mais saudáveis. Desde 1990 a agricultura orgânica vem crescendo rapidamente e este crescimento deve-se, principalmente, ao fato da agricultura convencional produzir alimentos contaminados por agrotóxicos e à maior conscientização de uma parcela de consumidores quanto aos efeitos deletérios que os resíduos de venenos podem causar à saúde (DANGOUR et al., 2009; SMITH-SPANGLER et al., 2012).

A agricultura orgânica faz uso de técnicas que a direcionam aos pequenos agricultores. Há uma tendência mundial para o aumento da demanda desses alimentos, o que favorece a criação de emprego e renda para os produtores da agricultura familiar do mundo todo. As vendas de alimentos e bebidas orgânicas estão crescendo rapidamente, aumentando quase cinco vezes entre 1999 e 2013 chegando ao faturamento de US\$ 72 bilhões. Este valor deverá duplicar até 2018. Recentes relatórios internacionais reconhecem a agricultura orgânica como um sistema agrícola inovador que equilibra múltiplos objetivos de sustentabilidade e será cada vez mais importante na segurança global dos alimentos e dos ecossistemas (REGANOLD; WACHTER, 2016).

Hespanhol (2008) apresenta algumas dificuldades enfrentadas pelo pequeno agricultor orgânico no Brasil que acabam desestimulando a produção orgânica, como: produção em pequena escala por causa de problemas com pragas e doenças, instabilidade decorrente da baixa capacitação gerencial; escassez de pesquisa científica em agricultura orgânica; a assistência técnica da rede pública conta com poucos técnicos capazes de difundir a agricultura orgânica; dificuldades financeiras encontradas durante o processo de conversão; dificuldades de acesso ao crédito bancário; custos de certificação e de acompanhamento das exigências da certificação;

difículdade de processamento dos produtos agropecuários; além de maior demanda por mão de obra. Portanto o processo de conversão de sistemas de produção convencionais para orgânico apresenta dificuldades iniciais no Brasil. As vantagens financeiras alcançadas a médio e longo prazos são de fundamental importância para garantir a permanência do agricultor familiar no sistema de produção orgânico (HESPANHOL, 2008).

Algumas principais diferenças entre as agriculturas natural, orgânica e convencional podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Diferenças entre os sistemas de cultivo natural, orgânico e convencional.

Manejo	Sistema de cultivo					
	Convencional		Orgânico		Natural	
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
Aração	X	X	X	X		X
Gradagem	X	X	X		X	
Adubação	X		X			X
Plantio direto	X	X	X	X	X	
Produção da própria semente		X	X	X	X	X
Irrigação	X	X	X	X	X	X
Agrotóxicos, caldas e extratos vegetais	X		X			X
Descanso do solo	X		X			X
Aportes externos	X		X			X
Repetição de cultura		X		X	X	
Rotação de cultura	X		X		X	X

Fontes: True Health (OKADA, 1987), Tomate (INCAPER, 2010), Agricultura Orgânica (SOUZA, 2015).

2.3.1 Agricultura Natural

No Brasil, o termo agricultura natural é usado para nomear aos métodos agrícolas sustentáveis criados tanto por Mokiti Okada quanto por Masanobu Fukuoka. O USDA-United States Department of Agriculture diferencia os dois métodos dando-lhes nomes diferentes, quais sejam: Nature Farming para o método de Mokiti Okada, ou Mokicho Okada na grafia inglesa,

e Natural Farming para o de Masanobu Fukuoka (<https://www.nal.usda.gov/afsic/sustainable-agriculture-definitions-and-terms-related-terms#term21>).

A prática da agricultura natural não adubada leva o agricultor a saber que as plantas crescem com os nutrientes do solo, portanto, é desnecessária e dispensável a intervenção do homem sobre o solo para nutrir as plantas (OKADA, 1987). Os ecossistemas terrestres têm tudo o que as plantas cultivadas precisam para produzir alimentos saudáveis e em abundância. As técnicas da agricultura natural reproduzem no campo agrícola o que ocorre nos ambientes naturais e assim produzem plantas e alimentos tão saudáveis quanto os coletados pelos homens das cavernas e os encontrados nos centros de origem das plantas cultivadas.

A agricultura natural surgiu a partir do pensamento e da metodologia do pensador japonês Mokiti Okada no final da década de 1930. A teoria da agricultura natural, como Okada expôs, repousa sobre uma crença nos poderes vivificantes universais que os elementos do fogo, água e terra conferem ao solo. O solo do planeta, criado durante um período de eras, adquiriu propriedades de sustentação da vida, de acordo com o princípio da indivisibilidade dos reinos espiritual e material, que por sua vez fornece a força da vida que permite que as plantas cresçam sem a adubação feita pelo homem. Utilizar o poder inerente ao solo é o princípio fundamental de agricultura natural (<http://afsic.nal.usda.gov/sustainable-agriculture-definitions-and-terms-related-terms#term21>).

O Governo Federal no Art. 1º da Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003 define o que é um sistema orgânico de produção:

Art. 1º Considera-se sistema orgânico de produção agropecuária todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não renovável, empregando, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente.

[...]

A agricultura natural é um tipo de agricultura orgânica de acordo com o § 2º do artigo 1º dessa lei.

[...]

§ 2º O conceito de sistema orgânico de produção agropecuária e industrial abrange os denominados: ecológico, biodinâmico, natural (grifo nosso), regenerativo, biológico,

agroecológicos, permacultura e outros que atendam os princípios estabelecidos por esta Lei.

[...]

A agricultura natural é uma agricultura sustentável que tem o solo como um organismo vivo que será mais produtivo à medida que forem aplicadas as regras canônicas para a conservação da estrutura e da atividade biológica dos solos, facilmente conseguidas quando não se ara nem se aduba o solo.

Agricultura sustentável tem que considerar aspectos socioeconômicos e culturais dos grupos sociais implicados. Não basta proteger e melhorar o solo ou a produtividade agrícola se não resulta em melhorias nas condições de vida das pessoas envolvidas. Portanto, agricultura sustentável é um conceito que implica aspectos e conceitos de cidadania e libertação dos esquemas de dominação impostos por setores de nossa própria sociedade e por interesses econômicos de grandes grupos, de modo que não se pode abordar o tema reduzindo apenas às questões técnicas (CAPORAL; COSTABEBER, 2002). Na agricultura sustentável a produção de alimentos deve ter efeitos negativos mínimos no ambiente e não liberar substâncias tóxicas ou danosas no corpo humano, na atmosfera, na água superficial ou no lençol freático; deve preservar e restaurar a fertilidade, prevenir erosão e manter a saúde ecológica do solo. Sustentável também implica o uso da água de um modo que permita aos aquíferos se recarregarem e às necessidades de água do ambiente serem satisfeitas. Além dos cuidados com o solo, implica manter uma diversidade de culturas, usando controles naturais para as pragas e doenças, facilitando a economia local, promovendo boas relações com os vizinhos, em geral, preservando a saúde da terra e dos que nela vivem. A agricultura sustentável visa atender às necessidades do presente sem comprometer a capacidade das gerações futuras de atender às suas próprias necessidades (GLIESSMAN, 2006).

No sistema de manejo da agricultura natural as qualidades químicas, físicas e biológicas do solo têm que resultar no livre crescimento das raízes, na entrada e armazenamento das águas das chuvas e das irrigações, sendo essa interação solo-planta-microrganismo se mostrado diretamente relacionada ao desenvolvimento e sanidade das culturas. A agricultura natural usa a química dos solos oriunda de inúmeros processos biológicos (OKADA, 1987; PRIMAVESI, 2006). Esse sistema agrícola produz plantas com um lento mas eficiente desenvolvimento inicial da parte aérea em função de serem cultivadas em solos não adubados e bem estruturados, o que as faz investir primeiro em seus sistemas radiculares tal qual ocorre nas matas e florestas (ANDREWS; RAVEN; LEA, 2013).

Sabe-se que a cada chuva ocorre o processo de lixiviação dos nutrientes químicos do solo promovido pela infiltração das águas no seu perfil. As plantas que nos alimentam, as angiospermas, estabeleceram várias estratégias no curso da evolução de mais de 140 milhões de anos, para ajustar seu crescimento e desenvolvimento sob condições ambientais variáveis (BRENNER et al., 2006; GRAFI; OHAD, 2013), incluindo a diminuição dos teores de nutrientes no solo, os quais vieram diminuindo a cada chuva (RECH et al., 2009).

Os métodos da agricultura natural privilegiam o reciclo da matéria orgânica nos campos agrícolas para nutrir as culturas. Com o aumento do reciclo da matéria orgânica no solo, a vida microbiana tem grande atividade, pois vive em um ambiente repleto de recurso alimentar e água. Com a ação dos microrganismos sobre a matéria orgânica, o solo tem agregados estáveis, se torna de estrutura granular bem desenvolvida e não endurece. A capacidade das culturas produzirem bem na agricultura natural é dependente do constante reciclo da matéria orgânica nos solos deste agroecossistema.

A função da matéria orgânica dos restos culturais no solo não é a de nutrir as plantas diretamente, mas sim os organismos do solo. São esses organismos que consomem os nutrientes minerais e orgânicos do solo fixando-os em suas células para em seguida, com sua morte, deixá-los disponíveis para as plantas na forma de água, minerais, gás carbônico (PRIMAVESI, 2008) e moléculas orgânicas (HOORMAN, 2011). Uma única colher de chá de solo de mata, cerca de 1 grama, pode conter de 100 milhões a 1 bilhão de bactérias, vários metros de filamentos de fungos, milhares de protozoários e dezenas de nematoides. Nas primeiras camadas dos solos, cerca de 30 cm, duas toneladas e meia de bactérias microscópicas podem estar ativas, nascendo e morrendo a cada hectare, podendo haver mais de um milhão de espécies de bactérias presentes nessa área (HOORMAN, 2011; MERRIFIELD, 2010). A matéria orgânica comporta-se como uma esponja, com a capacidade de absorver e manter até 90% do seu peso em água. A matéria orgânica liberará a maior parte da água que absorve para as plantas (SOIL SURVEY STAFF, 2013).

2.3.1.1 Baixos aportes na agricultura natural

A agricultura natural produz com o que há em seus canteiros, preferencialmente, matéria orgânica autóctone. Os canteiros preparados apenas uma única vez, para serem cultivados para sempre nesse sistema de cultivo, serão nutridos e estruturados pela decomposição dos restos vegetais sobre o solo e no seu interior. Nesse método agrícola a decomposição aeróbica da

matéria orgânica que ocorre sobre o solo e parcialmente anaeróbica no seu perfil produz substâncias intermediárias importantes como os ácidos poliurônicos necessários para se criar e se manter uma boa estrutura do solo em função de seu grande poder agregante (KONONOVA, 1966; PRIMAVESI, 1981; SAINJU; JABRO, 2014). A adubação verde pode e deve ser feita com o objetivo de ser útil na construção da estrutura do solo, no período de transição entre um sistema de agricultura adubada e a agricultura natural, usando-se plantas que tenham um forte sistema radicular capaz de descompactar o solo profundamente como, por exemplo, o feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) e o guandu (*Cajanus cajan*). A agricultura natural por não usar agrotóxicos ou caldas permitidas na agricultura orgânica para combater pragas e doenças produz alimentos mais saudáveis do que as agriculturas convencional e orgânica (PRIMAVESI, 2006).

A agricultura natural é mais simples que a agricultura orgânica porque não usa elementos alóctones e acompanha fielmente os movimentos bióticos e abióticos da Natureza que recuperam e mantêm a estrutura do solo igual ou muito próximo da existente no ecossistema original (PRIMAVESI, 2006).

2.3.1.2 Variedades localmente adaptadas pela agricultura natural

As mudanças climáticas ameaçam a redução da produção agrícola e constituem um desafio para a segurança alimentar. A criação de variedades resistentes a essas mudanças de clima é cada vez mais urgente. As populações de plantas selvagens evoluíram para lidar com as mudanças em seu ambiente de origem via forças de seleção natural. O conhecimento de como sobrevivem, no centro de origem, as plantas que alimentam a humanidade pode estar distante do objetivo da agricultura que é o de maximizar o rendimento das culturas em ambientes muito diferentes dos locais onde se originaram. No entanto, compreender a natureza da adaptação, que ocorre no genoma das populações selvagens, pode revelar estratégias para o melhoramento que resultem em uma produção agrícola mais resiliente às mudanças climáticas e às pragas e doenças (HENRY; NEVO, 2014). A agricultura natural usa a adaptação das plantas aos solos e ao clima, com o auxílio dos microrganismos indígenas, para produzir alimentos puros, saudáveis, saborosos e com pouquíssimo aporte de energia. As variedades cultivadas por séculos em solos adubados quando usadas pela agricultura natural têm o vigor original recuperado pela simplicidade da seleção massal que visa mantê-las capazes de produzir com o que há nos solos nativos e de estrutura recuperada. Essa seleção tem que ocorrer a cada plantio da agricultura

natural para aumentar a frequência de alelos que resultam em características favoráveis das plantas para o agricultor e para o consumidor. Uma das principais vantagens da seleção massal é que ela é baseada somente no fenótipo. Por isso, este tipo de seleção sofre interferência da qualidade do solo e do clima, ou seja, do meio ambiente. A seleção massal é o método mais antigo de melhoramento de plantas e vem sendo utilizada pelos agricultores há milhares de anos. Tudo isso começou quando os primeiros agricultores escolheram os melhores frutos ou plantas para dar origem à geração seguinte no Crescente Fértil, berço da agricultura, há 12 mil anos (BORÉM, 2001; MAZOYER; ROUDART, 2010).

2.3.1.3 Repetição de cultura

É muito comum se evitar o uso do mesmo solo para culturas repetitivas nos sistemas de produção orgânico e convencional. Entretanto, na agricultura natural podem-se obter ótimos resultados através dessa prática pelo simples fato de ser um método que não recebe nenhum tipo de adubo. Para se obter um solo vivo e para ativar sua força, é necessário não o adubar e fazer culturas repetitivas sempre que possível, pois com elas o solo vai se adaptando naturalmente à cultura em questão. Para justificar a cultura repetitiva em culturas anuais, basta lembrar a quantidades de anos que uma cultura perene permanece nas áreas de cultivo (OKADA, 1987). A capacidade inerente ao solo de se adaptar a uma cultura plantada repetitivamente na mesma área se dá através dos exsudatos radiculares que selecionam os microrganismos do solo benéficos e específicos da planta.

As associações bióticas interespecíficas recentes ou novas estão mais sujeitas a desenvolver ações conjuntas negativas severas do que as associações mais velhas. Na evolução e desenvolvimento dos ecossistemas, as interações negativas tendem a reduzir-se ao grau mínimo em favor da simbiose positiva que reforça a sobrevivência das espécies que entre si interagem. As associações bióticas novas ou recentes são mais passíveis de desenvolver interações negativas severas do que as associações mais antigas (ODUM; BARRETT, 2007). Os microrganismos de solo e plantas interagem por meio dos exsudatos radiculares (MARSCHNER, 2012). Nas plantas superiores entre 20 a 60% do carbono fotoassimilado é lançado no perfil do solo (GRAYSTON; VAUGHAN; JONES, 1997; KUZZYAKOV; DOMANSKI, 2000) sob a forma de exsudatos de raízes como por exemplo: substâncias húmicas; açúcares; ácidos orgânicos; aminoácidos; mucilagens; células descamadas e tecidos (MARSCHNER, 2012). A quantidade e a composição dos compostos liberados são

extremamente variáveis e afetada por múltiplos fatores. As estimativas de rizodeposição variam de 800 a 4.500 kg de carbono/ha ano (KUZYAKOV; DOMANSKI, 2000; LYNCH; WHIPPS, 1990). A rizodeposição para o solo e seus habitantes é uma importante fonte de carbono e nitrogênio que funcionam como sinalizadores entre plantas e microrganismos do solo (JENSEN, 1996). Por conseguinte, é de grande importância para manter o nível de atividade microbiana no solo. Substâncias orgânicas de baixo peso molecular dos exsudatos radiculares desempenham um papel chave nas interações planta-microrganismos por interferir na estrutura e função das comunidades de fungos e bactérias do solo (HALF, 2013; SHI et al., 2011). A ligação entre espécies de plantas e comunidades microbianas no solo da rizosfera é rígida e restrita, sendo o resultado da coevolução entre ambos os reinos (NANNIPIERI et al., 2003; PINTON; VARANINI; NANNIPIERI, 2007). Exsudatos radiculares determinam as interações específicas entre as plantas hospedeiras e as populações de microrganismos associados à rizosfera. Exsudatos radiculares conseguem atrair organismos benéficos, como fungos micorrízicos e rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PINTON; VARANINI; NANNIPIERI, 2007). A nutrição e a melhoria no crescimento de plantas gerada pelos microrganismos promotores têm um impacto significativo sobre o tipo e a concentração de exsudação radiculares. Enquanto as plantas modificam a rizosfera e o ambiente para os microrganismos do solo, estes por sua vez modificam a fisiologia vegetal (LAMBERS; COLMER, 2005), assim sendo, a repetição de cultura desempenha o papel de transformar pelo envelhecimento as interações bióticas novas em simbioses positivas (como mutualismo [micorrizas] e protocooperação) entre espécie vegetal e microrganismos de solo.

As interações simbióticas ocorrem entre organismos muito distintos entre si como as plantas que são autotróficas e certos fungos e bactérias que são heterotróficos. À medida que os ecossistemas evoluem na direção da maturidade, as interações negativas são substituídas pelas positivas que passam a ser uma forte vantagem seletiva. Essa substituição parece ser especialmente importante quando algum aspecto do ambiente é limitante como solos inférteis (ODUM; BARRETT, 2007) ou como na ausência das defesas de plantas para a maioria dos organismos saprófitos de solos causadores de sérias doenças em nossas principais culturas (CHA et al., 2015). A repetição de cultura estimula o envelhecimento das simbioses e assim os solos podem atingir um estado de supressividade específica para os saprófitos devido à seleção e ao enriquecimento ao longo do tempo de populações microbianas particulares que defenderão a cultura em repetição nesses solos (CHA et al., 2015).

A rotação ou repetição de cultura interferem na atividade enzimática dos solos e consequentemente em suas interações simbióticas. Enzimas microbianas extracelulares como a polifenoloxidase e ureases, uma vez no ambiente do solo por excreção ou lise celular, intermedeiam os processos bioquímicos de decomposição da matéria orgânica (BACH et al., 2013; GERMAN et al., 2012; SINSABAUGH, 2010). Durante 7 anos de repetição da cultura de pepino (*Cucumis sativus*) nos mesmos solos, em experimentos na China, a atividade da polifenoloxidase aumentou pronunciadamente nos solos enquanto a das ureases diminuiu. Nesse mesmo experimento houve aumento de atividade das ureases quando o cultivo de pepino estava sob rotação de cultura (WU; MENG; WANG, 2006). Certos microrganismos que colonizam as raízes produzem as polifenoloxidases, que podem estimular o crescimento de plantas (BURNS; DICK, 2002) e as ureases que têm grande atividade em solos poluídos com excesso de nitrogênio proveniente de adubação (DINDAR; ŞAĞBAN; BAŞKAYA, 2015).

A repetição da cultura de caupi (*Vigna unguiculata*) na Índia aumentou lentamente os propágulos micorrízicos do solo associados a essa espécie enquanto o pousio (plantio+descanço do solo+plantio+...) os reduziu a 40% e a rotação de cultura com mostarda (*Brassica juncea*) os diminuiu a 13% (HARINIKUMAR; BAGYARAJ, 1988). As aquisições do carbono e nitrogênio podem ser efetuadas sem o auxílio de microrganismos de solo e ocorrem simplesmente pela atividade de enzimas proteolíticas lançadas na rizosfera pelas plantas na forma de exsudatos radiculares para digerirem as proteínas em aminoácidos, os quais serão absorvidos pelas raízes, pelo apoplasto e assimilados pela planta (PAUNGFOO-LONHIENNE et al., 2008). Em solos não arados da agricultura natural a repetição de cultura favorece o envelhecimento das relações simbióticas entre microrganismos de solo e da cultura repetida em função da manutenção dos exsudatos radiculares e enzimas extracelulares dos microrganismos do cultivo anterior. Faz parte do manejo das agriculturas convencional e orgânica a rotação de culturas entre famílias diferentes de plantas cultivadas para se atenuar a infestação de ervas daninhas e evitar pragas e doenças que geralmente ocorre quando uma espécie é continuamente plantada em área adubada (HENKEL, 2015; PIMENTEL et al., 2005). A repetição de cultura é uma das práticas que diferenciam a agricultura natural dos demais tipos de agricultura sustentável, no entanto, caso as condições do mercado, em que o praticante desse método atua, estiverem favoráveis ao cultivo de uma variedade diferente da que se encontra em repetição, o plantio da nova cultura poderá ser executado sem prejuízo para o agricultor.

Pelo exposto somente as plantas cultivadas na agricultura natural receberão as benesses de serem repetidamente plantadas em solos que promovem o amadurecimento do ecossistema agrícola sem a influência dos adubos (OKADA, 1987).

Os solos que têm o controle altamente eficaz e sustentável de doenças de grande potencial destruidor, como resultado da repetição de cultura e sob aportes externos mínimos, são denominados solos supressores. Os mecanismos de defesa microbianos das raízes contra patógenos em solos supressores são modulados pela planta através dos exsudatos radiculares que estimulam as populações de microrganismos antagônicos da rizosfera. Este mecanismo frequentemente constitui a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos presentes no solo. Solos supressores fornecem alguns dos melhores exemplos de microrganismos indígenas que protegem as raízes das plantas contra patógenos do solo (KWAK; WELLER, 2013). A interação entre espécies de vegetais e microrganismos nos ecossistemas naturais têm um papel fundamental na manutenção dos baixos níveis de doença nesses ambientes (GILBERT, 2002), no entanto, a rotação de cultura, a aração e a gradagem favorecem a incidência e a gravidade de doenças causadas por patógenos com sobrevivência saprofítica no solo em agroecossistemas (CHA et al., 2015). Com o plantio sucessivo da mesma cultura, no entanto, os solos podem atingir um estado conhecido como supressividade específica devido à seleção e ao enriquecimento, ao longo do tempo, de determinadas populações microbianas que são transferíveis para solos não supressivos e, normalmente, são eliminados pelo processo de pasteurização, fumigação ou rotação de culturas (CHA et al., 2015; KWAK; WELLER, 2013). Existem vários exemplos mostrando que a repetição de cultura induz à formação de solos supressivos a doenças específicas de plantas. As variedades cultivadas não têm resistência genética para a maioria dos microrganismos patógenos e saprofíticos. Para compensar esta desvantagem, plantas recrutam membros antagônicos aos patógenos na microbiota do solo para defender suas raízes. Os melhores exemplos desta defesa microbiana das raízes são observados em solos cuja a supressão de doenças é induzida pela repetição de cultura, ou seja, por culturas susceptíveis a um agente patogênico plantadas seguidamente na mesma área (CHA et al., 2015). A duração da repetição de culturas necessária para induzir a formação de solos supressivos, muitas vezes é medida em anos, e não pode ser uma ferramenta na prática de manejo em sistemas de produção convencional. Práticas de manejo, que incluem adubação, rotação de culturas, aração e gradagem entre outras, irão interferir negativamente nos processos ecológicos das comunidades microbianas envolvidas na supressão dos fitopatógenos que habitam os solos (KWAK; WELLER, 2013; MAZZOLA, 2002; VAN BRUGGEN, 1995; WORKNEH et al.,

1993). Uma pausa na repetição da cultura irá reduzir ou eliminar a supressão a determinado patógeno, porém essa defesa pode rapidamente ser recuperada quando a cultura indutora for cultivada novamente (CHA et al., 2015; KWAK; WELLER, 2013; MAZZOLA, 2002; SARNIGUET; LUCAS; LUCAS, 1992). O desenvolvimento de solos supressivos foi conseguido por meio do cultivo repetido de melancia (LARKIN; HOPKINS; MARTIN, 1996), morango (CHA et al., 2015) e trigo (MAZZOLA, 2002). O desenvolvimento de solo supressivo não foi associado às alterações na população do patógeno e assim ao aumento das populações de actinomicetos, *Pseudomonas* fluorescentes e bactérias totais na rizosfera do solo supressivo. Outros trabalhos com diversos grupos de microrganismos isolados a partir destes solos indicaram que a supressão foi devida, principalmente, ao aumento das populações de fungos específicos não patogênicos aprimorados seletivamente em resposta ao cultivo de determinadas cultivares (LARKIN; HOPKINS; MARTIN, 1996).

Pelo descrito nos trabalhos que tratam de solos supressivos há determinados manejos pertinentes à agricultura natural que favorecem o desenvolvimento de microrganismos antagônicos nesses solos, enquanto os manejos da agricultura convencional e da agricultura orgânica por substituição de insumos favorecem fortemente os patógenos de solo. Os autores relatam claramente que a repetição de cultura e cultivo mínimo, em que o solo não é revolvido, criam e fortalecem a supressão do solo a sérias doenças de importantes culturas. Nesses trabalhos com melancia de Larkin, Hopkins e Martin (1996), com morango de Cha et al. (2015) e com trigo de Mazzola (2002) não há relato de adubação em nenhum deles, portanto os autores deixam implícito que para o solo apresentar a desejável supressão, os aportes externos devem ser mínimos ou se restringir somente à matéria orgânica.

2.3.1.4 Benefícios do cultivo mínimo do solo na agricultura natural

2.3.1.4.1 Retenção do carbono no solo

Estima-se que a agricultura convencional já tenha ocasionado perdas em cerca da metade do carbono contido inicialmente nesses solos, devido a intensa movimentação conferida pelas arações. (BOURNE JR, 2015). Desde que se começou a cultivar os solos, as arações intensivas vêm oxidando de 30% a 50% de sua matéria orgânica. Uma boa gestão do carbono é vital devido ao seu papel na manutenção da fertilidade, das propriedades físicas e da atividade biológica do solo necessárias para a produção de alimentos. Para diminuir o impacto da agricultura sobre o aumento global de CO₂ é imprescindível que se sequestram e se mantenham os níveis elevados

de carbono no solo (LAL, 2005). O solo representa um reservatório que contém, pelo menos, de duas a três vezes mais carbono do que a atmosfera. Esses valores podem ser maiores, desde que haja alterações no manejo do cultivo dos campos que visam aumentar o sequestro de carbono no primeiro metro de profundidade do solo (BOURNE JR, 2015; KELL, 2011). Há provas que sustentam a importância das raízes na melhoria da estrutura e do fluxo da água no perfil do solo e que ainda mostram o carbono orgânico do solo melhorando a produtividade agrônômica. Arações oxidam a matéria orgânica recém introduzida no solo por meio do sistema radicular e emitem gás carbônico como resultado dessa oxidação, diminuindo assim o sequestro de carbono e contribuindo para o aumento do efeito estufa. O inverso ocorre em culturas perenes e no plantio direto de culturas anuais que auxiliam no sequestro de carbono e diminuem a erosão por manterem o solo e os sistemas radiculares em seu perfil intactos (KELL, 2011). A grande intensidade de cultivos no sistema de plantio direto, em uma mesma área sem pousios, minimiza a perda de carbono e nitrogênio, mantendo o retorno de resíduos ao longo do ano para o solo (SHERROD et al., 2003).

2.3.1.4.2 Criação e manutenção da estrutura do solo

No plantio direto os restos culturais deixados sobre o solo têm impactos positivos na sua fertilidade, na elevação do conteúdo de biomassa microbiana, no controle biológico de ervas daninhas, no aumento dos níveis de fósforo extraível, na maior quantidade de agregados estáveis em água, no aumento da capacidade de infiltração em seu perfil, na grande retenção de água e na melhor expansão das raízes nesse solo (DERKSEN; BLACKSHAW; BOYETCHKO, 1996; SOMMER et al., 2014). O papel da matéria orgânica não é repor nutrientes no solo e nada consegue substituir o seu efeito nos ecossistemas terrestres. O principal benefício da matéria orgânica consiste em fornecer os teores de carbono necessários para a biota do solo, incluindo os microrganismos de vida livre fixadores de nitrogênio (diazotróficos) e os produtores de ácido poliurônicos (PRIMAVESI, 1981, 2008, SANTOS 2016). Os ácidos poliurônicos são os produtos iniciais da decomposição aeróbica dos restos culturais, matéria orgânica rica em celulose, deixados sobre os campos agrícolas. Esses ácidos possuem a propriedade de agregar o solo em grumos, criando assim a estrutura ideal do solo para o desenvolvimento das raízes e para a absorção da água das chuvas e da irrigação. As bactérias do gênero *Cytophaga* produzem a geleia agregante do solo a partir da decomposição aeróbica da celulose (KONONOVA, 1966; PRIMAVESI, 1981; SAINJU; JABRO, 2014). Muitos dos complexos biológico, químico, físico e processos envolvidos na agregação do solo podem ser deduzidos por se entender a

dinâmica dos polissacarídeos ácidos (ácidos poliurônicos) nos ecossistemas terrestres (SAINJU; JABRO, 2014). Além disso, ácidos poliurônicos podem ser facilmente medidos, e devem fornecer um indicador confiável da saúde do solo, uma vez que se compreenda as relações entre os microrganismos que os produzem e o teor de matéria orgânica do solo (CAESAR-TONTHAT et al., 2001). A agregação resultante de hifas fúngicas é mais facilmente estabelecida em solos que são minimamente perturbados, arados, e ainda, fungos geralmente dominam em solos sob preparo reduzido onde predomina a decomposição aeróbica da matéria orgânica no solo (HOLLAND; COLEMAN, 1987). Os mesmos ácidos poliurônicos que agregam o solo (PRIMAVESI, 1981) são os principais componentes da lamela média que formam os canais do apoplasto por onde passam livremente, provenientes da rizosfera, a água e os aminoácidos (TAIZ et al., 2015) que são os nutrientes do solo relacionados ao nitrogênio, conforme Mokiti Okada (1987). De acordo com Primavesi (2008), no manejo ecológico do solo, o agricultor não pode virar a terra mais profundamente do que ela suporta, 15 centímetros, e tem que colocar a matéria orgânica sempre na parte superficial para ter uma decomposição aeróbica. Essas práticas recuperam e mantêm a estrutura do solo (PRIMAVESI, 2008).

2.3.1.4.3 Controle de ervas invasoras.

No plantio direto aplicado sistematicamente na agricultura natural as sementes de ervas daninhas permanecem na superfície do solo, fazendo com que a mortalidade destas sementes seja mais elevada do que as que foram enterradas pela aração. Roedores e insetos alimentam-se de algumas destas sementes, impedindo-as de germinar ou entrar no banco de sementes do solo. Sabe-se que a aração enterra sementes das ervas aumentando o seu número no banco de sementes do solo. Estas sementes persistem por mais tempo dentro do solo do que na sua superfície (BANTING, 1966; DERKSEN; BLACKSHAW; BOYETCHKO, 1996; GULDEN; SHIRTLIFFE; GORDON THOMAS, 2003). As capinas manuais ou mecânicas feitas nos campos não arados da agricultura natural ao serem feitas antes das ervas invasoras emitirem flores, prejudicarão a manutenção do banco de sementes dessa área. À medida que as sementes mais superficiais germinam e em seguida são roçadas as plântulas antes do florescimento, a quantidade de novas sementes tende a zero. As sementes mais antigas aptas a germinarem no banco de sementes se encontrarão cada vez mais profundas a cada cultivo até restarem apenas aquelas que não mais conseguirão germinar por falta dos estímulos necessários da luz vermelha curta ou distante.

2.3.1.5 Água para as plantas na agricultura natural

A agricultura natural recria a estrutura original do solo a partir dos restos culturais mantidos e decompostos aerobicamente sobre sua superfície e parcialmente anaeróbico em seu interior. O solo intacto guarda a arquitetura original dos sistemas radiculares dos restos culturais, o que conserva a matéria orgânica em seu interior beneficiando a estrutura do solo. Assim, as raízes da cultura seguinte crescem mais facilmente do que em solos arados e adubados, eliminando a necessidade de irrigação (*dry farming*) ou diminuindo drasticamente o seu uso. As plantas, através de um sistema radicular extenso, podem funcionar como bombas que trazem água e nutrientes de horizontes profundos, o que é especialmente importante em plantio direto aplicados em sistemas de poucos aportes (UPHOPP et al., 2006), como na agricultura natural. O plantio direto aumenta a capacidade de infiltração e de retenção de água no solo (DERKSEN; BLACKSHAW; BOYETCHKO, 1996; SOMMER et al., 2014) o que diminui a dependência da planta por onerosas irrigações. Um solo bem agregado apresenta taxas de infiltração de 100 até 400 mm/h e possibilita as plantas a produzirem um extenso e profundo sistema radicular. Essas taxas podem ser reduzidas para 7 a 8 mm/h quando o solo é inadequadamente manejado. Com baixa infiltração, os cultivos sofrem com a falta de água logo após pequenos períodos sem chuvas (PRIMAVESI, 2008). O principal objetivo da agricultura natural é produzir sem adubos com manejos estimuladores de variadas formas de organismos interagindo entre si e entre os componentes minerais e orgânicos do solo. Essa dinâmica biológica exerce uma função essencial na agregação do solo, de modo a torná-lo grumoso, permeável para a água e com estrutura granular desenvolvida o suficiente para as raízes se aprofundarem em seu perfil (PRIMAVESI, 2008).

2.3.1.6 Nutrientes do solo *versus* nutrientes dos adubos

A agricultura natural não faz uso de nada que se possa chamar de adubos (OKADA, 1987). É senso comum que a utilização de adubos químicos ou orgânicos traz bons resultados. Segundo Mokiti Okada (1987) se essa prática continuar por muito tempo, gradativamente começarão a surgir efeitos contrários. Okada (1987) afirma que muitos dos problemas encontrados nos campos agrícolas adubados, principalmente pragas e doenças, têm como causa primordial a perda da capacidade das plantas de se alimentarem dos nutrientes do solo. A absorção e assimilação dos nutrientes dos adubos pelas plantas causam mudanças negativas em suas características as quais são transmitidas para as gerações seguintes (OKADA, 1987). Para

Okada (1987) a causa do aparecimento das pragas e doenças é o adubo. As plantas adubadas vão perdendo sua função inerente de absorver os nutrientes do solo e mudam suas características, passando a absorver os adubos como nutrientes (OKADA, 1987).

Temos nos centros de origem plantas resistentes a pragas e doenças se adaptando à frugalidade do solo, no entanto, em meados do século XIX as pesquisas em fisiologia vegetal começam a ser feitas em laboratórios com soluções nutritivas (JONES JR., 2005) compostas por doses altas de nutrientes não encontradas em ambientes naturais. Provavelmente muitas rotas metabólicas de plantas estudadas em laboratório não existam na natureza com a mesma frequência que ocorrem nas bancadas dos laboratórios e tantas outras rotas não consigam ser detectadas e estudadas em plantas superadubadas pelas soluções nutritivas dos laboratórios. Segundo Mokiti Okada (1987) os nutrientes para as plantas se manterem saudáveis e produtivas só podem ser os criados, originados e fornecidos pelo próprio solo. Os nutrientes do solo são a resultante de eventos ambientais sobre os minerais, os microrganismos e a matéria orgânica que compõem o solo.

Okada (1987), ao preconizar que a pureza do solo é fundamental para o perfeito crescimento e desenvolvimento das plantas cultivadas e ao diferenciar nutrientes do solo de nutrientes dos adubos, anunciava a importância que a matéria orgânica autóctone e os microrganismos cosmopolitas e endêmicos tinham por produzirem localmente os nutrientes do solo para alimentar as plantas, deixando-as saudáveis e consequentemente produtivas. Ele alertava que os nutrientes dos adubos contaminavam e mudavam as características do solo, e consequentemente, dos microrganismos nativos, das plantas e, portanto, da qualidade de nossos alimentos (OKADA, 1987). Em ambientes naturais, e muito provavelmente na agricultura natural, as raízes das plantas absorvem substâncias orgânicas nitrogenadas de pequena massa molecular, como peptídeos e aminoácidos, prontos para entrar em rotas metabólicas específicas (HIRNER et al., 2006; KOMAROVA et al., 2008; LEE et al., 2007; PAUNGFOO-LONHIENNE et al., 2008; SVENNERSTAM et al., 2007). As formas de nitrogênio orgânico absorvidas e assimiladas pelas plantas são um dos nutrientes do solo mencionados por Mokiti Okada em seus escritos a respeito da agricultura natural.

O nitrogênio é, quantitativamente, o nutriente mineral mais importante para o reino vegetal. Por isso, as plantas desenvolveram vários sistemas de transporte para absorver do solo o nitrogênio em suas diversas formas (HIRNER et al., 2006; LIPSON; NÄSHOLM, 2001). Com base em inúmeros trabalhos científicos, acredita-se que a principal fonte de nitrogênio para as plantas seja o nitrato, porém há contundentes controvérsias a esse respeito. A importância potencial do

nitrogênio orgânico, principalmente peptídeos e aminoácidos, como uma importante fonte de nitrogênio e carbono para as plantas, particularmente em sistemas de baixo aportes alóctones, destaca a necessidade de se reexaminar os fluxos desses elementos nos ecossistemas (VAN BREEMEN, 2002; WARREN, 2014).

O processo Haber–Bosch produz o nitrato a partir do nitrogênio atmosférico (N_2) com enormes gastos de energia para ser fornecido às plantas na agricultura convencional como um dos nutrientes dos adubos, o que causará danos ambientais inevitáveis. Solos adubados com nitrogênio inorgânico, como nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+), têm suas atividades microbiológicas diminuídas (SHEN et al., 2010) sendo esse fato um indício de que o solo adubado perde sua força vital, de acordo com o pensamento de Okada (1987). Há fortes indícios mostrando que as plantas têm dificuldade para se adaptar à absorção de nitrogênio inorgânico. A forma de nitrogênio predominante em solos adubados com nitrogênio inorgânico não coincide com a capacidade das culturas em adquiri-lo de forma adequada. O nitrogênio inorgânico é extremamente ineficiente nos campos agrícolas. Na China houve um incremento de 37 vezes nos volumes de nitrogênio inorgânico aplicados entre 1961-2009 que alcançou apenas um aumento de 3,4 vezes na produtividade agrícola (SCHMIDT; NÄSHOLM; RENTSCH, 2014). As plantas adubadas com nitrato têm suas características alteradas quando esse íon é absorvido, pois sabe-se que ele regula, ativando ou desativando, em raízes de *Arabidopsis thaliana*, aproximadamente, cerca de 2.000 genes cuja a minoria teve suas funções caracterizadas, e que resultam em consequências metabólicas e genéticas altamente distintas e desconhecidas nas plantas (BRITTO; KRONZUCKER, 2013; CANALES et al., 2014; SCHMIDT, 2014). As famílias de genes transportadores de nitrato, NRT1 e NRT2, estão relacionadas com a percepção de pequenas quantidades de nitrato no meio ambiente e com a transdução de sinal que integra o metabolismo do nitrogênio com o metabolismo do carbono (CAMAÑES et al., 2012). Camañes et al. (2012) demonstraram que a ausência de nitrato na solução nutritiva estimula a inibição dos genes NRT2.1 e NRT2.2 aumentando assim a resistência à *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, independentemente do nível total de nitrogênio endógeno (CAMAÑES et al., 2012). Assim, parece claro que alguns dos genes, que regulam o metabolismo ou transporte do nitrato, controlam fortemente as interações planta-patógeno (CAMAÑES et al., 2012).

Nos ecossistemas naturais e na agricultura natural primeiramente há o investimento maior sobre o sistema radicular e depois o crescimento um pouco menor da parte aérea (MIYAWAKI; MATSUMOTO-KITANO; KAKIMOTO, 2004; YI et al., 2010). Segundo Mokiti Okada

(1987) o fundamental, para ativar o crescimento das plantas, é promover primeiramente o desenvolvimento das raízes em solos de estrutura granular bem desenvolvida e sem impedimentos, sendo esses atributos conseguidos com a criação e manutenção do reciclo da matéria orgânica sobre e sob os campos agrícolas por meio das práticas da agricultura natural. O aumento da superfície das raízes através do aumento do crescimento das radículas é uma resposta conhecida às concentrações baixas de nutrientes no solo (GILROY; JONES, 2000; ROBINSON; RORISON, 1987). Nas plantas cultivadas sem adubos, os pelos absorventes são muito mais numerosos e compridos, e a ramificação é bem maior; portanto, o enraizamento é mais forte (DATTA et al., 2011; FOEHSE; JUNGK, 1983; JI, 2011; LEE; CHO, 2013; YI et al., 2010). Segundo Okada, através da agricultura natural, o problema da agricultura será solucionado pelas raízes. Embora o gravitropismo e o hidrotropismo na raiz sejam considerados fatores dominantes no seu alongamento (TSUTSUMI, 2003), a proliferação de um vasto sistema radicular depende também da maciez dos solos e dos nutrientes na rizosfera. Se a rizosfera é pobre em matéria orgânica ou muito seca, o crescimento radicular é lento. À medida que as condições na rizosfera melhoram, o crescimento radicular aumenta. Plantas com sistema radicular vigoroso e extenso podem explorar grandes volumes de solo e absorver mais água e nutrientes sob condições de estresse nutricional e podem aumentar o rendimento das culturas e o uso eficiente do nitrogênio (MERRILL; TANAKA; HANSON, 2002). Em concentrações elevadas de nitrato é promovido o desenvolvimento da parte aérea da planta enquanto a diminuição das concentrações de nitrato aumenta o desenvolvimento do sistema radicular (CASTAINGS et al., 2011).

A densidade de raízes é um fator chave que afeta a partição de nitrogênio disponível entre raízes e microrganismos. Em todos os ecossistemas, o teor de nitrogênio e as taxas de decomposição da matéria orgânica são substancialmente mais altas na camada superficial do solo, disponibilizando grandes teores de nitrogênio orgânico e ínfimos teores o nitrogênio inorgânico. Além disso, a biomassa microbiana diminui com a profundidade do solo e está fortemente correlacionada com a biomassa da raiz e o teor de matéria orgânica do solo. O aumento da densidade radicular desloca fortemente a competição para uma absorção muito maior de nitrogênio pelas raízes. Se a biomassa radicular for $< 30 \text{ kg de matéria seca (MS)/m}^3$ correspondendo a 20-25 g de raízes por kg de solo, os microrganismos superam as raízes entre 5 a 10 vezes. Apenas um sistema radicular com densidade extremamente alta de 53 kg MS/m^3 ou 44 g de raízes por kg de solo, pode permitir que a absorção da raiz exceda a dos microrganismos (KUZUYAKOV; XU, 2013).

Se a fertilização e a irrigação fornecem nutrientes e água em abundância, o crescimento radicular pode não acompanhar o da parte aérea (MIYAWAKI; MATSUMOTO-KITANO; KAKIMOTO, 2004; YI et al., 2010). O crescimento das raízes nestas condições, muita água e muitos nutrientes, torna-se limitado pela diminuição na relação auxina/citocinina na parte aérea causado pela rápida expressão do gene AtIPT3 induzido pelo nitrato da adubação (ÅGREN; FRANKLIN, 2003; DELLO IOIO et al., 2007; MIYAWAKI et al., 2006; SHIMIZU-SATO; TANAKA; MORI, 2009; SU; LIU; ZHANG, 2011). Assim, um sistema radicular relativamente pequeno passa a atender às necessidades nutricionais da planta inteira no solo adubado e irrigado, porém mantendo a planta com pouca ou nenhuma resistência a pequenos períodos de seca (PRIMAVESI, 1981).

Os aminoácidos, um dos nutrientes do solo segundo Okada (1987), constituem um grupo significativo de nitrogênio orgânico disponível em abundância e em muitos ecossistemas nativos onde as espécies de plantas exibem uma capacidade bem desenvolvida para absorvê-los (CHEN; XU, 2006; YU et al., 2002). No solo dos ecossistemas naturais o nitrogênio ocorre predominantemente como proteínas e aminoácidos os quais podem ser usados como fonte de nitrogênio e carbono sem a assistência de outros organismos. As raízes e os microrganismos lançam enzimas proteolíticas no solo para digerir as proteínas em aminoácidos na rizosfera e terem, assim, acesso às raízes e em seguida a toda planta (ASLAM; TRAVIS; RAINS, 2001; PADGETT; LEONARD, 1993). Nos solos europeus os teores de nitrogênio orgânico tendem a ser mais constantes do que os de nitrogênio inorgânico (MURPHY et al., 2000; WILLETT et al., 2004), já que está presente em quantidades maiores, e substanciais, que o nitrogênio inorgânico em todos os ecossistemas naturais e agrícolas da Europa (CHRISTOU et al., 2005). Os solos florestais têm o dobro de nitrogênio orgânico em relação ao nitrato, fazendo as plantas terem preferência pelos primeiros. Em ecossistemas não antropizados onde há pouco nitrato, a planta tem preferência pelos aminoácidos encontrados em abundância. Em solos arados e adubados é comum os teores de aminoácidos e proteínas serem ínfimos na solução do solo sendo nesses casos o nitrato, o nitrogênio inorgânico, o preferencial (ASLAM; TRAVIS; RAINS, 2001; CHRISTOU et al., 2005; PADGETT; LEONARD, 1996). A concentração do carbono orgânico em solos agrícolas está altamente correlacionada com a de nitrogênio orgânico (CHRISTOU et al., 2005). Em todos ecossistemas naturais há elevada disponibilidade no solo de nitrogênio orgânico e baixa oferta de nitrogênio inorgânico como nitrato e amônio (BARKER; PILBEAM, 2007). As concentrações de nitrogênio nos solos geralmente caem acentuadamente com a profundidade, ficando a maior parte do nitrogênio na camada superior

de 1,00 metro do solo onde ocorre o reciclo da matéria orgânica. Mais de 98% do nitrogênio nas camadas superficiais do solo está na forma orgânica da matéria orgânica. O nitrogênio inorgânico é geralmente inferior a 2% do nitrogênio total dos solos superficiais e sofre mudanças rápidas na composição e quantidade. O nitrogênio inorgânico varia muito com os tipos de solos, com o clima e com o tempo, e diminui com as chuvas que o movem para as profundezas do solo pela lixiviação, e ainda, a desnitrificação de nitrato e a volatilização do amônio redundam em perdas do nitrogênio inorgânico dos solos ou da solução do solo (BARKER; PILBEAM, 2007; MALAVOLTA, 1976). A fração de nitrogênio inorgânico no solo é de pequena magnitude e por isso insuficiente para nutrir os ecossistemas (BARKER; PILBEAM, 2007; CHAPIN; MOILANEN; KIELLAND, 1993; CHEN; XU, 2006; LEADLEY; REYNOLDS; CHAPIN III, 1997). A menos que seja fornecido por fertilizantes, o nitrogênio inorgânico no solo é derivado da matéria orgânica e perfaz menos de 2% (BARKER; PILBEAM, 2007). Isto indica que outras fontes de nitrogênio são importantes para a nutrição das plantas dos ecossistemas. As melhores estimativas das quantidades e fluxos de nitrato e amônio anuais não explicam totalmente o aumento e manutenção anual da biomassa de muitos ecossistemas (CHAPIN; MOILANEN; KIELLAND, 1993; CHEN; XU, 2006; LEADLEY; REYNOLDS; CHAPIN III, 1997). Há portanto, muitas evidências mostrando que as raízes das plantas, associadas ou não a fungos micorrízicos, podem efetivamente absorver pelo sistema radicular o nitrogênio orgânico na forma de aminoácidos, polipeptídios e proteínas (ABUZINADAH; READ, 1986a, 1986b; CHAPIN; MOILANEN; KIELLAND, 1993; HENRY; JEFFERIES, 2003; NÄSHOLM; HUSS-DANEL; HÖGBERG, 2000; NÄSHOLM; PERSSON, 2001; SVENNERSTAM et al., 2007) sem a necessidade de serem oxidados por microrganismos a nitrato ou amônio (JONES et al., 2004, 2005). A *Arabidopsis thaliana* selvagem tem o crescimento do sistema radicular e da parte aérea melhoradas quando a fonte de nitrogênio é o aminoácido glutamina (MERRILL; TANAKA; HANSON, 2002). Esses trabalhos põem em dúvida se o nitrogênio inorgânico é a fonte exclusiva de nitrogênio para as plantas como ocorre nos campos agrícolas adubados e nas bancadas dos laboratórios pelo mundo afora. Estudos de disponibilidade de nitrogênio para as plantas são baseados, principalmente, no volume e fluxos de nitrogênio inorgânico dos laboratórios, no entanto o nitrogênio orgânico é a forma mais comum desse elemento químico no solo. A conclusão de que o nitrogênio orgânico é uma fonte de nitrogênio potencialmente importante para plantas em muitos estudos, baseia-se na presença de muito aminoácidos livres no meio ambiente e a capacidade das raízes para absorve-los nas espécies de plantas de todos os ecossistemas terrestres, variando de tundra ártica a uma floresta húmida subtropical. O nitrogênio orgânico é

dominante na floresta boreal, em solos de cultura temperadas e em solo sob cana de açúcar em ecossistemas subtropicais. Os aminoácidos têm uma presença consistente nesses três solos, o que indica que o nitrogênio orgânico tem uma presença geral em solos com ambas as taxas de mineralização, lenta e alta (SCHMIDT; NÄSHOLM; RENTSCH, 2014). O nitrogênio orgânico do solo é proveniente da decomposição da matéria orgânica e dos exsudatos microbianos e radiculares. Desde a década de 40 do século passado sabe-se que as plantas têm a capacidade de absorver um largo espectro de aminoácidos (LIPSON; NÄSHOLM, 2001). Estudos mais recentes mostram que essa absorção ocorre através do carregamento efetuado por enzimas transportadoras da família AAP (Amino Acid Permease) ou pela LHT1 (Lysine histidine transporter1) localizadas nas células epidérmicas das raízes e radículas (BICK et al., 1998; CHEN; BUSH, 1997; HIRNER et al., 2006; TEGEDER; RENTSCH, 2010; VERSLUES; SHARMA, 2010). O gene LHT1 é um dos transportadores responsáveis por um amplo espectro de absorção de aminoácidos em tecido de raízes incluindo o apoplasto do córtex (HIRNER et al., 2006). A absorção dos aminoácidos via apoplasto parece usar um transportador entre o apoplasto do córtex e a endoderme cujas células têm a estria de Casparian que impede a continuidade do apoplasto. A partir da endoderme da raiz os aminoácidos seguem para o periciclo e em seguida alcançam o xilema e de lá toda a planta (LEE et al., 2007). Os níveis de aminoácidos livres nos solos são de 20 a 100 mM (20.000 a 100.000 μ M) (LIPSON; NÄSHOLM, 2001). Tendo a glutamina como exemplo, 20 a 100 mM correspondem a 2,92 a 14,61 g/L de solução do solo.

Os mecanismos de absorção de alta afinidade do gene LHT1 podem ajudar os vegetais a sobreviver em regiões de nitrogênio limitado pela intensa competição entre plantas e microrganismos de solo pelo nitrogênio orgânico. Os LHTs estão presentes não só em dicotiledôneas, mas também em espécies monocotiledôneas como o arroz (*Oryza sativa*) (LIU et al., 2005) e o lírio (*Lilium longiflorum*) (HIRNER et al., 2006).

A capacidade de aminoácidos individuais para regular a absorção de nitrato foi mostrada em células de milho (*Zea mays*) que exibiram uma preferência marcante pela absorção de aminoácidos sobre o nitrato quando ambos estavam presentes em meio de cultura. A adição de um aminoácido individual, 2 mM de glutamina ou glicina ou ácido aspártico ou arginina, ao meio de cultura com 1 mM de nitrato inibiu completamente a captação de nitrato (ASLAM; TRAVIS; RAINS, 2001; PADGETT; LEONARD, 1993, 1996). Essas condições, mais aminoácidos do que nitrato, só são encontradas em solos de ambientes naturais e jamais em solos adubados com nitrato. Portanto somente com o aumento dos teores de nitrato na rizosfera

conseguido com a adubação nitrogenada a planta irá absorvê-lo. Em ecossistemas naturais onde 98% do nitrogênio se encontra na forma orgânica e apenas 2% na forma inorgânica a planta terá preferência pela forma mais abundante, o nitrogênio orgânico que gasta menos energia para ser absorvido e assimilado.

A não ser que seja fornecida por fertilizantes produzidos pelo processo Haber–Bosch, a pequena fração de nitrogênio inorgânico no solo é derivada da matéria orgânica do solo. Na redução do nitrato a glutamato em todas as células vegetais vivas utiliza-se a energia captada na fotossíntese e liberada na respiração dos tecidos vegetais (TAIZ et al., 2015). Nas raízes, até 37% da energia respiratória pode ser utilizada na assimilação do nitrato a glutamato (BARKER; PILBEAM, 2007). Em termos energéticos, um mol de nitrato para ser absorvido via simplasto e assimilado como dois moles de glutamato gasta 155,2 kcal/mol, com o envolvimento de 4 enzimas: nitrato redutase, nitrito redutase, glutamina sintetase e glutamato sintase (BLOOM, 2015). Em *Arabidopsis thaliana* o nitrato, para ser transportado do meio externo para o interior da célula, gasta entre 76 a 106 kcal/mol ou 10 a 15 moles de ATP para apenas entrar no citoplasma, tendo o NRT1 como transportador. Portanto o gasto energético para a planta absorver e transformar 1 mol de nitrato em 2 moles de glutamato pode ficar entre 155,2 a 231,7-261,2 kcal/mol ou 32 a 36 moles de ATP (BLOOM, 2015; <http://opm.phar.umich.edu/classes.php?type=1>). A captação de nitrato é ativa e acoplada ao metabolismo (AMÂNCIO; STULEN, 2004), representando um desafio termodinâmico, pois sendo carregado negativamente ele tem de se mover contra o gradiente de potencial elétrico (CRAWFORD, 1995). Por esses motivos relacionados ao consumo de energia na captação e assimilação de nitrato, Persson e Näsholm (2002) sugerem que a forma de nitrogênio orgânica é a preferida pelas plantas porque consome menos energia na captação e na assimilação desse fundamental elemento químico (PERSSON; NÄSHOLM, 2002).

A absorção de um mol de glutamato do solo, na epiderme radicular e possivelmente no apoplasto do córtex da raiz, parece envolver apenas a enzima LHT1 (HIRNER et al., 2006; LEE et al., 2007; PAUNGFOO-LONHIENNE et al., 2008) para que esse aminoácido alcance o xilema. A captação de proteínas, peptídeos e aminoácidos depende em grande parte da presença de pelos radiculares nas plantas de *Hakea actites* e de *Arabidopsis thaliana*, espécies lenhosa e herbácea, respectivamente. As proteínas intactas e seus peptídeos foram encontradas nos apoplasto e nos citoplasmas das células do córtex das radículas dessas duas espécies (PAUNGFOO-LONHIENNE et al., 2008) e para que tal captura ocorra constantemente em campos agrícolas, as práticas agrícolas têm que ser aquelas que criam e mantêm a boa estrutura

do solo, para as radículas crescerem livremente em grandes volumes, e que criem e mantenham o reciclo contínuo da matéria orgânica.

Dois dos mais importantes cultivos para a humanidade, o milho (*Zea mays*) e o arroz (*Oryza sativa*), absorvem aminoácido em taxas comparáveis ou maiores que o nitrogênio inorgânico (JONES; DARRAH, 1994; LIPSON; NÄSHOLM, 2001; NÄSHOLM; KIELLAND; GANETEG, 2009). Plantas de cevada produzem mais grãos quando nutridas com os aminoácidos arginina e glutamina do que com nitrato ou amônio como fontes de nitrogênio (MA; AHUJA; BRUULSEMA, 2009). Conclui-se em função dos teores muito maiores de nitrogênio orgânico e muito menores de nitrogênio inorgânico nos solos, que as taxas de absorção de aminoácidos são provavelmente mais elevadas do que as de nitrato para a maioria das espécies de plantas estudadas (NÄSHOLM; KIELLAND; GANETEG, 2009).

As plantas que nos alimentam passaram cerca de 140 milhões de anos usando os aminoácidos como fonte de nitrogênio e carbono. A agricultura natural é o sistema de produção que usa apenas os nutrientes do solo para nutrir as plantas e por essa razão respeita as relações solo-planta-microrganismo estabelecidas nesse período de tempo ao defender práticas agrícolas que dispensam os nutrientes dos adubos.

2.3.1.7 Compostos fenólicos como proteção das plantas

Todos os métodos aplicados na agricultura natural geram plantas que não atraem, ou atraem muito pouco, as pragas e doenças e por isso não se usam caldas nem agrotóxicos para protegê-las. As plantas da agricultura natural são cultivadas em solos com menos nutrientes que nos solos adubados e assim têm mais defesas conferidas pelos compostos fenólicos (DIXON; PAIVA, 1995; TAIZ et al., 2015). Os flavonoides pertencem a uma grande e importante família de compostos fenólicos encontrados em tecidos de plantas, sendo os principais grupos os flavonóis, flavonas, isoflavonas e antocianinas. Os flavonoides são encontrados principalmente concentrados na epiderme superior das folhas e peles de frutas. A produção de flavonoides é induzida, entre outros estímulos ambientais, por baixos teores de nutrientes no solo, por patógenos e pela luz ultravioleta (UV) (STEWART et al., 2001). Em folhas de tomate (*Solanum lycopersicum*), antocianinas e o flavonol quercetina aumentaram de 2 a 3 vezes sob condições deficientes de nitrogênio, enquanto o total de outros flavonoides aumentou apenas 14% (BONGUE-BARTELSMAN; PHILLIPS, 1995). Em mudas de *Arabidopsis thaliana* e em tecidos de folhas e frutos de plantas de tomate comercial (*Solanum lycopersicum* cv. Chaser) é

observada uma relação inversa significativa entre a disponibilidade de nitrato e fósforo (KH_2PO_4) solúveis e o acúmulo de flavonoides (STEWART et al., 2001). As propriedades de absorção dos flavonoides e antocianinas na região da luz visível e do UV são responsáveis pelas cores das flores, importantes na orientação do nectário para o inseto fazer a polinização das plantas (LATTANZIO et al., 2006; SISA et al., 2010). Embora certos flavonoides sejam tóxicos para os insetos e outros organismos, talvez a principal defesa conferida por eles e por outros compostos fenólicos não seja através do contato direto dessas substâncias com os organismos antagônicos às plantas. O comprimento de onda na região do UV tem influência sobre comportamento dos insetos, tais como, orientação, navegação, localização do hospedeiro e alimentação. Muito embora os mecanismos exatos até agora sejam desconhecidos, os menores níveis de infestação de pragas podem ser resultantes da interferência sobre a interpretação visual e das respostas comportamentais dos insetos à luz UV absorvida pelas plantas (ANTIGNUS et al., 1996; DÍAZ; FERERES, 2007; HOROWITZ; ISHAAYA, 2004; MUTWIWA et al., 2005).

2.3.1.8 Qualidade nutricional

Foi confirmada a ausência de resíduos de pesticidas de 97% das amostras de alimentos orgânicos e confirmou-se um menor teor de nitrogênio em vegetais orgânicos em comparação com os convencionais (LAIRON, 2010). Tanto os resíduos de agrotóxicos quanto o maior teor de nitrogênio nos produtos convencionais são deletérios à saúde humana. Artigos publicados até 2012 não mostram diferenças nutricionais significativas entre os alimentos cultivados por esses sistemas de agricultura, porém relatam que os produtores e consumidores de produtos orgânicos podem ser menos expostos aos resíduos de agrotóxicos, aos altos teores de nitrogênio e às bactérias resistentes a antibióticos (DANGOUR et al., 2009; SMITH-SPANGLER et al., 2012). Levando-se em conta que a agricultura natural não utiliza defensivos, nem mesmo os permitidos na agricultura orgânica, pode-se supor que são alimentos sem contaminação alguma quando comparados com os das agriculturas orgânica e convencional (OKADA, 1987; PRIMAVESI, 2006).

2.3.1.9 Custos energéticos da agricultura natural *versus* os sistemas de produção orgânica e convencional

Baseados nos coeficientes técnicos para o plantio de 1 hectare de tomate convencional e orgânico no Espírito Santo pode-se constatar que a agricultura natural utiliza menos mão-de-obra (Tabela 3) muito embora as capinas sejam mais frequentes para que as ervas invasoras não produzam sementes e consome pouca energia por não usar todos os insumos das agriculturas adubadas (Tabela 4).

Tabela 3 – Cultivo de 1 hectare de tomate no estado do Espírito Santo.

Sistema de cultivo	Mão-de-obra
Convencional	557 d/H*
Orgânico com irrigação	458 d/H
Natural com irrigação	179 d/H
Natural sem irrigação	149 d/H

Fontes: Tomate (INCAPER, 2010) e Agricultura Orgânica (SOUZA, 2015). *dia/homem

Tabela 4 – Insumos utilizados pelos sistemas de cultivo convencional, orgânico e natural.

Insumos	Sistema de cultivo					
	Convencional		Orgânico		Natural	
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
3 t de calcário dolomítico	X			X		X
30 t de adubo orgânico		X	X			X
10 t de esterco de galinha	X			X		X
2 t de superfosfato simples	X			X		X
2,2 t de NPK 18-00-36	X			X		X
40 kg de micronutrientes	X			X		X
2 L de herbicida	X			X		X
24 L de Inseticida	X			X		X
70 kg de fungicida	X			X		X
12 L de espalhante adesivo	X			X		X
32.000 L de biofertilizantes		X	X			X
5 L de fosfito		X	X			X
2 kg de Dipel		X	X			X
6.400 L de calda bordalesa		X	X			X

Fonte: Agricultura Orgânica (SOUZA, 2015)

2.3.2 Agriculturas adubadas

A agricultura convencional usa a química dos laboratórios e agricultura orgânica usa química do quintal. Ambas produzem plantas com um rápido crescimento da parte aérea e totalmente dependentes desses aparatos químicos. Ambos os cultivos reproduzem o que não existe na Natureza: solos riquíssimos em nutrientes, principalmente o nitrogênio inorgânico (OKADA, 1987; PRIMAVESI, 2006). A agricultura orgânica utiliza matéria orgânica autóctone e alóctone para fazer seus adubos orgânicos. Neste método agrícola a decomposição aeróbica da matéria orgânica ocorre na compostagem e devido ao fácil e rápido aproveitamento das substâncias digeridas por outros microrganismos, o composto ao ser levado ao solo é rico quimicamente mas contém muito pouco do poder agregante dos ácidos poliurônicos necessários para se criar e manter uma boa estrutura do solo (KONONOVA, 1966; PRIMAVESI, 1981; SAINJU;

JABRO, 2014). Embora a agricultura orgânica seja menos agressiva para o meio ambiente e produza alimentos sem agrotóxicos, o seu *modus operandi* é o mesmo da agricultura convencional (CEGLIE; AMODIO; COLELLI, 2016). Ambas usam adubos no solo na tentativa de repor o que foi exportado para as plantas. As plantas adubadas passam a ser dependentes dos nutrientes do adubo que as deixarão superprodutivas e infestadas de pragas e doenças as quais serão eliminadas pelos agrotóxicos ou por caldas que invariavelmente deixarão seus resíduos nos produtos agrícolas que chegam à nossa mesa (OKADA, 1987; PRIMAVESI, 2006).

2.3.2.1 Agricultura orgânica

No Brasil a agricultura familiar e a agricultura orgânica são muito próximas, uma vez que cerca de 90% da produção orgânica no país é proveniente da agricultura familiar. A agricultura orgânica é um sistema produtivo que visa a sustentação autônoma da propriedade agrícola no tempo e no espaço, a maximização dos benefícios sociais para o agricultor, a minimização da dependência de energias não renováveis na produção, a oferta de produtos saudáveis e de elevado valor nutricional, isentos de qualquer tipo de contaminantes que ponham em risco a saúde do consumidor, do agricultor e do meio ambiente, o respeito à integridade cultural dos agricultores e a preservação da saúde ambiental e humana. O *modus operandi* da agricultura orgânica de base familiar inquire as repercussões negativas do sistema de produção convencional ao torna-se uma ferramenta de promoção dos valores sociais, ambientais e da qualidade de vida no meio rural (AZEVEDO; SCHMIDT; KARAM, 2011).

A “agricultura orgânica de substituição” segundo Primavesi (2008) ou “agricultura orgânica convencionalizada” segundo autores americanos não podem ser confundidas com a agricultura orgânica normalmente de base familiar que tem o solo como um ente vivo e ativo na produção de alimentos. Se as comparações entre os sistemas orgânicos e convencionais implementarem as mesmas práticas e conceitos agrônômicos e apenas variarem no tipo de nutriente ou de pesticida, esta não seria uma comparação de sistema orgânico *versus* convencional, mas uma comparação de insumos orgânicos *versus* convencionais (CEGLIE; AMODIO; COLELLI, 2016). Não basta substituir os insumos da agricultura convencional por insumos orgânicos para denominar esse método de orgânico, é necessário mais que isso, é necessário passar a ter o solo como parte da planta e não apenas um ancoradouro inerte. Mesmo com uso de caldas de baixa toxicidade os produtos orgânicos ainda são melhores que os da agricultura convencional. Um estudo feito pela Universidade Estadual de Washington, EUA, mostrou que a agricultura

orgânica pode alimentar de maneira eficiente toda a população mundial. O relatório mostra que com este sistema de produção é possível ter rendimentos suficientes para os consumidores, ao mesmo tempo em que melhora as condições ambientais e dos trabalhadores rurais (REGANOLD; WACHTER, 2016).

A agricultura orgânica por substituição de insumos, de acordo com Primavesi (2008), trabalha com grandes dosagens de compostos orgânicos e esterco com base na crença de que esses materiais sempre melhoram o solo e nutrem as plantas. Trabalha com arações profundas, revirando o solo até uma profundidade de 45 cm, trazendo para a superfície as camadas do solo que se desagregam facilmente sob o impacto da água das chuvas ou da irrigação. Uma agricultura limitada unicamente à lógica da substituição dos insumos químicos por orgânicos terá o solo arado e compactado, adubação frequente, aplicação de caldas e irrigação constante (PRIMAVESI, 2008).

Quando a agricultura orgânica não é de base familiar, ou seja, quando a agricultura orgânica não é baseada em princípios ecológicos, e sim na mera substituição dos insumos químicos por insumos orgânicos (PRIMAVESI, 2008), o uso de caldas permitidas por lei será frequente, o que poderá comprometer a pureza esperada dos alimentos orgânicos. Nesse caso, sua base é o uso intensivo de esterco, de irrigação e do tratamento convencional do solo com arações pesadas e com aportes energéticos inviáveis à redução dos custos. Além disso, sua produtividade é, em geral, baixa, fazendo com que dependa de mercados que remunerem com um preço acrescido para que seja viável economicamente para o agricultor. Por essa razão, trata-se de uma produção de luxo e não acessível a todos (PRIMAVESI, 2008).

2.3.2.2 Agricultura convencional

O sistema agrícola predominante no mundo, chamado de agricultura convencional, agricultura moderna, ou agricultura industrial, tem produzido enormes ganhos de produtividade e eficiência financeira. A produção mundial de alimentos aumentou nos últimos 50 anos. O Banco Mundial estima que entre 70% e 90% dos recentes aumentos na produção de alimentos são o resultado do aumento da produtividade da agricultura convencional e não de uma maior área cultivada. Os sistemas agrícolas convencionais variam de exploração para exploração e de país para país. No entanto, eles compartilham muitas características: rápida inovação tecnológica; grandes investimentos de capital para aplicar tecnologia de produção e gestão; grandes fazendas; grandes monoculturas, plantadas em linhas e cultivadas continuamente ao longo de muitas

estações; culturas híbridas uniformes de alto rendimento; uso extensivo de pesticidas, herbicidas, fertilizantes e aportes de energia externa; alta eficiência da mão-de-obra; e dependente da relação comercial e industrial que envolve a cadeia produtiva convencional da agropecuária (<http://afsic.nal.usda.gov/sustainable-agriculture-definitions-and-terms-1>).

Os sistemas de cultivos convencional não têm o solo como um organismo vivo. Funcionam praticamente como um cultivo hidropônico ao ar livre, no qual o solo exerce apenas a função de suporte físico para as plantas, não sendo reconhecido como um meio de cultura físico-químico-biológico. No sistema de manejo convencional, o solo é considerado somente como suporte físico para as plantas. Os manejos, que assim consideram o solo, promovem o uso de calagem, aração e adubação, práticas que o deixam duro, impedindo, assim, o livre crescimento das raízes e a entrada e armazenamento das águas das chuvas e das irrigações (PRIMAVESI, 1981, 2008; SANTOS 2016). Os métodos da agricultura convencional, em geral, não privilegiam o reciclo da matéria orgânica. Com a redução dos teores de matéria orgânica do solo, a maior parte da vida microbiana não sobrevive, pois fica sem alimento e sem água. Sem a ação da matéria orgânica e dos microrganismos, o solo desagrega, compacta e endurece. Assim, sua capacidade de produção fica cada vez mais dependente do pacote químico da agricultura convencional. A agricultura convencional usa nutrientes de imediata disponibilidade para as plantas e em maior volume o nitrogênio inorgânico solúvel (nitrato e amônio) que tem o potencial de influenciar negativamente a síntese de muitos compostos secundários de plantas destinados à defesa contra pragas e doenças. Os fungicidas e a adubação nitrogenada da agricultura convencional afetam a biodiversidade da comunidade microbiana do solo. O enriquecimento ou a perda de algumas espécies de microrganismos podem ocorrer nos solos contaminados por fertilizantes, assim como as sequências de DNA de comunidades microbianas podem ser alteradas nos solos poluídos por pesticidas e adubos (BOWLES et al., 2014; JAAP; HOPKINS; BENEDETTI, 2006; JIAN et al., 2000; YANG et al., 2000).

A adubação química, por mais completa que seja, nunca consegue manter a produtividade do solo sem que exista o retorno mínimo e sistemático da matéria orgânica. A estrutura do solo é criada a partir da decomposição da matéria orgânica e é denominada como bioestrutura em função da intensa atividade de microrganismos para criá-la. Passados 3 a 4 meses do preparo do solo na agricultura convencional, a bioestrutura começa a decair devido ao reciclo da matéria orgânica nesse método agrícola ser mínimo. A manutenção dessa bioestrutura necessita da constante decomposição de matéria orgânica (PRIMAVESI, 1981, 2008; SANTOS 2016). A bioestrutura do solo tem menos ácidos poliurônicos sob manejo convencional, com fertilizantes

químicos, do que a bioestrutura dos solos manejados sem esses adubos (KIEM; KÖGEL-KNABNER, 2003). A adubação química tem influência negativa na resistência das plantas à seca. Os mutantes de *Arabidopsis thaliana* que assimilam muito pouco nitrato, em função da deficiência da atividade da nitrato redutase nas folhas, apresentam hipersensibilidade ao ácido abscísico e, conseqüentemente, o fechamento estomático se torna mais rápido sob estresse hídrico, o que deixa a planta mais tolerante à seca (LOZANO-JUSTE; LEÓN, 2010).

O sistema de cultivo convencional faz uso intensivo de adubos e agrotóxicos de tal forma que uniformiza o ambiente e possibilita que as técnicas de produção sejam as mesmas em diferentes ecossistemas, sem considerar a peculiaridade de cada situação. Assim sendo, o sistema de cultivo convencional compromete a qualidade do alimento, do meio ambiente e da saúde de todos que direta ou indiretamente estejam envolvidos com a agricultura convencional. (PRIMAVESI, 1981).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do adubo na agricultura.

Avaliar a adaptação de variedades comerciais de tomate ao sistema de produção da agricultura natural e determinar as diferenças de produtividade entre os tomateiros T15 e T0.

Determinar as diferenças moleculares entre raízes e folhas dos tomateiros T15 e T0 para caracterizar as diferenças na produtividade e defesa contra pragas e doenças.

Determinar as diferenças químicas entre as folhas dos tomateiros T15 e T0 para caracterizar modificações na defesa dos tomateiros.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a influência das perdas causadas por pragas e doenças na produtividade de quatro tratamentos conduzidos em campo experimental.

Detectar e quantificar a expressão dos genes PAL, LHT1, AAP2, NRT1, NRT2 e NR dos tomateiros nos tratamentos NF-T15, NF-T0, OF-T0 e OF-T15.

Detectar compostos secundários nos frutos e folhas dos tratamentos NF-T15, NF-T0, OF-T0 e OF-T15.

4 CAPÍTULO 1

PRODUTIVIDADE DOS TOMATEIROS ‘ESPECIAL PARA SALADA’ CULTIVADOS NOS SISTEMAS DE PRODUÇÃO DAS AGRICULTURAS NATURAL ORGÂNICA

RESUMO

Descobrir por que as plantas cultivadas diminuem a sua produtividade, por ficarem doentes, é uma preocupação constante de produtores e pesquisadores. Este trabalho teve como objetivo medir a produtividade de tomateiros cultivados sob as condições de manejo da agricultura natural (NF), que não utiliza nenhum tipo de adubos, e da agricultura orgânica (OF) que foi adubada com 22,42 t/ha de adubo orgânico produzido pela Fazenda de Agricultura Orgânica da West Virginia University-OAFWVU (EUA). A produtividade foi determinada por tomates comercializáveis, sadios e de ótima aparência. As perdas foram consideradas nos frutos com alguma lesão causada por pragas e/ou doenças. Foi determinado o tempo de prateleira, a perda de peso, os teores de lignina e a matéria seca dos frutos para que os resultados fossem correlacionados com lesões de pragas e doenças que normalmente ocorrem na região de Morgantown na West Virginia, EUA. Foram utilizadas as sementes T0 da variedade comercial ‘Especial para Salada’ da Topseed® e T15 selecionadas da mesma variedade cultivada 15 vezes com o manejo da agricultura natural entre os anos de 2004 e 2015. No campo da OAFWVU este experimento foi dividido em dois tratamentos de agricultura natural NF-T15, NF-T0 e dois de agricultura orgânica com adubo orgânico OF-T0 e OF-T15, no delineamento experimental de blocos casualizados com 5 repetições e 5 plantas por repetição para a determinação da produtividade. O tempo de prateleira dos frutos foi significativamente maior na agricultura natural. Os frutos de T15 em ambos os cultivos tiveram os maiores teores de matéria seca. Os tomateiros NF-T15 e NF-T0 produziram 31,00 e 41,04 t/ha, perderam 1,83 e 3,34 t/ha e tiveram a produtividade de 29,18 e 37,70 t/ha respectivamente. Os tomateiros OF-T0 e OF-T15 produziram 43,08 e 34,90 t/ha, perdas de 16,44 e 9,42 t/ha e tiveram a produtividade de 26,65 e 25,37 t/ha, respectivamente. Os mecanismos de defesa de NF-T15, que teve as menores perdas, podem estar relacionados aos menores teores de lignina nos frutos (6%) e às menores perdas de água dos frutos. A produtividade de T0 mostrou que estas plantas se adaptaram à agricultura natural no primeiro plantio. A adubação orgânica influenciou negativamente na produtividade dos tratamentos OF-T0 e OF-T15.

Palavras-chave: agricultura natural · tomate · adubo orgânico · produtividade

4.1 INTRODUÇÃO

A agricultura natural é um sistema de produção agrícola não adubado em que os manejos dos solos e das sementes são o cerne de todo o cultivo, enquanto que na agricultura orgânica a prática cultural de maior importância é o uso dos adubos orgânicos. As principais vantagens da agricultura natural para o agricultor é o seu baixo custo de produção quando comparado com o da agricultura orgânica. Para o consumidor a melhor vantagem encontra-se na qualidade das frutas, legumes, verduras e cereais livres dos produtos permitidos pela legislação, mas que têm alguma toxicidade quando usados para o combate eficiente de pragas e doenças comuns na agricultura orgânica.

As variedades comerciais de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) são extremamente produtivas podendo produzir de 70 a 80 t/ha com aporte de insumos químicos e irrigação. De acordo com a Topseed®, o tomate ‘Especial para Salada’ tem boa produtividade e é de polinização aberta cujas plantas e frutos são idênticos aos seus pais. Esta variedade é um tomate de genética americana, proveniente de uma seleção melhorada de um *Beefsteak* indeterminado, em que se buscou vários atributos de interesse do mercado brasileiro (informação enviada por e-mail pela Topseed® em 17 de junho de 2014)

Este capítulo apresenta um estudo comparativo entre a produtividade de dois sistemas de cultivo com e sem adubação orgânica sobre um mesmo genótipo de tomate comercial, cujas sementes T15 são oriundas de tomateiros da agricultura natural e T0 de plantas cultivadas pela Topseed® por meio da agricultura química. As diferenças entre os tratamentos foram estabelecidas através do estudo da produtividade, das perdas por lesões ocasionadas por pragas e doenças, do tempo de prateleira, da perda de peso dos frutos, de massa seca de frutos e folhas e por fim dos teores de lignina nas folhas e frutos.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo geral

Analisar a produtividade dos tomateiros T15 e T0 quando cultivados sob as condições de manejo da agricultura natural e da agricultura orgânica.

4.2.2 Objetivos específicos

Avaliar a influência das perdas por lesões nos frutos, causadas por pragas e doenças, na produtividade dos tomateiros T15 e T0 cultivados nos sistemas de produção da agricultura natural e da agricultura orgânica.

Avaliar a adaptação dos tomateiros T0 ao primeiro cultivo sob as técnicas da agricultura natural.

Comparar o tempo de prateleira dos tomates T15 e T0 produzidos nos sistemas de cultivos natural e orgânico.

Avaliar a perda de peso dos frutos dos tomateiros T15 e T0.

Quantificar os teores de lignina e de massa seca das folhas e dos frutos das plantas T15 e T0.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Origem da variedade ‘Especial para SaladaT15’ ou variedade ‘Terezas’ (2004-2015)

Foram realizados, entre 2004 e 2015, quinze plantios dos tomateiros ‘Especial para Salada’ nos municípios, do Estado do Espírito Santo, de Vila Velha, Rio Bananal, Viana e de Marechal Floriano, sempre com as técnicas de agricultura natural. Os tomateiros cultivados com os métodos da agricultura natural apresentaram genótipo diferente da variedade comercial ‘Especial para Salada’ que lhes originou em 2004, pois ao longo desses onze anos ficaram mais resistentes a pragas e doenças sendo por isso chamada de cultivar ‘Especial para SaladaT15’ ou cultivar ‘Terezas’ em homenagem à Tereza Giuberti e à Tereza Sobreiro. As sementes do último plantio foram nomeadas de T15 para avaliação nesse trabalho.

4.3.2 Seleção das variedades

Em maio e agosto de 2004 foram plantados seguindo as técnicas da agricultura natural sete variedades de tomate - ‘Santa Cruz Kada’ (A); ‘Super Marmande’ (B); ‘Santa Cruz Kada Gigante’ (C); ‘Especial para Salada’ (D); ‘Gaúcho’ (E); ‘Gaúcho’ (F); ‘Santa Cruz Kada Gigante’ (G) em uma área cujo solo estava há 6 meses em pousio após três anos de plantios sucessivos de alface (*Lactuca sativa*) adubada com esterco de porco e adubos químicos. O primeiro plantio, assim que as plantas entraram na fase reprodutiva, foi totalmente perdido por infestação da doença fúngica requeima causada por *Phytophthora infestans*.

No terceiro plantio foram plantadas as variedades B, D, E e F que se mostraram as mais produtivas no segundo plantio e também por serem as preferidas do mercado consumidor da Grande Vitória. No quarto e quinto plantios foram plantadas as variedades ‘Gaúcho’ e ‘Especial para Salada’ que foram as mais vigorosas e mais produtivas no terceiro plantio do cultivo natural. A partir do sexto plantio feito em 14 abril de 2006, apenas a variedade comercial ‘Especial para Salada’, por ter sido a mais produtiva, foi plantada sempre em áreas livres de plantios simultâneos de outras variedades de tomates até a data de fevereiro de 2015. Em Morgantown o atual experimento foi conduzido na Fazenda Orgânica da West Virginia University-WVUOAF onde havia inúmeras variedades de tomate.

Foram feitos com os métodos da agricultura natural onze plantios do tomate ‘Especial para Salada’ no período de 6 anos: de 17 de maio de 2004 a agosto de 2009 sempre nos mesmos canteiros em solos não arados, no município de Vila Velha-ES; dois plantios nos mesmos talhões em Rio Bananal-ES de maio a dezembro de 2011; um plantio em Viana-ES de setembro de 2013 a fevereiro de 2014; um cultivo em Marechal Floriano-ES de setembro de 2014 a fevereiro de 2015 e, por fim, um plantio nos Estados Unidos em Morgantown, no estado da West Virginia, na WVUOAF, de 26 de maio a 22 de setembro de 2015. Todas as sementes do tomate ‘Especial para Salada’ utilizadas a partir do segundo plantio foram as produzidas nos cultivos anteriores com as técnicas de agricultura natural. As sementes eram obtidas dos frutos maiores e mais saudáveis depois de colhidos, sem o controle do vigor e da sanidade da planta que lhes deu origem. Na WVUOAF foram produzidas as sementes T16 e T1 provenientes das plantas mais produtivas e saudáveis das parcelas da agricultura natural.

4.3.3 Cultivos nos sistemas de agriculturas Natural e orgânica na WVUOAF

4.3.3.1 Solos

A área onde estão os talhões *low input* e *high input* na WVUOAF (Figura 2) (APÊNDICE A) tem 0,81 ha com solos da série Tilsit (Typic Fragiudult) e Dormont (Ultic Hapludalf). Estes solos são sedimentares constituídos de 40% de areia, 40% de silte e 20% de argila, de fertilidade natural moderada, apresentam boa drenagem e com declives de 3 a 8% (WRIGHT et al., 1982).

As análises químicas dos solos onde foram instalados os experimentos se encontram nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Análises dos solos do sistema de cultivo da agricultura natural

Resultados das análises do Laboratório de Solos da WVU					
P ₂ O ₅ (kg/ha)		244,35			Muito alto
K ₂ O (kg/ha)		733,04			Muito alto
Ca (kg/ha)		3801,92			Alto
Mg (kg/ha)		330,65			Alto
pH do solo		6.2			Necessidade de calagem 2 t/ha
Nutrientes	K	Ca	Mg	H	Total
cmolc/kg	1	8	1	2	12 (K+Ca+Mg+H)
%sat	7	69	10	15	87 (K+Ca+Mg)

Tabela 6 - Análises dos solos do sistema de cultivo da agricultura orgânica, ou seja, solos do talhão *low input* após a aplicação de 22,42 t/ha de adubo orgânico da WVUOAF.

Resultados das análises do Laboratório de Solos da WVU					
P ₂ O ₅ (kg/ha)		1.380,88			Muito alto
K ₂ O (kg/ha)		1.670,07			Muito alto
Ca (kg/ha)		5.822,82			Muito alto
Mg (kg/ha)		876,50			Muito alto
pH do solo		6.5			Necessidade de calagem 0 t/ha
Nutrientes	K	Ca	Mg	H	Total
cmolc/kg	2	13	3	1	19 (K+Ca+Mg+H)
%sat	11	69	18	5	97 (K+Ca+Mg)

A análise do adubo orgânico aplicado durante 15 anos de experimentos nas parcelas de *high input* da WVUOAF quantificou os teores de nitrogênio (N), fósforo (P₂O₅), potássio (K₂O), cobre (Cu), cálcio (Ca) e magnésio (Mg). Os teores são médias de 15 análises feitas ao longo de um período de 15 anos e são expressas em porcentagem de matéria seca. Na taxa de aplicação de 22,42 t/ha fornece aproximadamente 146,48 kg/ha de nutrientes dos quais 35,7% estão imediatamente disponíveis para as plantas quando incorporados ao solo de acordo com o Laboratório do Departamento de Agricultura da West Virginia que realizou a análise. Os desvios padrões (DP) são mostrados na tabela 7.

Tabela 7 – Análises química do composto orgânico usado na WVUOAF

Nutriente (% da matéria seca)									
	N	N	N	P	K	Cu	Ca	Mg	pH
	NKT ^a	Disponível	Amônio	(P ₂ O ₅)	(K ₂ O)				
Disponível	0,66	0,21	0,05	0,60	0,68	0,0018	2,08	0,22	8,2
DP	0,19	0,07	0,01	0,20	0,24	0,0006	1,89	0,07	0,5

^a NKT = Nitrogênio total Kjeldahl.

4.3.3.2 Distribuição espacial das parcelas experimentais

A semeadura dos tomateiros T15 e T0 foi feita em sementeiras na WVUOAF (Figura 2) em 26 de maio de 2015 e as mudas transferidas após um mês para os canteiros definitivos.



Figura 2 – Campo experimental na Fazenda de Agricultura Orgânica da West Virginia University – WVUOAF é dividido em talhão *low input*, na região superior desta figura, com poucos e grandes canteiros, e talhão *high input* com muitos e pequenos canteiros localizados na área inferior da foto aérea. O retângulo de linhas brancas delimita a local onde foram cultivados os quatro tratamentos deste experimento na área *low input*.

A área total do experimento foi de 132,30 m² (APÊNDICE B). As parcelas experimentais da agricultura natural e da agricultura orgânica tinham 66,15 m² (4,90 m x 13,50 m) cada uma. Em cada parcela experimental de 36,25 m² foram plantadas 25 mudas T15 e 25 mudas T0, todas no espaçamento de 1,30 x 0,55 m. Havia nas bordaduras do experimento da agricultura natural 58 plantas T15 em 29,90 m². As bordaduras da parcela experimental da agricultura orgânica tinham 27 plantas T15 e 27 plantas T0 em 29,90 m². Os quatro tratamentos estudados foram:

- 1.NF-T15 sementes da agricultura natural cultivadas no sistema de produção da agricultura natural;
- 2.NF-T0 sementes da Topseed[®] cultivadas no sistema de produção da agricultura natural;
- 3.OF-T0 sementes da Topseed[®] cultivadas no sistema de produção da agricultura orgânica;
- 4.OF-T15 sementes da agricultura natural cultivadas no sistema de produção da agricultura orgânica.

4.3.3.3 Agricultura natural

Após o degelo da neve que se acumulou sobre o solo foi feita uma gradagem superficial com cerca de 10 cm de profundidade nas áreas de experimentos de *low* e *high inputs* da WVUOAF. O mato cresceu rapidamente e por isso dez dias depois foi feita mais uma aração nos mesmos moldes da primeira. Entre os manejos de solo adotados desde o ano 1998 pela WVUOAF estão incluídas araões superficiais e constantes roçagens. Os canteiros da agricultura natural foram feitos na área de *low input*, anulando dessa forma a influência das adubações orgânicas feitas rotineiramente desde o ano de 1998 na área *high input*. Em 2015 a área de *low input* havia 6 anos que não recebia adubação orgânica e de 2000 a 2009 essa área fora adubada apenas 5 vezes. A área *low input* não conta com sistemas de irrigação e as pulverizações com caldas usadas na agricultura orgânica são evitadas ao máximo.

Os canteiros de semeadura da agricultura natural receberam as sementes T15 e T0 sem que nada fosse aplicado ao solo. As sementeiras eram molhadas com regador uma vez ao dia, pois não havia irrigação na área do *low input*. As mudas saudáveis foram levadas ao campo um mês após a semeadura. Não houve substituição de nenhuma planta nos canteiros definitivos. Durante o cultivo foram feitas cinco capinas.

4.3.3.4 Agricultura orgânica

Os canteiros da agricultura orgânica foram adubados com 22,42 t/ha de composto orgânico produzido e usado na WVUOAF em 2015 nas áreas de *high input*. Os canteiros da agricultura orgânica do experimento foram feitos na área de *low input*, para que não houvesse influência das adubações orgânicas feitas sistematicamente desde o ano de 2000 na área *high input*. A área de *low input* apresentava as condições ideais para a implantação do experimento da agricultura natural e da agricultura orgânica que foi influenciada apenas por uma única adubação orgânica e pela não aplicação de caldas defensivas.

O canteiro de semeadura da agricultura orgânica foi adubado na mesma proporção da área experimental para que as sementes T0 e T15 fossem semeadas. As irrigações eram feitas com regador uma vez ao dia, os experimentos feitos nessa área não eram irrigados. As mudas foram levadas ao campo um mês após a semeadura. As mudas saudáveis foram as selecionadas para o plantio definitivo. Apenas duas plantas mortas por doenças foram substituídas nos canteiros definitivos.

4.3.3.5 Produtividade

Apenas os frutos saudáveis e sem lesões foram considerados para que a produtividade fosse aferida. Cada uma das 100 plantas estudadas tinha um número anotado em bandeiras azuis e laranjas fixadas ao lado de cada planta, T15 e T0, respectivamente (Figura 3). A cada colheita o peso e a condição de cada fruto, saudável ou lesionado, eram anotados em uma tabela cujos números correspondiam aos das bandeiras fincadas em cada um dos tomateiros. Os frutos eram considerados saudáveis quando se apresentavam sem manchas ou outras imperfeições.



Figura 3 – Parcela experimental da agricultura natural, bandeiras azuis representam tomateiros T15, bandeiras laranjas indicam tomateiros T0 e plantas sem bandeiras são as bordaduras.

4.3.3.6 Produção de sementes para o próximo cultivo

Todos os frutos saudáveis da agricultura natural foram mantidos na temperatura ambiente de 22°C para que ao final da coleta de dados fossem eleitas as plantas que melhor produziram para fornecerem as sementes T16 e T1.

4.3.4 Tempo de prateleira e perda de peso dos frutos

Todos os tomates foram colhidos em 11 de setembro de 2015 no estágio verde maduro (Figura 4) com tamanhos muito semelhantes dentro de cada tratamento. Foram mantidos no laboratório de pós-colheita da WVU sob 22°C constantes. O experimento durou 29 dias, de 11 de setembro a 9 de outubro de 2015.



Figura 4 – Escala de maturação de tomates. Da esquerda para direita: Verde maduro, Pintado, Rosado, Vermelho, Vermelho maduro e Vermelho passado (FERREIRA, 2004).

Os tomates usados para a avaliação do tempo de prateleira foram pesados todos os dias durante os 29 dias em que durou o experimento. A diferença entre os pesos do dia 11 de setembro e do dia 7 de outubro foram os aproveitados para se avaliar a perda de peso dos frutos em porcentagem. A perda de peso foi aferida quando os frutos se encontravam entre verde maduro e vermelho maduro, estágios em que os tomates se mantêm em condições de serem comprados nas gôndolas dos supermercados.

4.3.5 Massa seca e teores de lignina nos frutos e nas folhas

Amostras de folhas e frutos foram secas no Laboratório de Genética de Plantas da WVU. As amostras foram submetidas à temperatura de 65°C em estufa durante 6 e 10 dias, respectivamente, até ter sido atingido o peso constante das amostras. Os tomates nos estágios de maturação rosado e vermelho, previamente pesados, foram para a estufa a 65°C do dia 29 de outubro a 4 de novembro de 2015. As folhas foram colhidas e pesadas em 24 de agosto e mantidas na estufa a 65°C. A diferença entre os pesos fresco e seco determinou a porcentagem de matéria seca dos frutos e das folhas.

Para extração de lignina das folhas e dos frutos pesou-se aproximadamente 1 g da amostra numa pequena proveta, em seguida se adicionou suavemente 15 mL de H₂SO₄ frio a 72% misturando-o com a amostra. As amostras foram colocadas em banho-maria a uma temperatura de 20 °C durante duas horas com agitação intermitente a cada 10 minutos. Após à digestão pelo ácido, as amostras foram transferidas para um balão Erlenmeyer e diluídas para 3% de H₂SO₄ por adição de 560 mL de água deionizada. Os frascos foram parcialmente cobertos com papel alumínio e autoclavados durante 20 minutos. As amostras foram arrefecidas e filtradas através de cadinhos filtrantes de vidro previamente pesados. Os cadinhos com o seu conteúdo foram secos a 105°C durante duas horas. As amostras foram removidas e colocadas em um dessecador

para esfriar e não absorver água. O peso do cadinho e do resíduo seco foram registados com uma aproximação de 0,1 mg. A diferença de peso entre o cadinho vazio e o cadinho com a amostra é expressa em percentagem para se obter a lignina insolúvel em ácido ou lignina Klason. (HATFIELD; FUKUSHIMA, 2005)

4.3.6 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi em blocos casualizados no esquema fatorial 2 x 2 – dois métodos de cultivo (natural e orgânico) e duas sementes, T15 e T0 da variedade comercial ‘Especial para Salada’ – de acordo com o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + K_j + CK_{ij} + B_k + e_{ijk} \quad (1)$$

em que:

y_{ijk} = valor observado no k-ésimo bloco, avaliado dentro da j-ésima cultivar na i-ésima variedade;

μ = média geral;

C_i - efeito do i-ésimo sistema de cultivo;

K_j - efeito do j-ésima cultivar;

CK_{ij} - efeito da interação entre o i-ésimo cultivo e j-ésima cultivar;

B_k - efeito do k-ésimo bloco;

e_{ijk} - erro experimental onde $e \sim N(0, \sigma^2)$.

As variáveis mensuradas foram submetidas a uma análise de variância (ANOVA). No caso de interação significativa entre sistema de cultivo e cultivar, pelo teste F, para uma determinada característica, foi realizado o teste de Tukey ($P < 0,05$) para comparação de médias, considerando os desdobramentos de cultivos dentro do tipo de semente, bem como, o tipo de semente dentro de cultivo.

Os resultados foram obtidos com o uso do programa estatístico ASSISTAT Versão 7.7.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Produtividade e produtividade total

A colheita durou 33 dias, de 22 de agosto a 23 de setembro de 2015. Os frutos foram colhidos nos estágios pintado, rosado e vermelhos (Figura 4). Com os dados de produtividade de cada planta de tomate da parcela experimental da agricultura natural foram selecionados os tomateiros T15 e T0 (Figura 3) saudáveis e mais produtivos para a produção de sementes T16 e T1. A produtividade (Figura 5) foi avaliada com os frutos perfeitos para a comercialização, não se levando em conta os frutos lesionados por pragas ou doenças. A produtividade total foi o resultado do somatório da produtividade com as perdas por hectare de cada um dos tratamentos.

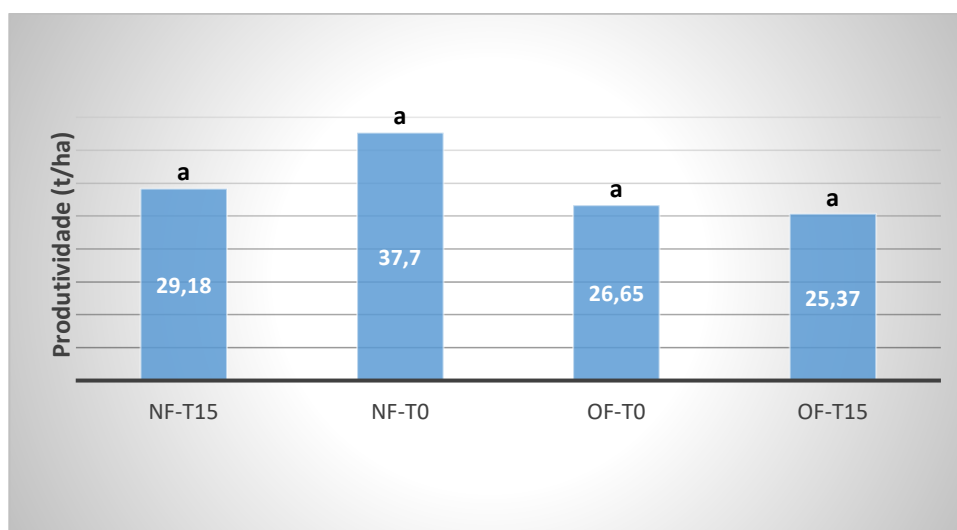


Figura 5 – Produtividade, frutos comercializáveis por hectare dos quatro tratamentos.

NF – agricultura natural, OF – agricultura orgânica, T15 – semente da agricultura natural e T0 – semente da Topseed®.

Médias nos tratamentos com a mesma letra não são diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os resultados obtidos na WVU mostram a influência do tipo de cultivo nas plantas que geraram as sementes T15 e T0 e do tipo de cultivo a que elas foram submetidas nas terras americanas. Os tomateiros T15 e T0 cultivados na agricultura natural (Figura 6) foram os menos infestados de pragas e doenças, e por isso perderam 5,90% e 8,14% da produtividade total, respectivamente. Embora não tenha havido diferenças estatísticas significativas entre a produtividade dos quatro tratamentos (Figura 5), as plantas da agricultura natural foram as que tiveram as menores perdas por doenças ou pragas, levando-as a ter as melhores produtividades

e mostrando que a ausência de adubos diminuiu as incidências de pragas e de doenças tanto em T15 quanto em T0. Na agricultura natural a produtividade de T0 foi melhor que a de T15 e esse fato mostra que nas condições em que foi feito o experimento, o sistema de produção da agricultura natural foi mais importante que a origem das sementes.

Os tomateiros OF-T15 e OF-T0 tiveram as maiores perdas em relação produtividade total, 27,28% e 38,16%, respectivamente (Figura 6). Os resultados do experimento (Figura 6) mostram que o sistema de cultivo foi mais importante que a origem das sementes para conferir maior defesa às plantas e consequentemente menores perdas na produtividade total. As sementes T0 aparentemente carregaram um potencial genético de grande produtividade que se perdeu ao longo da produção das sementes T15, no entanto as sementes T15 têm defesas que se estabeleceram tanto nos canteiros da agricultura natural quanto nos da agricultura orgânica. As perdas de T15 são menores quando comparadas com as de T0 no mesmo sistema de cultivo.

Quando se compararam os dados dos dois métodos de cultivo, não houve diferenças significativas entre a produtividade total (Figura 7) da agricultura natural e da agricultura orgânicas. As plantas da agricultura orgânica produziram muito, mas perderam muitos frutos por pragas e doenças (Figura 7) e por isso a produtividade da agricultura natural foi significativamente maior que a produtividade da agricultura orgânica (Figura 7). De acordo com Fess, Kotcon e Benedito (2011), o método agrícola ideal é aquele que consegue cultivares com o máximo de produtividade com o menor consumo de energia possível. Esta vantagem comparativa foi alcançada pela agricultura natural neste experimento.

Os 15 plantios das sementes do tomate ‘Especial para Salada’ no sistema de cultivo da agricultura natural parecem ter especializado as plantas na defesa de pragas e doenças e estacionado a produtividade entre 29 t/ha. Esta estabilidade pode ser atribuída a dois fatos: os tomates dessa variedade produzem no máximo essa quantidade em sistemas de cultivo sem adubos ou a forma de seleção dos frutos, que geraram as sementes até o 15º plantio, não foi a ideal.

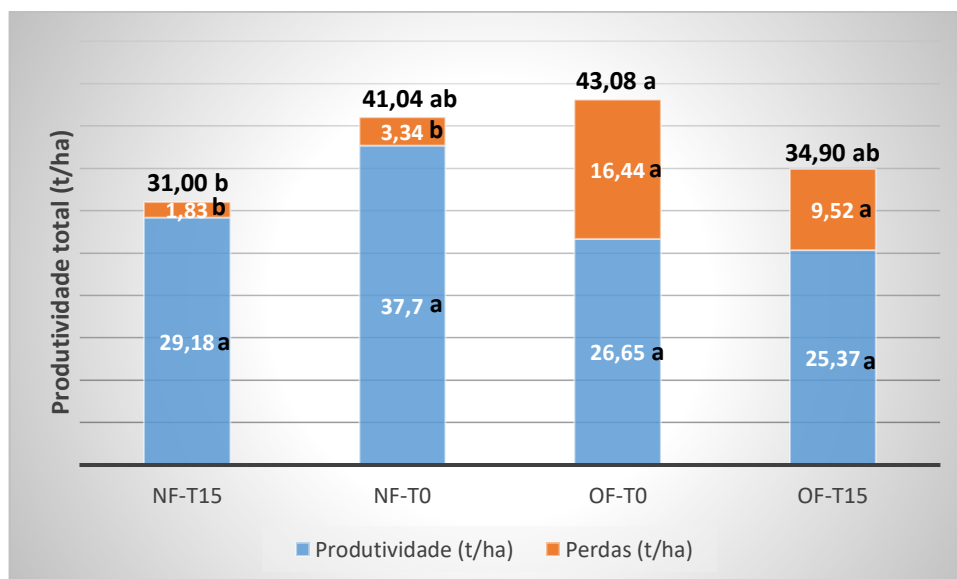


Figura 6 – Produtividade total no topo da coluna, frutos comercializáveis somados aos frutos descartados por lesões nos quatro tratamentos. NF – agricultura natural, OF – agricultura orgânica, T15 – semente da agricultura natural e T0 – semente da Topseed®. Médias nos tratamentos com a mesma letra não são diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

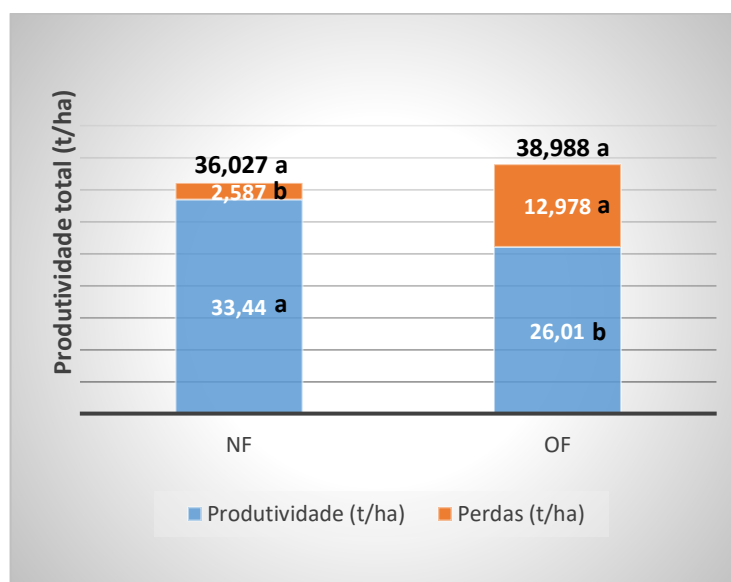


Figura 7 – Produtividade total dos sistemas de produção da agricultura natural (NF) e da agricultura orgânica (OF). Médias nos tratamentos com a mesma letra não são diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

No 5º plantio em Vila Velha-ES no final de agosto de 2005 os tomates ‘Especial para Salada’ produzidos no sistema da agricultura natural tiveram a produtividade de 24,85 t/ha de frutos comercializáveis (TAVARES, 2006). Em Rio Bananal-ES, onde foi feito o 12º plantio da série

de 15, a produtividade chegou a 27,31 t/ha. No Espírito Santo a produtividade média do tomate orgânico, segundo o INCAPER, tem sido de 38,51 kg/ha (SOUZA, 2015). São várias as produtividades dos tomates orgânicos produzidos nos Estados Unidos com grandes aportes de água, adubos e caldas defensivas: 60 t/ha (MITCHELL et al., 2007); 56 t/ha (KAFFKA; BRYANT; DENISON, 2005).

A produtividade de T0 na agricultura orgânica, OF-T0 (Figura 6) seria, muito provavelmente, de 43,08 t/ha, ou maior, se as plantas fossem irrigadas e pulverizadas com os defensivos orgânicos permitidos nesse cultivo.

4.4.2. Perdas

Os frutos danificados por pragas e doenças foram considerados imprestáveis para a comercialização *in natura*. As doenças em tomateiros mais frequentes nos campos experimentais da WVUOAF foram as causadas pelos fungos *Septoria lycopersici*, *Alternaria solani* e *Phytophthora infestans* (JETT, 2012; RAHMAN, 2013) que estragaram os frutos nos quatro tratamentos. Também são relatados os ataques aos tomateiros dos insetos *Leptinotarsa decemlineata* [1], *Polia japonica* [2] e *Drosophila suzukii* [3] nesta região. Os frutos lesionados (figura 8) eram descartados no monte da compostagem orgânica que seria usada em 2016.

Nas perdas associadas a pragas e doenças, o sistema de cultivo orgânico, sem as devidas pulverizações, foi significativamente prejudicial a T15 e a T0 (Figura 9). Na agricultura orgânica foi evidente a influência negativa dos adubos orgânicos a base de esterco e outros restos de animais sobre os tomateiros OF-T0 e OF-T15 (Figura 9), os quais tiveram perdas extremas. No entanto, OF-T15 expressou suas defesas, conseguindo assim, ter perdas menores que as do tomateiro T0 no mesmo sistema de cultivo.

Na agricultura natural ambas as sementes apresentaram grande eficiência em expressar suas defesas, aumentando assim a produtividade de NF-T15 e NF-T0. Esses resultados mostram que a ausência de adubos tem efeito imediato nas defesas dos tomateiros cujas sementes sejam oriundas de plantas adubadas quimicamente. A ausência de adubo do sistema de cultivo

[1] <http://extension.wvu.edu/lawn-gardening-pests/pests/colorado-potato-beetle>

[2] <http://extension.wvu.edu/lawn-gardening-pests/pests/japanese-beetle>

[3] <http://extension.wvu.edu/lawn-gardening-pests/pests/spotted-wing-drosophila>

da agricultura natural foi mais importante que a origem das sementes para aumentar a defesa e a produtividade das plantas (Figura 10).

Os resultados mostram que é inerente às plantas desta variedade expressarem boa produtividade e grandes defesas em sistemas de produção não adubados (Figuras 9 e 10). As defesas tendem a aumentar com o passar dos cultivos como de fato ocorreu em NF-T15 que teve a menor perda entre os 4 tratamentos (Figuras 9 e 6), porém a produtividade de NF-T0 na WVUOAF foi melhor que a de NF-T15 (Figuras 5 e 6) deixando claro que o método de seleção dos frutos feito desde 2004 pode não ter sido o mais adequado para manter o potencial produtivo desta variedade. Estes resultados mostram que, para uma variedade comercial de tomate se adaptar ao cultivo da agricultura natural desde o primeiro plantio, é necessário a adoção de métodos de melhoramento genético por seleção massal tão cuidadosos como os executados na obtenção das sementes T16 e T1 nos campos da WVUOAF.



Figura 8 – Frutos lesionados do cultivo orgânico.

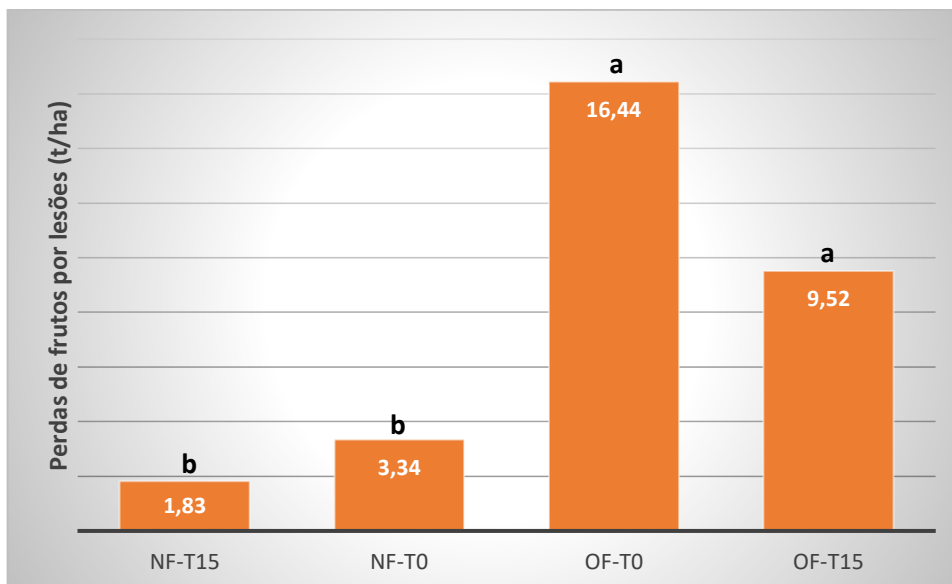


Figura 9 –Perdas de frutos por lesões causadas por pragas e doenças nos quatro tratamentos.

NF – agricultura natural, OF – agricultura orgânica, T15 – semente da agricultura natural e T0 – semente da Topseed®.

Médias nos tratamentos com a mesma letra não são diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

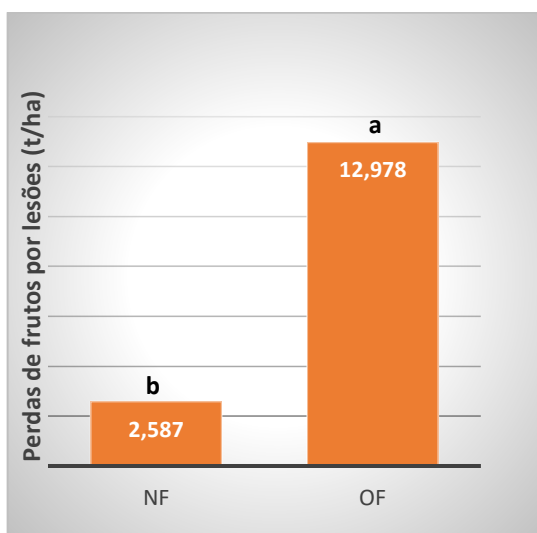


Figura 10 - Perdas de frutos por lesões causadas por pragas e doenças na agricultura natural (NF) e na agricultura orgânica (OF). Médias nos tratamentos com a mesma letra não são diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Na fração matéria orgânica dos solos agricultáveis há 98% de nitrogênio orgânico e menos de 2% de nitrogênio inorgânico (BARKER; PILBEAM, 2007). As análises do composto orgânico (Tabela 7), usado na WVUOAF por 16 anos na área *high input*, mostram que o nitrogênio

contido na matéria orgânica cerca de 68,18% é nitrogênio orgânico e 31,82% de nitrogênio inorgânico. Esses teores de nitrogênio inorgânico somados às altíssimas quantidades de fósforo, potássio, cálcio e magnésio (Tabela 6) existentes nos solos após a adubação orgânica onde foram instalados os tratamentos OF-T0 e OF-T15 foram a causa da maior produtividade total de OF-T0 e influenciaram fortemente nas grandes perdas de frutos ocasionados por pragas e doenças nestes tomateiros adubados.

4.4.3 Tempo de prateleira e perda de peso dos frutos

Os tomates nos estágios de maturação entre o verde maduro, pintado e o vermelho maduro (Figuras 11 e 12), estágios em que normalmente a dona de casa compra os tomates, foram os avaliados. Os tomates da agricultura natural se mantiveram em condições de comercialização por 2 dias a mais que os frutos da agricultura orgânica (Figura 13). Os frutos de plantas não adubadas, que foram as menos danificadas no campo, mantiveram esta resistência nos testes de tempo de prateleira.



Figura 11 - Tomates nos estágios verde maduro, pintado e rosado, cinco dias após a colheita.



Figura 12 – Tomates nos estágios vermelho, vermelho maduro e vermelho passado, vinte e seis dias após a colheita.

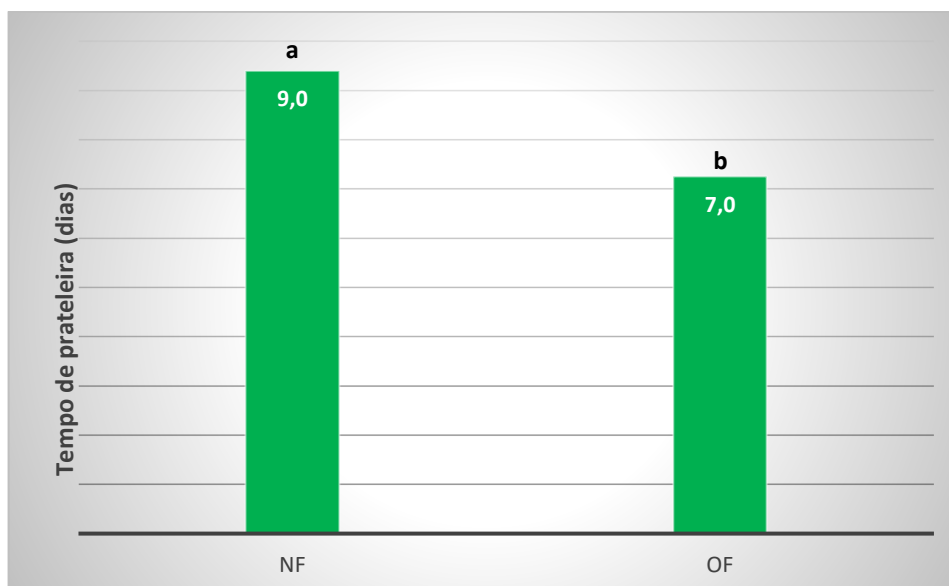


Figura 13 – Tempo de prateleira dos frutos entre os estágios pintado e vermelho maduro (Figura 4) dos dois sistemas de produção, agricultura natural (NF) e agricultura orgânica (OF).

Médias nos tratamentos com a mesma letra não são diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

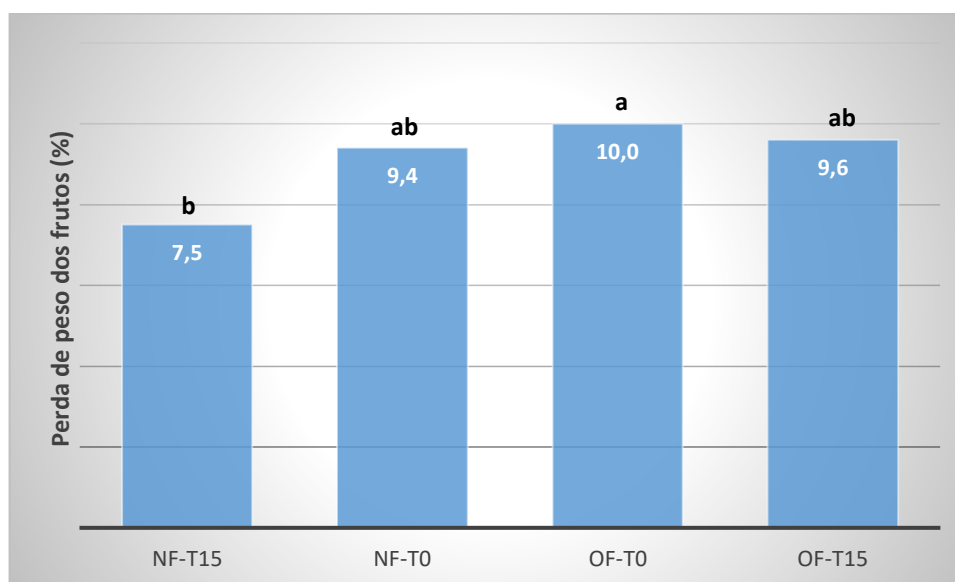


Figura 14 – Perda de peso dos frutos dos quatro tratamentos.

NF – agricultura natural, OF – agricultura orgânica, T15 – semente da agricultura natural e T0 – semente da Topseed®.

Médias nos tratamentos com a mesma letra não são diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os frutos de NF-T15 na agricultura natural foram os que tiveram as menores perdas de peso (Figura 14), mas ao mesmo tempo os menores teores de lignina (Figura 15). Assumiu-se que a maior porcentagem do peso perdido nesse experimento tenha sido de água. A perda de água

dos tomates não foi influenciada pelas quantidades de lignina nas paredes celulares, pois os frutos com mais lignina, NF-T0, OF-T0 e OF-T15 (Figura 15), perderam mais água. Embora não tenha sido avaliado nesse trabalho a espessura e constituição da cutícula dos frutos, a menor perda de água de NF-T15 é um forte indício que a melhor qualidade da cutícula tenha sido fundamental para estes frutos apresentarem as mais eficientes defesas neste experimento. O sabor tradicional do tomate, a boa aparência da fruta, as boas características organolépticas, o alto teor de compostos orgânicos de interesse para a saúde humana e a vida útil prolongada dos tomates estão presentes em plantas com a capacidade de crescer sob baixos insumos (GRANELL; MONFORTE, 2015). É relatado por vários autores que os sistemas de produção orgânica proporcionam uma vida útil longa do tomate, um tempo de prateleira maior (CEGLIE et al., 2015; CEGLE; AMODIO; COLELLI, 2016; REMBIALKOWSKA, 2007).

4.4.4 Teores de lignina nas folhas e nos frutos

A menor perda de peso de NF-T15 (Figura 14) provavelmente tenha sido pela melhor formação da cutícula que está associada à menor quantidade de lignina nos frutos, o que de fato aconteceu em NF-T15 (Figura 15). A camada cuticular das plantas está associada firmemente à função de cada órgão no desenvolvimento, no crescimento e na interação com o meio ambiente (SHI et al., 2013). O fator de transcrição SHN em *Arabidopsis thaliana* (AtSHN2) regulador da formação de cutículas em frutos, quando é superexpressado em arroz, coordena também a biossíntese de celulose e de lignina, melhorando nas paredes celulares a deposição de celulose em 34% enquanto diminui a de lignina em 45%, sem o comprometimento na robustez, no vigor e no desempenho da planta (AMBAVARAM et al., 2011). A cutícula fornece suporte estrutural para a integridade do fruto inteiro e parece influenciar tanto o crescimento quanto a maturação. As propriedades mecânicas e reológicas da cutícula são de significância econômica considerável e a variação da sua composição no fruto pode estar relacionada à resistência e à dessecação, infecção microbiana e rachaduras (SHI et al., 2013). A cutícula dos frutos selvagens de tomate contém camadas cuticulares externas e internas (BUDA et al., 2009). No entanto, a cutícula dos frutos transgênicos deficientes em cutina, tem apenas uma camada cuticular fina contendo 40% menos cutina que os frutos selvagens. A quantidade de ceras cuticulares totais também é significativamente reduzida nas cutículas desses tomates transgênicos. Assim, a expressão reduzida do fator de transcrição SHN do *Solanum lycopersicum* (SlSHN3) na pré e pós-colheita afeta negativamente a composição da cutícula do tomateiro. A deficiência de cutina na cutícula do tomate aumenta a perda de água pós-colheita e a susceptibilidade a patógenos

(ISAACSON et al., 2009; SHI et al., 2013). Shi et al. (2013) mostram que a cutícula dos tomates deficientes em cutina foram os que perderam mais água e apresentam em sua composição a razão 1:384 entre flavonoides e ácidos graxos sendo essa cutícula, além de mais fina, menos viscosa e menos impermeável. A cutícula dos frutos selvagens foram os que perderam menos água e apresentam a razão 1:180, indicando que há mais flavonoides na cutina o que pode ter deixado a cutícula mais viscosa e mais impermeável (SHI et al., 2013). Os flavonoides, como a quercetina, das membranas biológicas têm a capacidade de evitar o derretimento dos lipídios nelas contidos por aumentar a viscosidade lipídica (ARCZEWSKA et al., 2013).

Não houve diferenças significativas dos teores de lignina das folhas dos quatro tratamentos e nos frutos os teores de lignina foram significativamente menores apenas em NF-T15. No entanto o que se viu no campo foi uma grande infestação de doenças na agricultura orgânica com OF-T0 apresentando perdas de 38,16% e OF-T15 de 27,28% (Figura 6). As plantas NF-T15 e NF-T0 da agricultura natural tiveram apenas 5,90% e 8,14% de perda (Figura 6), respectivamente. Fica evidente que a lignina nas folhas e frutos das plantas da agricultura orgânica não foi eficiente na defesa contra pragas e doenças. Sabe-se que a lignina é um polímero fenólico que desempenha um papel central na defesa da planta contra insetos e patógenos. De acordo com Lagrimini et al. (1993) e War et al. (2012), a lignina limita a entrada de patógenos bloqueando fisicamente ou aumentando a tenacidade das folhas, reduzindo a alimentação de herbívoros e também diminuindo o conteúdo nutricional da folha. A síntese de lignina é induzida por infestação de herbívoros ou patógenos e sua rápida deposição nas paredes celulares reduz o crescimento da fecundidade de fungos, bactérias ou insetos. Aumento da expressão de genes associados à síntese de lignina em plantas infectadas com pragas e doença foram fartamente documentados por vários autores (LAGRIMINI et al., 1993; WAR et al., 2012).

Não houve diferenças significativas entre os teores de lignina nas folhas dos quatro tratamentos que variou entre 14,40% em NF-T15 e 15,72% em OF-T0. Os teores de ligninas das folhas de tomate, extraídos pelo método descrito em 4.3.3.8, estão de acordo com os encontrados na literatura que variam de 13 a 15%.

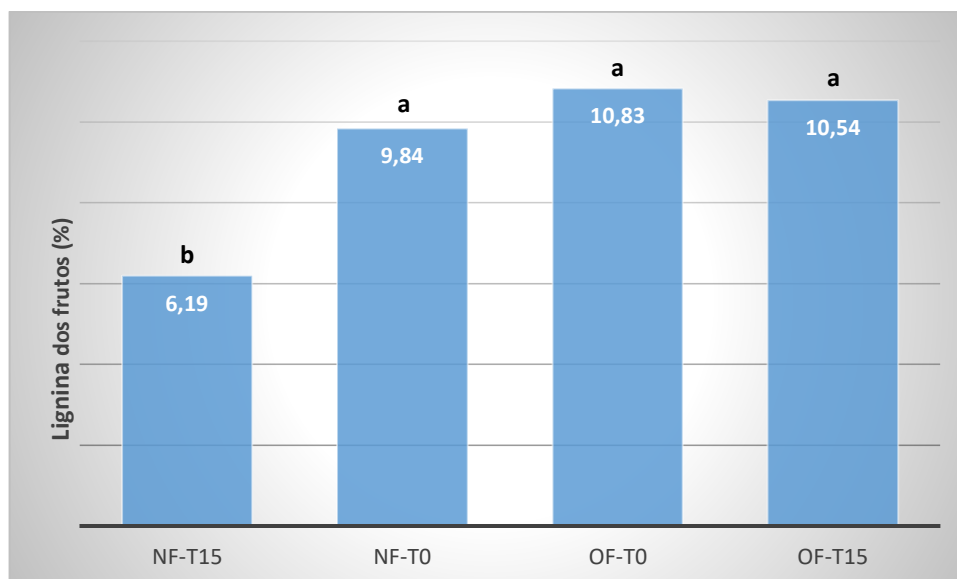


Figura 15 – Teores de lignina dos frutos.

NF – agricultura natural, OF – agricultura orgânica, T15 – semente da agricultura natural e T0 – semente da Topseed®.

Médias nos tratamentos com a mesma letra não são diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os frutos saudáveis de tomateiros adubados têm entre 10 e 11% de lignina (LAGRIMINI et al., 1993), teores iguais apresentados nos tratamentos NF-T0, OF-T0 e OF-T15. Esse resultado mostra que as sementes T0, cultivadas muitos anos com adubos, carregam consigo a característica de produzir mais lignina. A capacidade de produzir muita lignina em detrimento de outros compostos fenólicos pode ser uma característica hereditária que se perdeu em T15 e se manteve ausente em NF-T15 no cultivo sem adubo da agricultura natural. Os frutos de NF-T15 tiveram apenas 6,19% de lignina, que foi significativamente menor que os outros três tratamentos. No entanto, T15 ao ser novamente cultivado em ambiente adubado da agricultura orgânica, OF-T15, voltou a produzir muita lignina em seus frutos.

A diferença dos teores de lignina (Figura 15) entre os frutos dos tomateiros NF-T15 e OF-T0 foi de 42,84%. Surpreendentemente, Ambavaram et al. (2011) demonstraram que plantas de tomate transgênicas, com superexpressão do fator de transcrição relacionado à produção de cutina *SlSHN3* em tomateiros (*Solanum lycopersicum* L), têm 45% menos lignina que as plantas selvagens adubadas.

A evidência da pouca importância da lignina na defesa das plantas desse experimento é mais dramática e enigmática devido aos seus baixos teores nos frutos NF-T15 da agricultura natural, os quais foram os menos infestados por pragas e doenças e também os mais saborosos. Os frutos NF-T15 da agricultura natural tiveram 37,10% menos de lignina em média que os frutos NF-

T0, 42,84% e 41,27% a menos quando comparados com OF-T0 e OF-T15, respectivamente. As mesmas sementes T15 cultivadas com o adubo da agricultura orgânica, OF-15, tiveram mais lignina nos frutos, no entanto as perdas por pragas e doenças foram grandes.

Os tomates NF-T15 foram os que tiveram os menores teores de lignina (Figura 15), os que perderam menos água (Figura 14) e foram os menos infestados por patógenos e insetos (Figura 9), indicando fortemente que o fator que levou os frutos a terem menos lignina e perderem menos água gerou a maior defesa contra pragas e doenças nos frutos do tomateiro NF-T15.

A combinação das sementes T15, provenientes de plantas desenvolvidas 15 vezes em solos sem adubos, e o cultivo em solos não adubados da agricultura natural, gerou plantas com baixos teores de lignina nos frutos, tendo como consequência a defesa feita por mecanismos de proteção contra insetos e patógenos não avaliados nesse trabalho e muito provavelmente ainda desconhecidos pela academia. No entanto, pode-se supor pelos fortes indícios acima mencionados que a defesa dos frutos NF-T15 possa estar relacionada à espessura e constituição das cutículas, mais especificamente, a defesa dos frutos NF-T15 pode estar ligada aos fatores que induzem à superexpressão do gene *S/SHN3*, indutor da produção de mais cutina, menos lignina e, possivelmente, menos compostos fenólicos, e se assim for, a ausência de adubos nos cultivos da agricultura natural é o início de todo este processo de defesa.

A cutícula é composta de dois tipos de lipídios: um poliéster lipídico insolúvel chamado cutina, e as ceras de superfície, que cobrem a matriz de cutina e são solúveis em solventes orgânicos.

Os cloroplastos têm capacidade de sintetizar ácidos graxos precursores dos lipídios que fazem parte da cutícula, utilizando 14 NADPH e 7ATP produzidos na fotossíntese (RAO, 2006). O nitrato para entrar nas células e ser reduzido a nitrito gasta 4 ATP no citoplasma e nos cloroplastos usa três enzimas que consomem juntas 9 ATP (TAIZ et al. 2015). A redução do nitrato e a produção de ácidos graxos são reações competidoras pela energia do NADPH e do ATP nos cloroplastos (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015). Portanto, nas plantas adubadas com nitrato há uma disputa entre a síntese de ácidos graxos e a redução do nitrato por energia ocorrendo no cloroplasto. Pode-se supor que a energia da fotossíntese é desviada para a redução do nitrato em detrimento da produção de ácidos graxos e de outras possíveis sínteses. A menor produção de ácidos graxos nos cloroplastos resultará em cutículas menos espessas e menos resistentes à dissecação de frutos.

A menor quantidade de lignina e a menor perda de água nos frutos NF-T15 devem estar relacionadas a sinalizações moleculares que produziram mecanismos de defesa das plantas e

frutos de tomate no tratamento mais saudável, NF-T15. Essas possíveis novas rotas de defesa devem ser descobertas e melhor estudadas em trabalhos de ecofisiologia que venham a ter o sistema de cultivo da agricultura natural em campo agrícola como um laboratório a céu aberto.

4.4.5 Matéria seca dos frutos e das folhas

Não houve diferença significativa entre a matéria seca das folhas nos quatro tratamentos. Os frutos de NF-T15 e OF-T15 tiveram mais matéria seca que os outros frutos e os de NF-T0 os menores teores (Figura 16). Apesar de todas as sementes serem da mesma variedade ‘Especial para Salada’, a origem da semente foi mais importante que o sistema de cultivo. Para indústria de tomate as sementes T15 são mais importantes por produzirem mais matéria seca.

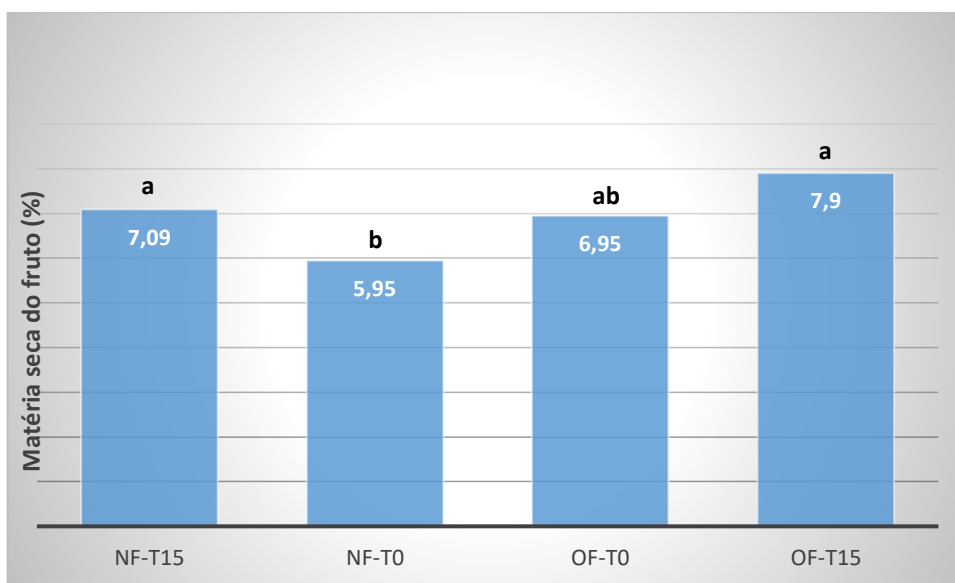


Figura 16 –Matéria seca dos frutos dos quatro tratamentos.

NF – agricultura natural, OF – agricultura orgânica, T15 – semente da agricultura natural e T0 – semente da Topseed®.

Médias nos tratamentos com a mesma letra não são diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.5 CONCLUSÕES

Os tomateiros NF desenvolveram-se com o nitrogênio orgânico do solo. Os tomateiros OF foram nutridos com o nitrogênio inorgânico dos adubos. A origem e o tipo de nitrogênio, utilizado pela planta, influenciaram na suscetibilidade às pragas e doenças.

Os frutos NF-T15 tiveram 6,19% de lignina enquanto os frutos dos outros três tratamentos tiveram cerca de 10% desta substância. No campo experimental a presença de insetos e esporos de fungos pouco induziram a produção de lignina em frutos NF-T15, muito embora eles estivessem no mesmo ambiente indutor dos outros tratamentos.

As plantas NF-15 que tiveram os menores teores de lignina nos frutos foram as que perderam menos frutos por lesões causados por pragas e doenças. Os mecanismos de defesa acionados pelas plantas NF-T15 foram os mais eficientes, enquanto os acionados por NF-T0, OF-T0 e OF-T15 foram os menos eficazes e podem não ter sido os mesmos que defenderam as plantas e frutos NF-T15 da agricultura natural.

O composto orgânico rico em nitrogênio inorgânico foi uma das causas das maiores perdas ocasionadas por pragas e doenças nos tomateiros adubados.

A semente comercial T0 com produtividade de 37,70 t/ha mostrou capacidade de se adaptar à ausência de adubos no primeiro cultivo sob as técnicas da agricultura natural. Portanto, as sementes comerciais de tomate ‘Especial para Salada’ foram de fácil adaptação ao novo método agrícola que apenas forneceu os nutrientes do solo aos tomateiros T0. Estes resultados mostram que é possível uma produtividade lucrativa para os tomaticultores da agricultura natural a partir de variedades comerciais de tomate.

4.6 REFERÊNCIAS

- AMBAVARAM, M. M. R. et al. Coordinated activation of cellulose and repression of lignin biosynthesis pathways in rice. **Plant physiology**, Blacksburg, v. 155, n. 2, p. 916–31, 2011. doi:10.1104/pp.110.168641
- ARCZEWSKA, M. et al. The molecular organization of prenylated flavonoid xanthohumol in DPPC multibilayers: X-ray diffraction and FTIR spectroscopic studies. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, Lublin, v. 1828, n. 2, p. 213–222, 2013. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.10.009
- BARKER, A. V.; PILBEAM, D. J. (EDS.). **Handbook of Plant Nutrition**. Boca Raton: CRC Press, 2007. ISBN: 13: 978-1-4398-8198-9
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (EDS.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2nd ed. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. ISBN: 9780470714218, ISBN: 9780470714225
- BUDA, G. J. et al. Three-dimensional imaging of plant cuticle architecture using confocal scanning laser microscopy. **Plant Journal**, Ithaca, v. 60, n. 2, p. 378–385, 2009. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2009.03960.x
- CEGLIE, F. G. et al. Quality and postharvest performance of organically-grown tomato (*Lycopersicon esculentum* L. “Marmande”) under unheated tunnel in Mediterranean climate. **Acta Horticulturae**, Valenzano, v. 1079, p. 487–494, 2015. doi: 10.17660/ActaHortic.2015.1079.64
- CEGLIE, F. G.; AMODIO, M. L.; COLELLI, G. Effect of Organic Production Systems on Quality and Postharvest Performance of Horticultural Produce. **Horticulturae**, Valenzano, v. 2, n. 4, p. 7, 2016. doi:10.3390/horticulturae2020004
- FERREIRA, S. M. R. **Características de qualidade do tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivados nos sistemas convencional e orgânico comercializado na região metropolitana de Curitiba**. 2004. 249 f. tese, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- FESS, T. L.; KOTCON, J. B.; BENEDITO, V. A. Crop breeding for low input agriculture: A sustainable response to feed a growing world population. **Sustainability**, Morgantown, v. 3, n. 10, p. 1742–1772, 2011. doi:10.3390/su3101742

GRANELL, A.; MONFORTE, A. The variability in european traditional tomato varieties: a first survey of the traditom resources. In: **ISHS International Symposium**, 2015, Avignon.

HATFIELD, R.; FUKUSHIMA, R. S. Can lignin be accurately measured? **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 3, p. 832–839, 2005. doi:10.2135/cropsci2004.0238

ISAACSON, T. et al. Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. **Plant Journal**, Ithaca, v. 60, n. 2, p. 363–377, 2009. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03969.x

JETT, L. W. **Understanding Early Blight of Tomatoes**. Morgantown: West Virginia University, 2012.

KAFFKA, S.; BRYANT, D.; DENISON, F. Comparisons of organic and conventional maize and tomato cropping systems from a long-term experiment in California. In: FIRST SCIENTIFIC CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF ORGANIC AGRICULTURE RESEARCH (ISO FAR), 2005, Adelaide. **Researching sustainable systems**. Bonn: International Society of Organic Agricultural Research (ISO FAR), p. 1992–1995, ref.8, 2005. ISBN: 3906081761

LAGRIMINI, L. M. et al. Peroxidase Overproduction in Tomato - Wound-Induced Polyphenol Deposition and Disease Resistance. **Hortscience**, Columbus, v. 28, n. 3, p. 218–221, 1993.

MITCHELL, A. E. et al. Ten-year comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of flavonoids in tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 55, n. 15, p. 6154–6159, 2007. doi: 10.1021/jf070344+

RAO, V. M. **Plant Physiology And Biochemistry: Nitrogen and Lipid Metabolism**. 1st ed. Jaipur: University of Rajasthan, 2006.

REMBIALKOWSKA, E. Quality of plant products from organic agriculture. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Warszawa, v. 87, n. 2, p. 2757–2762, 2007. doi: 10.1002/jsfa.3000

SHI, J. X. et al. The tomato SlSHINE3 transcription factor regulates fruit cuticle formation and epidermal patterning. **New Phytologist**, Rehovot, v. 197, n. 2, p. 468–480, 2013. doi: 10.1111/nph.12032

SOUZA, J. L. DE. **Sistema Orgânico de Produção de Tomate**. Vitória: INCAPER, 2010. ISBN 978-85-89724-17-3

TAIZ, L. et al. **Plant Physiology and Developmen.** 6th ed. Santa Cruz: Sinauer Associates, 2015. ISBN: 9781605352558.

TAVARES, N. S. **Respostas ecofisiológicas e bioquímicas de duas cultivares de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) cultivadas em sistemas de agricultura natural e convencional.** 2006. 126 f. dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, 2006.

WAR, A. R. et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant signaling & behavior**, Patancheru, v. 7, n. 10, p. 1306–20, 2012. doi: 10.4161/psb.21663

WRIGHT, E. L. et al. **Soil survey of Marion and Monongalia Counties, West Virginia.** Morgantown: West Virginia University, 1982.

5 CAPÍTULO 2

DIFERENÇAS MOLECULARES ENTRE RAÍZES E FOLHAS DOS TOMATEIROS ‘ESPECIAL PARA SALADA’ T15 e T0 COM E SEM FERTILIZAÇÃO DE NITRATO

RESUMO

As plantas em ambientes naturais utilizam como fonte de nitrogênio a sua forma orgânica enquanto as plantas adubadas têm principalmente o nitrato como fonte deste nutriente. Foram avaliadas as diferenças moleculares entre uma variedade comercial ‘Especial para Salada’ da Topseed® (T0) e uma selecionada da ‘Especial para Salada’ cultivada 15 vezes com o manejo da agricultura natural (T15). Foram estudados os genes NRT1, NRT2 e NR diretamente relacionados com a assimilação do nitrato, os genes transportadores de aminoácidos AAP2 e LHT1 e gene PAL. O RNA foi extraído de raízes e folhas dos tomates desenvolvidos em sílica pura irrigados com água pura e irrigados com água e nitrato. As amostras de RNA foram transformadas em cDNA para as análises quantitativas em qRT-PCR realizadas no termociclador do Laboratório de Genética Molecular da West Virginia University-WVU (EUA). Foi realizada a análise de variância seguida pelo teste t de Student. A atividade dos genes nos tratamentos sem nitrato (T15-H₂O e T0-H₂O) e com nitrato (T0-KNO₃ e T15-KNO₃) foi relacionada com os resultados de campo da agricultura natural (NF-T15 e NF-T0) e da agricultura orgânica (OF-T0 e OF-T15), respectivamente. As plantas OF-T0 foram as que tiveram as maiores perdas de frutos, por pragas e doenças, que podem ter como causa as menores atividades em T0-KNO₃ dos genes PAL, AAP2 e LHT1 nas raízes e a maior atividade no gene NRT1 nas raízes e nas folhas. Os tomates NF-T15 foram os que tiveram a menor perda de frutos por pragas e doenças, enquanto que em T15-H₂O ocorreu a maior atividade dos genes PAL, AAP2 e LHT1 nas raízes e a menor atividade do gene NRT1 nas raízes e nas folhas. As perdas por pragas e doenças nos tratamentos adubados com composto orgânico no campo experimental da OAFWVU estão estreitamente relacionadas com os resultados de biologia molecular nos tratamentos fertilizados e não fertilizados com nitrato. O gene NRT1 quando superativado pela presença de nitrato no solo e nas sementes T0 pode ser o indutor de rotas metabólicas que diminuem as defesas das plantas adubadas.

Palavras-chave: agricultura natural · tomate · aminoácidos · nitrato · PAL · AAP2 · LHT1 · NRT1 · NRT2 · NR

5.1 INTRODUÇÃO

Nas plantas adubadas a transformação do nitrato em aminoácidos consome energia produzida pela fotossíntese enquanto o aparato genético para usar aminoácidos da rizosfera em suas rotas metabólicas não exige a energia que é indispensável para a assimilação do nitrato pelas plantas (MARSCHNER, 2012). Mokiti Okada (1987) idealizador da agricultura natural é enfático ao afirmar que as plantas adubadas deixam de absorver os nutrientes do solo e passam a captar os nutrientes dos adubos, sendo essa a causa das infestações de pragas e doenças (OKADA, 1987). As informações de Marschener (2012), a respeito da capacidade que as plantas têm de captar os aminoácidos da matéria orgânica do solo como fonte de nitrogênio, confirmam os ensinamentos de Okada (1987) a respeito de como as plantas se nutrem em ambientes naturais e na agricultura natural.

As plantas são totalmente dependentes do nitrogênio para terem boa produtividade, podendo ser o nitrato uma das fontes deste elemento. A poderosa indústria de fertilizantes nitrogenados comercializa mais de 90 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados que são lançados anualmente aos solos agrícolas em todo o mundo (FAOSTAT 2016). A capacidade de uma planta para capturar o nitrogênio pelas raízes depende do tipo de solo, do ambiente, das espécies e do método de cultivo. Estima-se que 50% a 70% do nitrogênio fornecido ao solo na forma de fertilizante agrícola é perdido como óxido nitroso, que vai para a atmosfera aumentando o efeito estufa, e como nitrato e nitrito, que ao serem lixiviados no perfil do solo, poluem os lençóis freáticos, córregos e rios (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015). Portanto, não usar o nitrato é essencial para reduzir os danos causados pela sua grande lixiviação. Nas plantas, após a assimilação do nitrato em amônio, ocorre a produção do glutamato, precursor direto dos 20 principais aminoácidos produzidos através de longas e complexas rotas metabólicas (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015; TAIZ et al. 2015). Estes aminoácidos existem em abundância na matéria orgânica em constante reciclagem nos solos dos ecossistemas naturais e da agricultura natural. Esta realidade da Natureza aliada ao que se observa nos cultivos convencionais e na agricultura orgânica nos faz crer que as plantas na Natureza não precisam de adubação extra, elas já têm todos os mecanismos necessários para sobreviver e produzir com o que há no solo sem serem infestadas por pragas e doenças.

Os objetivos deste trabalho foram testar a hipótese de que os tomateiros cultivados sem adubos nitrogenados por 15 plantios consecutivos têm preferência por aminoácidos e não por nitrato avaliando-se em raízes e folhas das plantas de tomateiros T15 e T0 as expressões de seis genes PAL, AAP2, LHT1, NRT1, NRT2 e NR. O gene PAL coordena a biossíntese de compostos

fenólicos como flavonoides e ligninas, os genes AAP2 e LHT1 são transportadores de aminoácidos da rizosfera para todos os órgãos da planta. O gene NRT1 está relacionado à percepção de nitrato no meio em que se desenvolve o sistema radicular, à captação do nitrato para dentro das células radiculares e ao seu transporte por todos os órgãos via xilema ou floema. O gene NRT2 retira o nitrato do embrião das sementes para ser assimilado na raiz ou folha. O gene NR atua na assimilação do nitrato em aminoácidos nas raízes ou folhas.

As plantas desenvolveram uma flexibilidade notável para se adaptar às mudanças no seu ambiente por não poderem fugir de condições prejudiciais. Ao mesmo tempo, elas também são capazes de explorar as condições favoráveis em seu benefício. Esta grande capacidade de adaptação é sustentada pela versátil regulação da expressão dos genes. Numerosos sinais bióticos como infecções por patógenos e abióticos como sombra, calor, disponibilidade de nutrientes afetam os níveis de compactação da cromatina, um processo que mantém a mutável regulação da expressão dos genes e que está associado a grande capacidade de adaptação dos vegetais. O resultado destes processos pressionados pelo ambiente pode persistir por gerações por muito tempo após os sinais iniciais tenham expirado e pode contribuir para evolução de variedades melhoradas por meio de mecanismos epigenéticos (GRAFI; OHAD, 2013).

5.2 OBJETIVOS

5.2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do nitrato e de sua ausência sob a expressão dos genes PAL, AAP2, LHT1, NRT1, NRT2 e NR em raízes e folhas dos tomateiros T15 e T0.

5.2.2 Objetivo específico

Relacionar os resultados obtidos da atividade de seis genes com os resultados dos campos experimentais.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 Genotipagem dos tomates T15 e T0

As folhas de NF-T15, NF-T0, OF-T0 e OF-T15 foram colhidas no campo 90 dias após a semeadura, transportadas em bolsas térmicas com gelo e acondicionadas em freezer a -20°C até a extração de DNA genômico total para uso no estudo de genotipagem para verificar se os tomates T15 e T0 são uma mesma variedade. O DNA genômico total de cada amostra foi extraído de folhas jovens trituradas em nitrogênio líquido usando-se o brometo de cetiltrimetilamonio. O DNA extraído de cada amostra foi diluído até uma concentração final de 30 ng/mL com tampão de 1X TE e armazenado a -80°C. Amplificação de marcadores RAPD (Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico) foi feita com a mistura de reação, cujo volume final de 25 µL continha 2,5 µL de tampão 10X, 2,0 µL de dNTP 2,5 mM, 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM, 1,0 µL de primer 1,0 µM, 0,10 µL de 5 U/µL de rTaq Polymerase Dynazyme™ e 60 ng de DNA genômico de cada amostra. Reações de amplificação foram realizadas de acordo com Williams et al. (1990), com pequenas modificações. A PCR foi realizada no termociclador do Laboratório de Genética Molecular da WVU, utilizando o seguinte procedimento: pré-desnaturação a 94°C durante 5 minutos e depois 42 ciclos de desnaturação a 94°C durante 2 min, recozimento entre 35° a 45°C durante 1 min, e extensão final de 1 minuto a 72°C. Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese (100 V durante 90 minutos) em géis de agarose 1,4% (p/v), utilizando o tampão de corrida TBE 1 X. Os géis foram corados com brometo de etídeo e fotografados sob luz UV. Considerando-se os quatro tratamentos provenientes de duas sementes T15 e T0, foram testados 6 primers (Tabela 8) indicados por Korir et al. (2013) para a genotipagem da variedade comercial ‘Especial para Salada’. As bandas foram avaliadas visualmente levando-se em conta para análise apenas aquelas mais evidentes e consistentes.

Tabela 8 – Primers usados na genotipagem de tomateiros

Primer	Sequência 5'→3'
Y21	GGACCCAACCA
Y22	GGACCCAACCT
Y27	GTGTGCCCCAA
Y35	AAGCCTCGTCG
Y53	TGGTGGCGTTG
Y59	ACCCCCGACTG

5.3.2 Estudos da expressão dos genes PAL, AAP2, LHT1, NRT1, NRT2 e NR em raízes e folhas dos tomateiros T15 e T0

5.3.2.1 Produção das amostras

Para extração do RNA das amostras, na casa de vegetação do Campus Evansdale da West Virginia University, foram semeadas em sílica pura as sementes T15 e T0. Os tratamentos foram denominados T15-H₂O e T0-H₂O com três repetições para se avaliar a expressão dos genes apenas sob a influência da água pura sem nutrientes. Ambos tratamentos foram submetidos a irrigações diárias com 500 ml de água pura fornecida pelo processo Milli-Q[®]. As anotações foram feitas em marcadores de plástico branco (Figura 17A).

Foram semeadas em sílica pura as mesmas sementes que receberam diariamente 500 ml água pura com 500 µM de KNO₃ para que fosse avaliada a influência deste teor de nitrato sob os genes estudados. Os tratamentos, com três repetições, foram denominados T15-KNO₃ e T0-KNO₃. As anotações foram feitas em marcadores de plástico verde (Figura 17B).

Dezesseis dias após a semeadura as mudas foram coletadas na casa de vegetação para as análises moleculares (Figuras 17A e 17B). As plântulas de tomate foram retiradas da sílica pura cuidadosamente e divididas, por corte de tesoura, em raízes e parte aérea imediatamente acondicionadas em tubos eppendorf e mergulhados em cuba com nitrogênio líquido. As amostras foram levadas para o Laboratório de Genética Molecular da WVU e armazenadas no freezer -80°C até o início da extração de DNA.

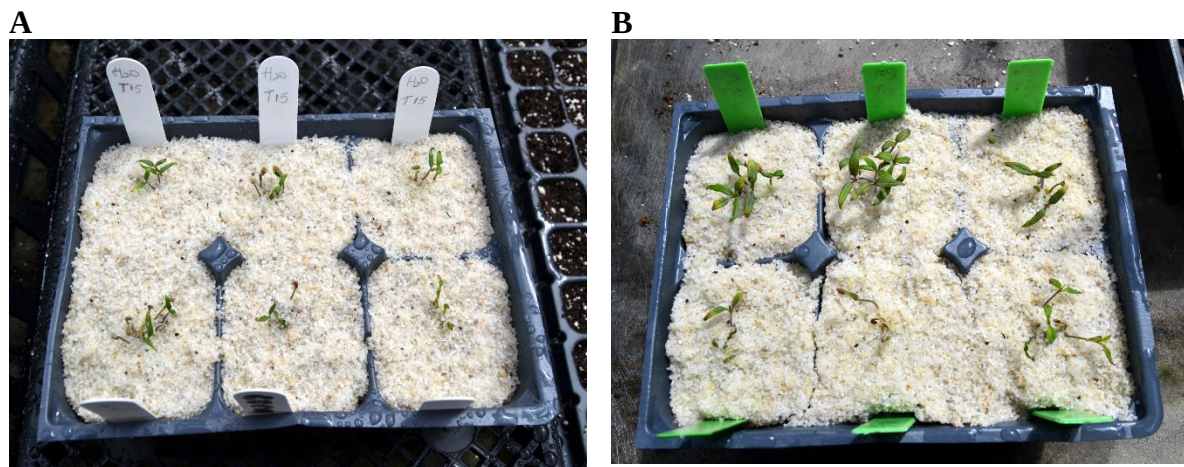


Figura 17 – Plântulas de tomateiros T15 (superior) e T0 (inferior) produzidas em sílica pura e água pura (A) e T15 (superior) e T0 (inferior) produzidas em sílica pura e água pura com 500 μM de KNO_3 (B).

5.3.2.2 Extração do material genético

Extração de RNA foi feita com o uso do Kit *mirVana*TM miRNA Isolation (AM1560), Ambion®, EUA. O protocolo de isolamento do *kit* foi usado em mudas de tomate com 17 dias de idade semeadas em sílica pura. O referido protocolo se encontra no link https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_055423.pdf

A extração de RNA total por *mirVana*TM miRNA Isolation Kit foi executada seguindo-se as instruções do fabricante. A preparação das soluções de lavagem foi feita com a adição de 21 mL de etanol 100% à solução de lavagem miRNA e 40 mL de etanol 100% à solução 2/3.

As amostras de 250 mg de tecido foram lavadas e ressuspensas em 1 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS) a frio. As células das amostras foram rompidas em 600 μL de solução *Lysis/Binding*. Agitou-se vigorosamente por 10 segundos no vórtex para que fosse obtido um lisado homogêneo.

Para a extração do RNA adicionou-se 1/10 do volume de miRNA *Homogenate Additive* ao lisado das células do tecido, e misturou-se bem com vortex. Por exemplo, se o volume de lisado foi de 300 μL , adicionou-se 30 μL de miRNA *Homogenate Additive*. Deixou-se a mistura em gelo por 10 min. Adicionou-se um volume de ácido fenol/clorofórmio igual ao volume do lisado antes da adição do *miRNA Homogenate Additive*. Por exemplo, se o volume original do lisado foi de 300 μL , adicionou-se 300 μL de ácido-fenol/clorofórmio. Usou-se o vórtex por 60 segundos para misturar as substâncias. Centrifugou-se o lisado durante 5 minutos com velocidade máxima de 10.000 rpm à temperatura ambiente para separar as fases aquosa e

orgânica. Após a centrifugação, a interfase deve estar compactada, se não estiver, repita a centrifugação. Retirou-se cuidadosamente a fase aquosa e transferindo-a para um tubo novo. Anotou-se o volume removido.

Adicionaram-se 1,25 volumes de etanol 100% em temperatura ambiente à fase aquosa, por exemplo, se houve 300 µL de fase aquosa, adicionaram-se 375 µL de etanol 100%.

Para cada amostra, foi montada uma coluna em tubo coletor fornecido pelo Kit. Pipetaram-se 700 µL da mistura com etanol 100% na coluna.

Centrifugou-se à 10.000 rpm por 15 segundos para passar a mistura através do filtro. Descartou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento até que toda a mistura de lisado e etanol estivesse filtrada.

Aplicaram-se 700 µL de *miRNA Wash Solution 1* à coluna e centrifugou-se por 10 segundos à 10.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante. Aplicaram-se 500 µL de *miRNA Wash Solution 2/3* à coluna e centrifugou-se por 10 segundos à 10.000 rpm. Repetiu-se o procedimento de lavagem com uma segunda alíquota de 500 µL de *miRNA Wash Solution 2/3*.

Depois de descartar o sobrenadante da última lavagem, centrifugou-se o conjunto por 1 minuto para remover o fluido residual do filtro.

Transferiu-se a coluna para um novo tubo de coleta. Aplicaram-se 100 µL de solução de eluição de 0,1 mM de EDTA livre de nucleases, pré-aquecida a 95°C no centro do filtro e fechou-se a tampa do tubo. Centrifugou-se durante 30 segundos na velocidade máxima para recuperar o RNA.

O RNA extraído foi avaliado quanto à sua qualidade e concentração por espectrofotômetro. As amostras de RNA foram, também, submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio a 1% para análise da integridade através da visualização das bandas de RNA.

Para deixar as amostras livres de DNA foram usados os procedimentos da página 5 do protocolo do *TURBO DNA-free Kit* 15µL reaction of each (50µg DNA/mL RNA) – (AM1907), Ambion®, EUA encontrado no site:

http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_055740.pdf

Adicionaram-se 0,1 volume 10x *TURBO DNase Buffer* e 1 µL de *TURBO DNase* ao RNA. Usou-se 1 µL de *TURBO™ DNase* (2 U) para até 10 µg de RNA em uma reação de 50 µL. Essas

condições de reação removeram até 2 µg de DNA genômico do RNA total em um volume de reação de 50 µL. Adicionou-se apenas metade da *DNase TURBO™* à reação inicial, incubou-se durante 30 minutos, depois foi adicionado o restante da enzima e incubado por mais 30 minutos a 37°C.

Adicionou-se o *DNase Inactivation Reagent* ressuspendido, normalmente 0,1 volume, e misturou-se bem. Usou-se 2 µL ou 0,1 volume de *DNase Inactivation Reagent*, o que foi maior. Por exemplo, se o volume de RNA foi de 50 µL, e 1 µL de *TURBO DNase* foi usado no passo anterior, adicionou-se 5 µL de *DNase Inactivation Reagent*.

Incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente e misturou-se bem. Moveu-se o tubo por 2 ou 3 vezes durante o período de incubação para redispersar o *DNase Inactivation Reagent*.

Centrifugou-se a 10 000 rpm durante 1,5 minutos e transferiu-se o RNA para um tubo novo. Agitou-se o tubo 3 vezes durante o período de incubação para misturar o RNA ao *DNase Inactivation Reagent*.

Centrifugou-se a 2.000 rpm durante 5 minutos. Este passo de centrifugação granulou o *DNase Inactivation Reagent*. Após a centrifugação, transferiu-se cuidadosamente o sobrenadante, que continha o RNA livre do DNA genômico, para um tubo novo.

As amostras de RNA, que apresentaram alto grau de integridade e pureza (Figuras 18 e 19), foram usadas na síntese do cDNA feito com o Kit cDNA Synthesis usando-se Super-Script IV First-Strand cDNA Synthesis Reaction (1/2 reação – 10µL) e tratamento com RNase, cujo protocolo se encontra no endereço que se segue.

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/SSIV_First_Strand_Synthesis_System_U_G.pdf

Misturou-se 1 µL de 50 µM Oligo d(T)₂₀ *primer* e 2 µM *primer reverse* específico de gene, 1 µL de 10 mM de dNTP *mix* (10 mM cada), acima de 11 µL do padrão de RNA (10 pg–5 µg de RNA total ou 10 pg–500 ng de mRNA) e 13 µL de água Milli-Q® foram misturados em um tubo de reação de PCR e rapidamente centrifugaram-se os componentes. Aqueceu-se o *mix* de *primers* de RNA a 65°C durante 5 minutos e depois incubou-se em gelo durante pelo menos 1 minuto.

Agitou-se e centrifugou-se rapidamente o tampão 5x *SuperScript™* IV (SSIV). Foram preparadas duas reações. Em cada tubo de reação, misturou-se 4 µL do tampão 5x SSIV, 1 µL de 100 mM de ditionitritol-DTT, 1 µL de inibidor de ribonuclease e 1 µL de transcriptase reversa

SuperScript[™] IV (controle positivo). Tampou-se o tubo, misturou-se, em seguida, centrifugou-se rapidamente o conteúdo.

Adicionou-se o transcriptase reversa-*RT mix reaction* fornecido pelo *Kit* para o anelamento do RNA.

Incubou-se o preparado a 50°C durante 10 minutos para o início e manutenção das reações. Em seguida inativou-se a reação ao incubar o preparado a 80°C durante 10 minutos.

Adicionou-se 1 µL de *E. coli* RNase H e incubou-se a 37°C durante 20 minutos para se proceder à amplificação por PCR.

Foram preparadas duas reações. Em cada tubo adicionou-se 37,8 µL de água Milli-Q[®], 5 µL de 10x tampão de PCR de alta precisão, 2 µL de 50 mM de MgSO₄, 1 µL de 10 mM de mistura dNTP (10 mM cada), 1 µL de *primer sense* (10 µM) (5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3'), 1 µL de *primer antisense* (10 µM) (5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'), 2 µL cDNA da reação de controle positivo ou 2 µL de água Milli-Q[®] e 0,2 µL de *Platinum*[™] Taq DNA *Polymerase* de alta precisão (5 U/µL). Misturaram-se suavemente todas as substâncias para que em seguida fossem centrifugadas rapidamente.

Colocou-se a mistura em um termociclador pré-aquecido a 94°C. Executou-se a amplificação por PCR usando para desnaturação inicial a temperatura de 94°C por 2 minutos e 35 ciclos de PCR (94°C por 15 seg., 55°C por 30 seg. e 68°C por 1 minuto) para amplificação, ao final manteve-se a reação em 4°C.

Analísaram-se 10 µL de cada reação usando eletroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídio. A banda 353 pb visível foi o controle positivo com a enzima transcriptase reversa-RT. Para a reação de controle sem RT, a mesma banda teve menos 50% de intensidade quando comparada ao controle positivo.

A extração do RNA das plantas cultivadas em sílica pura foi bem-sucedida (Figuras 18 e 19) para se prosseguir com os procedimentos seguintes para garantir a qualidade dos resultados finais. Os números nas figuras indicam cada uma das 3 repetições de cada tratamento.

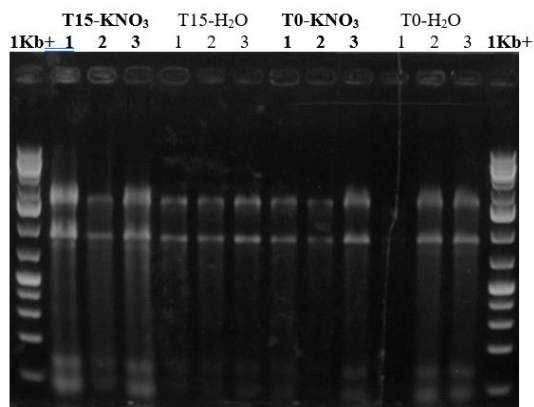


Figura 18 – Confirmação da extração de RNA das 3 repetições das raízes das amostras fertilizadas com nitrato T15-KNO₃ e T0-KNO₃ e das não fertilizadas T15-H₂O e T0-H₂O.

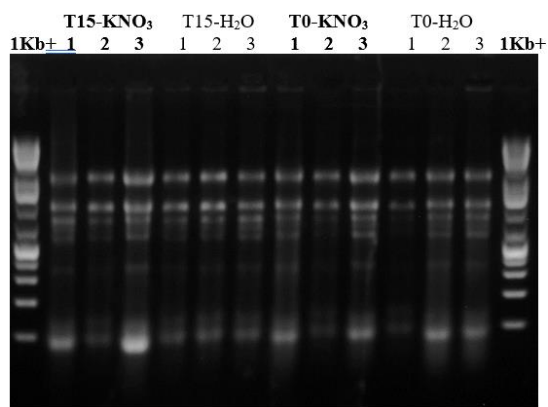


Figura 19 – Confirmação da extração do RNA das 3 repetições das folhas de amostras fertilizadas com nitrato T15-KNO₃ e T0-KNO₃ e das não fertilizadas T15-H₂O e T0-H₂O.

5.3.2.3 Desenho dos primers

O programa Primer3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) foi utilizado para se desenhar primers adequados ao PCR quantitativo em tempo real para os genes PAL, AAP2, LHT1, NRT1, NRT2 e NR de *Solanum lycopersicum* L. (Tabela 9).

Tabela 9 – Sequência dos primers para análise de qRT-PCR.

Gene	Sequência dos primers	Referência (http://solcyc.solgenomics.net/)
PAL	Fw: 5' ACCGAGACCATAACTCATTCG 3' Rv: 5' GTCCATACTCCCGATGCCTA 3'	Solyc06g060110
AAP2	Fw: 5' CTCAAATCACCACCAGCAGA 3' Rv: 5' CATACCCAAAGCAACCACAA 3'	Solyc01g087550.2
LHT1	Fw: 5' TCACATTCCCTTTCTTTGGTG 3' Rv: 5' GACTCCATCTCCTTGGCTTG 3'	Solyc08g007420
NTR1	Fw: 5' TTGGGAAGAGAATGGGGTTA 3' Rv: 5' GCAGCCACAAATACTGATGC 3'	Solyc06g074990
NRT2	Fw: 5' GCAACTCCGTTCACTGCTT 3' Rv: 5' CAACACTAAAATACCCATCACCAC 3'	Solyc02g093860.2
NR	Fw: 5' CAGGCAAGCAAGCAAGTAGA 3' Rv: 5' TGGGACTGAAAATCCACCAT 3'	Solyc09g007920.2

PAL – Fenilalanina amônia-liase. AAP2 – Permease de Aminoácidos 2. LHT1 – Transportador de Lisina e Histidina 1. NRT1 – Transportador de Nitrato 1. NRT2 – Transportador de Nitrato 2. NR – Redutase do nitrato. Fw – Sequência do primer forward. Rv – Sequência do primer reverse.

5.3.2.4 Análises quantitativas da expressão dos genes em qRT-PCR

A análise da expressão quantitativa dos genes por qRT-PCR foi feita no Sistema de detecção de sequências CFX96 Real-Time System da Bio-Rad C1000 TM Thermal Cycler do Laboratório de Genética Molecular da West Virginia University. As reações foram submetidas a uma incubação a 50°C por 2 minutos, em seguida a uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos e na sequência iniciou-se 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação do DNA e 55°C por 1 minuto para anelamento de primers e extensão. Logo após os ciclos de PCR as reações foram incubadas a 95°C por 15 segundos e 60°C por 10 segundos seguido pelo aumento da temperatura de 0,5°C até 95°C para a feitura da Melt Curve. No final do ciclo as reações foram mantidas à 20°C e as placas colocadas na geladeira à 4°C. Para cada reação foram usados 5µL, sendo 2,5µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix, 0,5µL de H₂O, 0,5µL de primer forward, 0,5µL primer reverse e 1µL 1/10 de cDNA.

Para a melhor compreensão das análises os resultados foram apresentados a partir do modelo matemático estabelecido por Pfaffl (2001) que determinou a expressão relativa em qRT-PCR, cujos valores apresentados foram calculados a partir dos resultados do tratamento controle T0-H₂O. A expressão relativa mediu a alteração do mRNA dos genes alvos dos tratamentos T15-H₂O, T0-KNO₃ e T15-KNO₃ em relação aos níveis de expressão do mRNA do controle T0-H₂O.

5.3.2.5 Análises estatísticas

Análise de expressão de genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio em mudas de tomate. Os dados transformados com $\log_2 x$ foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) unidirecional seguida pelo teste t de Student no teste bicaudal, com significância de 5%. O teste t é preferido para os dados qRT-PCR.

Para a comparação das médias dos tratamentos foram usados os valores de *p*-Value da Ordered Difference Report. As letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste t de Student com 5% de significância.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 Genotipagem de tomateiros

Os tomateiros que não foram adubados mostraram as bandas mais definidas. Dos 6 primers propostos pelo protocolo (KORIR et al., 2013) quatro, Y35, Y53, Y27 e Y59, apresentaram as mesmas bandas em NF-T15 e NF-T0. Os resultados mostram que T15 e T0 são tomateiros da variedade comercial ‘Especial para Salada’. Ao longo de 15 anos, nos cultivos sucessivos do tomateiro ‘Especial para Salada’ da Topseed® no sistema de cultivo da agricultura natural, não ocorreu a criação de uma nova variedade que pudesse justificar as diferenças mostradas nos três capítulos deste trabalho. Portanto os resultados distintos apresentados por T15 e T0 são provenientes dos diferentes tratamentos aplicados em cada avaliação.

5.4.2 Estudos da atividade dos genes PAL, AAP2, LHT1, NRT1, NRT2 e NR em raízes e folhas dos tomateiros T15 e T0

5.4.2.1 Gene PAL – Fenilalanina amônia-liase

A menor expressão da PAL foi nas raízes de T0-KNO₃ (Figura 20A). T0-KNO₃ manteve a menor atividade da PAL em ambiente fertilizado, onde normalmente este gene tem a expressão diminuída. Em T0-H₂O a ausência de nutrientes na irrigação induziu à grande atividade da PAL sendo este resultado um padrão em meios distróficos. Após muitas gerações adubadas com nitrogênio inorgânico, no primeiro plantio sem este nutriente, este gene de pronto aumentou sua atividade em T0-H₂O. A atividade da PAL nas raízes de T0 sofreu somente a influência do meio em que foi cultivado neste trabalho.

A despeito de estarem em ambiente fertilizados com nitrato, as raízes de T15-KNO₃ tiveram a maior atividade da PAL por terem herdado esse nível de expressão de T15. T15-H₂O também apresentou grande atividade da PAL por se encontrar em ambiente sem fertilizante e por ter herdado de T15 uma grande atividade deste gene. Os compostos fenólicos, especificamente os flavonoides, resultantes da atividade da PAL nas raízes são sinalizadores das interações benéficas solo-planta-microrganismo existentes a pelo menos 140 milhões de anos (TAIZ et al. 2015).

Nas folhas (Figura 20B) não houve diferenças significativas entre a atividade da PAL em todos os tratamentos, assim como não houve diferenças significativas entre os teores de lignina das

folhas mostrados no Capítulo 1, cuja PAL (APÊNDICE C) é sua precursora na via bioquímica dos fenilpropanoides,

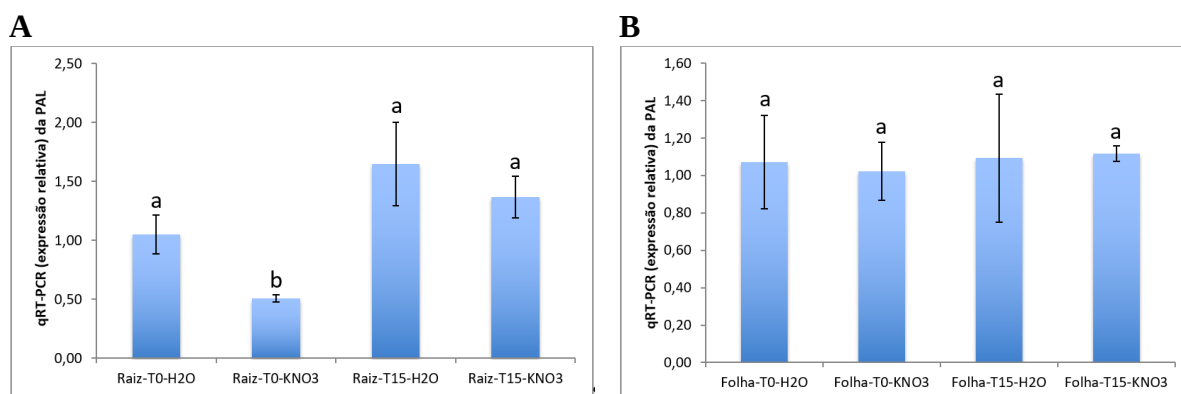


Figura 20 – Expressão do gene PAL em raízes (A) e folhas (B) do tomate ‘Especial para Salada’. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste t de Student com 5% de significância.

A PAL catalisa a desaminação não oxidativa da fenilalanina nas dicotiledôneas e a tirosina nas monocotiledôneas para formar o ácido trans-cinâmico e o ácido p-cumárico, respectivamente. Ela é a primeira enzima da via dos fenilpropanoides que produzem ligninas, cumarinas e flavonoides (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015; TAIZ et al. 2015).

Do ponto de vista fisiológico, a PAL é expressa constitutivamente nos vegetais e também pode ser induzida por exposição a estresse bióticos e abióticos. Os padrões de expressão da PAL são muito semelhantes para vários tecidos como folhas, calos, inflorescência e raízes. Em *A. thaliana*, AtPAL1 foi proposto como envolvido na lignificação destes órgãos (COCHRANE; DAVIN; LEWIS, 2004).

Em plantas cultivadas em ambientes não adubados a atividade da PAL aumenta quando comparados aos com mais nutrientes, da mesma forma que em ambientes mais ricos em nutrientes a atividade da PAL diminui (TAIZ et al. 2015). No entanto os resultados do presente estudo mostram que o sistema de produção adubado ou não a que foram submetidas as plantas que geraram as sementes T15 e T0 foi determinante na atividade da PAL nas raízes, pois o meio com ou sem KNO₃ não teve relevância para T15 expressar as maiores atividades deste gene, mas influenciou positivamente na expressão de T0 quando cultivado sem nitrato.

No campo experimental a menor atividade da PAL nos tomateiros OF-T0 pode ter contribuído para a maior suscetibilidade destas plantas que perderam 38,16% da produtividade total. A maior atividade da PAL em NF-T15 e NF-T0 pode ter contribuído para as menores perdas destes dois tratamentos, 5,90% e 8,13% respectivamente.

5.4.2.2 Gene AAP2 – Permease de Aminoácidos 2

As sementes T15 são significativamente mais pesadas que as T0. Logo, as sementes T15 têm mais nutrientes, entre eles os aminoácidos, em seus tecidos. A diferença significativa entre os pesos das sementes pode ser relacionada com a maior atividade de AAP2 como é mostrado por Kemp (2011). Os tratamentos T0-H₂O, T15-KNO₃ e T15-H₂O apresentaram as maiores atividades de AAP2 nas raízes (Figura 21A) indicando que os aminoácidos das sementes estão sendo transportados para onde são necessários: para própria raiz e para a parte aérea. T0-KNO₃ teve a menor atividade de AAP2 nas raízes, este resultado pode indicar que os teores externo e interno de nitrato podem ter induzido à menor atividade deste gene. As folhas de T15-H₂O tiveram maior expressão de AAP2 que as folhas de T0-H₂O (Figura 21B), indicando que T15 tem mais aminoácidos nos tecidos de reservas das sementes em função de serem mais pesadas que as sementes de T0. As plantas que geraram as sementes T0 foram sistematicamente adubadas com nitrato, ou outra forma de nitrogênio inorgânico, enquanto as que geraram as sementes T15 se desenvolveram com muito nitrogênio orgânico e ínfimas quantidades de nitrogênio inorgânico durante 15 plantios consecutivos. O tipo de nitrogênio na nutrição das plantas interferiu positivamente no peso das sementes T15. As folhas de T0-KNO₃ e T15-KNO₃ tiveram as atividades de AAP2 maiores que T15-H₂O e T0-H₂O por transportarem glutamina da intensa assimilação do nitrato nas folhas destes tratamentos.

O gene AAP2, com grande atividade nas membranas celulares de raízes, exerce a função molecular de simporte amino ácido-próton (H⁺), não dependendo de ATP para executar sua atividade. O AAP2 tem grande atividade nas raízes e no floema de folhas e sementes. O APP2 é um transportador com uma ampla especificidade para histidina, arginina, glutamato e aminoácidos neutros, favorecendo pequenos aminoácidos como alanina, asparagina e glutamina. Transporta também grandes resíduos aromáticos, como fenilalanina ou tirosina. Tem uma afinidade muito maior para aminoácidos básicos em comparação com AAP1. Nos tecidos verdes dos frutos, o gene AAP2 pode funcionar na transferência do xilema para o floema e na absorção de aminoácidos assimilados (FISCHER et al., 1995; KWART et al., 1993). Mutantes de *Arabidopsis thaliana* aap2 apresentam a largura da folha, o número de folhas e o número médio de siliquas reduzidos em comparação com as plantas do tipo selvagem. O peso individual da semente foi significativamente reduzido nos mutantes aap2, o que mostra a importância do gene AAP2 no carregamento de aminoácidos para o embrião em desenvolvimento. O desenvolvimento das sementes depende fortemente do sucesso da importação do nitrogênio

assimilado nas folhas e raízes e translocado para as sementes em desenvolvimento na forma de aminoácidos (KEMP, 2011).

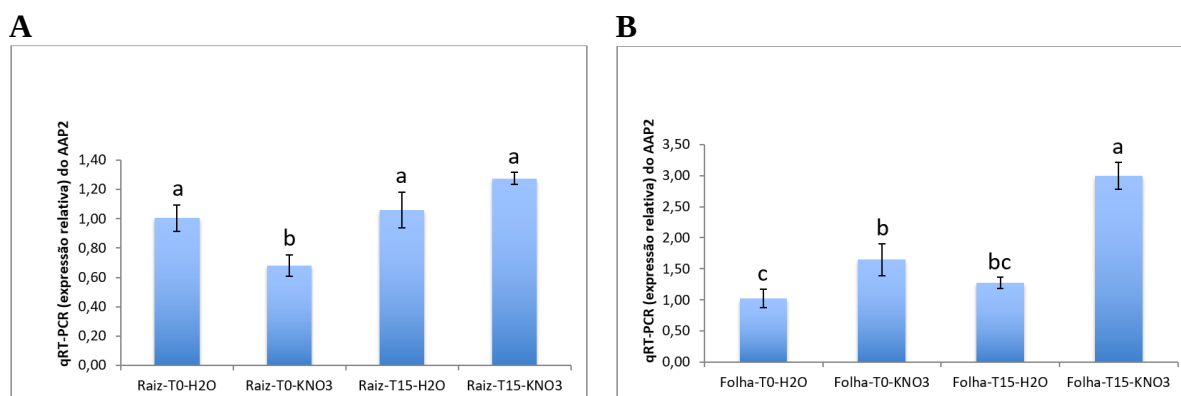


Figura 21 - Expressão do gene AAP2 em raízes (A) e folhas (B) de tomate ‘Especial para Salada’. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste t de Student com 5% de significância.

A menor atividade de NRT1 (Figura 23A) e a maior atividade de AAP2 (Figura 21A), ambas nas raízes, nos tratamentos não fertilizados indica que as plantas estão transportando mais aminoácido do que nitrato, ambos provenientes das reservas das sementes. T15-H₂O e T0-H₂O foram influenciadas pelo meio e expressaram as maiores atividades de AAP2. T0-KNO₃ foi influenciado pelo teor de nitrato e apresentou a menor atividade de AAP2 e T15-KNO₃ recebeu influência da herança e manteve a maior atividade do gene mesmo em ambiente com nitrato, mostrando com isso que as sementes T15 se tornaram mais aptas a captar aminoácidos que as sementes T0 em ambiente fertilizado. A atividade do gene AAP2 nas raízes de T0-KNO₃ foi significativamente menor que nos outros três tratamentos. Esta menor atividade no tratamento com 500 µM de KNO₃ foi influenciado pelo teor de nitrato e pode também ter sido por interferência da herança. Esta herança foi muito forte em T15-KNO₃ pois, estas plântulas herdaram de T15 a grande atividade deste gene nas raízes mesmo estando em ambiente fertilizado com nitrato, assim como T0-KNO₃ pode ter herdado de T0 a menor atividade de AAP2 nas raízes adquirida nos sucessivos plantios adubados. T15-H₂O e T0-H₂O apresentaram influência do sistema de produção adubado e não adubado em que se desenvolveram as plantas que produziram as sementes T15 e T0, sendo que T15 manteve a grande atividade de AAP2 em função dos estímulos recebidos em 15 plantios sem adubação e T0 aumentou a atividade deste gene já no primeiro momento em que foi exposto à ausência de nitrato. As sementes T0 originadas de plantas continuamente adubadas com nitrogênio inorgânico apresentaram a menor atividade de AAP2 no tratamento fertilizado T0-KNO₃, no entanto, mesmo passadas inúmeras gerações sob intensas adubações nitrogenadas, no primeiro plantio sem nitrogênio

inorgânico, este gene imediatamente aumentou sua atividade em T0-H₂O. As plantas adubadas têm preferência pelas altas quantidades de nitrato, como fonte de nitrogênio, mesmo que haja no solo aminoácidos em menores teores. Quando os teores de aminoácidos são mais que o dobro dos teores de nitrato, a planta passa usá-los como fonte de nitrogênio com o auxílio dos transportadores de aminoácidos das raízes. As plantas assimilam os aminoácidos em ambientes onde seus teores são bem maiores que as quantidades de nitrato, tal qual ocorre nos solos de ambientes não adubados como os de matas e florestas onde os teores de nitrato são de apenas pouco menos de 2% enquanto os teores de nitrogênio orgânico é de 98% do teor total de nitrogênio da matéria orgânica do solo (ASLAM; TRAVIS; RAINS, 2001; MALAVOLTA, 1976; PADGETT; LEONARD, 1993, 1996). Os teores de nitrogênio total dos solos agricultáveis variam, em geral, entre 0,02 e 0,5 dag kg⁻¹ (0,2 a 5 g de nitrogênio total por quilo de solo), sendo que. 98% desses teores encontram-se na forma orgânica. Os 2% restantes correspondem a formas inorgânicas, principalmente, nitrato e amônio (MALAVOLTA, 1976; MENDONÇA; MATOS, 2005).

O gene AAP2 transporta a fenilalanina, o substrato da PAL. Os resultados deste experimento mostraram que a menor expressão para AAP2 e PAL foram nas raízes de T0-KNO₃ (Figuras 21A e 20A). No campo a maior perda por lesões nos frutos causadas por pragas e doenças foi no tratamento adubado OF-T0, cujo correspondente no laboratório foi o tratamento T0-KNO₃. As atividades destes dois genes foram significativamente maiores para os outros tratamentos que apresentaram as menores perdas no campo. A combinação das maiores atividades de AAP2 e PAL (Figuras 21A e 20A) nas raízes de T15-H₂O pode ter ocorrido no campo em NF-T15 e ter produzido mais substâncias de defesa como ácido salicílico, ou mais cutina, nas plantas não adubadas, diminuindo assim a infestação por pragas e doenças no sistema de cultivo da agricultura natural na WVUOAF.

O gene AAP2 transporta a glutamina. O tratamento das raízes com glutamina ativou a transcrição em cascata de uma grande variedade de genes relacionados à defesa, tanto nas raízes quanto nas folhas. Nas folhas foram induzidos, por este tratamento, genes que respondem ao ácido salicílico, não havendo indução do ácido jasmônico nem dos genes que respondem ao etileno. A resistência induzida por aminoácidos depende parcialmente da via do ácido salicílico (KADOTANI et al., 2016). O ácido salicílico é um composto fenólico que se acumula em níveis elevados na vizinhança de infecções. Ele é derivado da via fenilpropanoides, e inúmeros papéis de defesa da planta têm sido propostos para o ácido salicílico, incluindo a resistência adquirida sistêmica. O ácido salicílico, uma molécula de sinalização importante nas plantas, é sintetizado

a partir do ácido cinâmico produzido pela atividade da PAL. O silenciamento de genes da PAL no tabaco ou a inibição química da atividade PAL em *Arabidopsis*, pepino e batata reduz o acúmulo de ácido salicílico induzido por patógenos. Assim, o ácido salicílico está diretamente relacionado com a atividade da PAL. (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015; CHEN et al., 2009).

No campo experimental a maior atividade do gene AAP2 nos tomateiros NF-T0 e NF-T15 pode ter contribuído para a menor suscetibilidade destas plantas e para as maiores produtividades 37,70 t/ha e 29,18 t/ha, respectivamente. Estas produtividades podem ter sido fortemente influenciadas pelo nitrogênio orgânico que nutriu as plantas, conferindo assim as maiores atividades dos genes AAP2, LHT1 e de outros transportadores de aminoácidos nos solos dos cultivos da agricultura natural.

5.4.2.3 Gene LHT1 – Transportador de Lisina e Histidina 1

As raízes de T15-H₂O (Figura 22A) tiveram as maiores atividades de LHT1 enquanto as do T0-KNO₃ apresentaram a menor atividade. A origem da semente foi determinante na expressão de LHT1, porém o meio também influenciou fortemente a expressão deste gene, tanto em T0 quanto em T15. A atividade de LHT1 nas raízes foi significativamente maior em T0-H₂O que em T0-KNO₃ assim como foi maior em T15-H₂O ao ser comparado com T15-KNO₃ (Figura 22A) evidenciando as nítidas influências negativa dos 500 µM de KNO₃ e positiva do tratamento sem fertilizantes sobre a expressão do LHT1. O gene AAP2 e LHT1 das raízes transportam a glutamina, um aminoácido importante em rotas de defesa das plantas como a via do ácido salicílico que é influenciado pela PAL. As expressões dos genes PAL, AAP2 e LHT1 (Figuras 20A, 21A e 22A) nas raízes foram as maiores para T15-H₂O e as menores para T0-KNO₃ o que pode inferir um cenário no campo experimental em que a atividade conjunta e simultânea destes genes nas raízes é diretamente proporcional à produtividade de T15 e T0. A atividade da NR nas folhas dos tratamentos não fertilizados (Figura 25B) foram as menores por falta de nitrato exógeno. Isso indica que os aminoácidos dos tecidos de reservas das sementes foram transportados pela atividade de AAP2 e LHT1 (Figuras 21B e 22B). A grande atividade da NR nas raízes de T15-H₂O assimilou o nitrato, que estava estocado nas sementes, em aminoácidos que foram transportados por esses genes. As folhas dos quatro tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre as médias de atividade de LHT1 (Figura 22B). O gene LHT1, com grande atividade nas membranas celulares de folhas e raízes, exerce a função

molecular de simporte amino ácido-próton (H^+), não depende de ATP para executar sua atividade. O gene LHT1 é um transportador com especificidade ampla para histidina, lisina, ácido glutâmico, glutamina, alanina, serina, prolina e glicina. O LHT1 está envolvido tanto na captação de aminoácidos pelo apoplasto das raízes quanto no transporte de aminoácidos nas folhas via apoplasto (CHEN; BUSH, 1997; HIRNER et al., 2006; SVENNERSTAM et al., 2007; SVENNERSTAM; GANETEG; NÄSHOLM, 2008).

No campo experimental a atividade intermediária do gene LHT1 nos tomateiros NF-T0 e a maior atividade em NF-T15 pode ter contribuído para a menor suscetibilidade destas plantas e para as maiores produtividades 37,70 t/ha e 29,18 t/ha, respectivamente. Os tomateiros OF-T0 produziram 26,65 t/ha. Esta baixa produtividade pode estar relacionada a menor atividade do gene LHT1 que regula a captação dos aminoácidos histidina, lisina, ácido glutâmico, glutamina, alanina, serina, prolina e glicina.

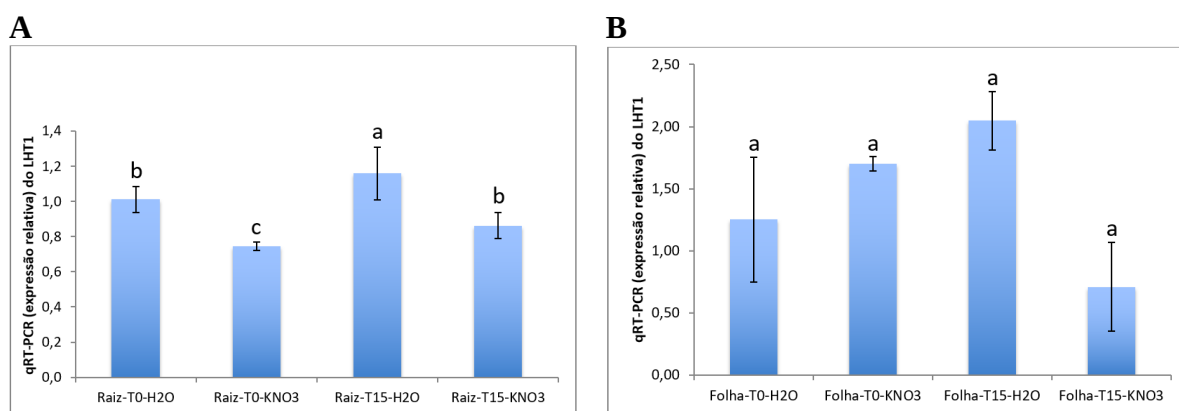


Figura 22 - Expressão do gene LHT1 em raízes (A) e folhas (B) de tomate 'Especial para Salada'. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste t de Student com 5% de significância.

5.4.2.4 Genes NRT1 e NRT2 – Transportadores de Nitrato 1 e 2

Duas famílias de genes transportadores de nitrato, NRT1 e NRT2, foram descobertas até agora. O NRT1 é transportador simporte com alta e baixa afinidades com nitrato acoplado ao H^+ localizado na membrana plasmática. Não há homologia de sequências entre as famílias NRT1 e NRT2. O NRT2 é um transportador simporte com alta afinidade com nitrato acoplados ao H^+ . A família dos transportadores simportes NRT1 e NRT2 funcionam na captação e transporte de nitrato através da membrana plasmática e apenas o NRT2 atua no tonoplasto (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

A atividade de NRT1 nas raízes (Figura 23A) foi influenciada pelo meio. T15-H₂O e T0-H₂O tiveram as menores atividades deste gene e T0-KNO₃ e T15-KNO₃ as maiores expressões de

NRT1. A maior atividade de NRT1 nas raízes dos tratamentos irrigados com 500 μM de KNO_3 induziu o envio imediato do nitrato para a parte aérea das mudas T0- KNO_3 e T15- KNO_3 direcionando para as folhas quantidades grandes de nitrato. O nitrato enviado para a parte aérea das mudas foi imediatamente assimilado pela intensa atividade da NR nas folhas de T0- KNO_3 e de T15- KNO_3 (Figura 25B). Nas raízes a menor atividade da NR (Figura 25A) nos tratamentos fertilizados indica que os grandes teores de nitrato foram transportados pelo NRT1 para a parte aérea, diminuindo, assim, os teores de nitrato e a atividade do gene NR neste órgão. A grande assimilação do nitrato nas folhas de T0- KNO_3 e T15- KNO_3 e o fato das sementes T15 serem significativamente 18% mais pesadas que as T0 pode ser uma das causas das plântulas T15- KNO_3 produzissem folhas cotiledonares mais robustas que as plantas T0- KNO_3 (Figura 17B).

O nitrato induz a expressão de muitos genes e também da sua própria via de assimilação, incluindo aqueles codificadores da NR, nitrito redutase, e muitos transportadores das famílias NRT1 e NRT2. A indução dos genes NRT1 e NRT2 é mantida em mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes em NR incapazes de reduzir o nitrato a nitrito indicando que o nitrato, por si só, é a molécula sinal. A expressão de até 10% do genoma, ou seja, mais de 2000 genes, está sob controle do fornecimento de nitrato. A indução do nitrato sobre a expressão de muitos destes genes ocorre muito rapidamente, dentro de minutos, sem requerer síntese de proteína. Essa rápida indução afeta uma grande variedade de categorias de genes funcionais, incluindo o transporte de íons, os metabolismos primários e secundários, a biossíntese de ácidos nucleicos, o processamento e a transcrição do RNA e a homeostase hormonal. (BOUGUYON; GOJON; NACRY, 2012). O gene NRT1 atua também como um sensor de nitrato, uma sentinela bem na ponta das raízes que desencadeia uma cascata de sinalização específica, que estimula o crescimento de raízes laterais e a germinação de sementes. A atividade de captação não é necessária para o NRT1 atuar na função de sensor de nitrato (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015; MARSCHNER, 2012). A família NRT2 codifica transportadores que contribuem para o sistema de captação induzível de alta afinidade (HATS). A família NRT1 é mais complexa, incluindo transportadores de nitrato com afinidade dupla, alta ou baixa, ou apenas baixa afinidade (LATS). O transporte de nitrato em baixas concentrações, 0,5 mM (<500 μM) envolve o sistema de transporte de alta afinidade de NRT2 em raízes que, dependendo das condições fisiológicas sob as quais as plantas são cultivadas, incluem também o transportador de nitrato NRT1 (ALBORESI et al., 2005; MARSCHNER, 2012). A captação de nitrato através da membrana plasmática é um processo de transporte ativo com gasto de energia. O sistema de transporte de alta afinidade HATS é dividido em um componente constitutivo, que é expresso

na ausência de nitrato, e um componente induzível, que é acionado pelo tratamento com nitrato. O sistema de transporte de baixa afinidade LATS comandado pela família NRT1 é mais observável em uma concentração de nitrato superior a 0,5 mM (>500 μ M). Estas vias importantes permitem que as plantas acomodem uma ampla gama de concentrações de nitrato externo de 5 μ M a 50 mM (5 a 50.000 μ M) sem experimentar deficiência grave ou toxicidade. (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015; MARSCHNER, 2012).

Nas raízes a expressão de NRT1 e NRT2 em *Arabidopsis thaliana* para a absorção de nitrato é restrita às camadas de células radiculares externas que incluem a epiderme, o córtex e a endoderme. NRT2 é expressado principalmente na parte basal, a porção mais antiga da raiz, enquanto que NRT1 é mais expressado nas áreas jovens das raízes, na porção terminal que inclui a coifa e a região meristemática onde ocorrem a diferenciação e o alongamento celular. Em função da grande atividade nessas regiões das raízes os genes da família NRT1 são caracterizados como sentinelas, sensores da disponibilidade de nitrato no solo. Por isso, os níveis de expressão dos genes NRT1 e NRT2 são regulados de maneiras diferentes em função dos teores de nitrato e dos teores das formas reduzidas de nitrogênio, como amônio, aminoácidos, peptídeos e proteínas, encontrados na rizosfera. O gene NRT1 atua como um transportador fortemente envolvido na translocação de nitrato da raiz para os galhos e folhas. O transporte de nitrato da raiz para as folhas é feito pelo xilema. Para o carregamento do xilema, o nitrato deve ser transportado para fora das células parenquimatosas próximas a estes feixes condutores. O NRT1, expresso nas células de periciclo ao lado do xilema da raiz, é o responsável pelo carregamento do xilema com nitrato (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

As raízes das plantas T15-H₂O e T0-H₂O apresentaram atividade baixa do gene NRT1 pela ausência de nitrato e alta atividade do NRT2 pela presença de nitrato no embrião das sementes (Figuras 23A e 24A). O transportador NRT2 localizado no tonoplasto do embrião descarrega o nitrato armazenado nos vacúolos das sementes para as vias metabólicas em que o nitrogênio é necessário durante a germinação (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015). A baixa atividade de NRT1 nas raízes de T15-H₂O e T0-H₂O (Figura 23A) não transportou todo o nitrato, carregado dos vacúolos pela alta atividade de NRT2 (Figura 24A), para as folhas, mantendo boa parte do nitrogênio nas células radiculares onde é rapidamente reduzido pela grande atividade da NR (Figura 25A) e em seguida assimilado em proteínas indispensáveis ao desenvolvimento das raízes. As atividades de NRT1, NRT2 e NR nas raízes dos tratamentos T15-H₂O e T0-H₂O caracterizam um ambiente com pouco nitrato exógeno e dependente do

nitrato endógeno que, possivelmente, direciona as rotas metabólicas para o grande desenvolvimento inicial das raízes. A atividade dos genes NRT1, NRT2 e NR nos solos não adubados da agricultura natural e nos solos adubados da agricultura orgânica deste experimento pode ser um caminho para explicar o rápido desenvolvimento de caules e folhas das plantas adubadas no campo e o lento crescimento inicial da parte aérea dos tomateiros cultivados na agricultura natural.

O suprimento de nitrogênio inorgânico tem um efeito forte e consistente na partição da matéria seca entre a parte aérea e a raiz das plantas vasculares desde a fase da plântula até a maturidade. Especificamente, a razão do peso seco entre a parte aérea e a raiz aumenta com a elevação da oferta de nitrogênio inorgânico ao longo do desenvolvimento das plantas em solos naturais e agrícolas (ANDREWS; RAVEN; LEA, 2013; KRUGER; HILL; RATCLIFFE, 1999; SCHEIBLE et al., 1997).

Nas folhas T15-H₂O e T15-KNO₃ apresentaram as menores atividades de NRT1 e em T0-H₂O e T0-KNO₃ houve as maiores expressões de NRT1. Por estes resultados as plantas T0 têm uma capacidade maior de remobilizar o nitrogênio. Enquanto as plantas T15 remobilizam menos este elemento químico. As plantas de tomate ‘Especial para Salada’ da Topseed® foram sistematicamente adubadas com nitrato, passando esta informação para as sementes T0, as quais tiveram as maiores atividades de NRT1 nas folhas (Figura 23B) mesmo cultivadas apenas em água pura.

A maior atividade de NRT1 nas folhas de T0-H₂O ocorreu porque há nitrato nos tecidos de reserva da semente que se desenvolveram como folhas cotiledonares. A maior atividade de NRT1 nas folhas de T0-KNO₃ pode ser devido ao KNO₃ da solução ou apenas devido ao nitrato contido nas reservas das folhas cotiledonares, já que, em T15-KNO₃ o nitrato da solução não aumentou a atividade de NRT1 nas folhas. As menores atividades de NRT1 nas folhas de T15-H₂O e T15-KNO₃ indicam que os tecidos de reserva das sementes T15 tinham nitrato em quantidades ínfimas. T0-KNO₃ e T15-KNO₃ apresentaram grande atividade nas raízes de NRT1 e grande atividade de NR nas folhas indicando que o nitrato da adubação foi transportado e assimilado nas folhas. A atividade de NRT1 nas folhas de T15 foram as menores mostrando que estas sementes geraram plantas com pouca remobilização do nitrato nos tomateiros adubados ou não adubados. A presença ou ausência de nitrato nas folhas cotiledonares está diretamente relacionada ao sistema de cultivo a que foram submetidas T0 e T15, já que o teor de nitrato das sementes está diretamente relacionado aos níveis de nitrato do solo (GALLAGHER, 2014) o que mantém uma correlação positiva entre a dose de nitrato fornecida

à planta-mãe e os níveis deste nitrogênio inorgânico encontrados nas sementes (ALBORESI et al., 2005).

Estes resultados também são consistentes com o que se observa em folhas de *Arabidopsis thaliana* onde ocorre intensa remobilização de nitrogênio quando a planta detecta a diminuição de nitrato no solo ou porque a planta entrou na fase reprodutiva quando há diminuição das atividades em NRT1 e NRT2 nas raízes assim a planta passa a contar com outras fontes de nitrogênio como as fornecidas pela degradação primeiramente dos cloroplastos e posteriormente de outras organelas celulares (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010).

A família NRT1 de *Arabidopsis* está envolvida na remobilização do nitrato. A remobilização de nitrato, da fonte para os tecidos drenos, ocorre pelo transporte do floema nas folhas feito por membros da família de genes NRT1. A remobilização ocorre não apenas de folha para folha durante a fase vegetativa, mas também da folha para as sementes durante a fase reprodutiva. O transportador de nitrato NRT1 é responsável pela remobilização do nitrato de folhas mais antigas para tecidos que exigem nitrogênio, tais como folhas jovens e sementes (FAN et al., 2009). O processo de remobilização de nitrogênio nas folhas é maior quando ocorre o aumento da indução dos genes GLN1, codificador da glutamina sintase, por fatores abióticos como a presença de nitrato transportado das raízes para as folhas pelo gene NRT1 em plantas adunadas com nitrato (DECHORGNAT; CHARDON; GAUFICHON, 2010; FAN et al., 2009; PÉREZ-GARCIA et al., 1998).

A atividade de NRT1 nas folhas (Figura 23B) não foi influenciada pelo meio e sim pela ausência ou presença de nitrato nos sistemas de cultivos a que foram submetidas as plantas que geraram T15 e T0. A atividade de NRT1 foi menor nas folhas de T15 fertilizado ou não (Figura 23B). Nas folhas de T0, a maior atividade de NRT1 ocorreu tanto no tratamento fertilizado quanto no não fertilizado. Devido a estes resultados, entre os seis genes estudados neste trabalho, o único que pode ter tido alteração epigenética é o gene NRT1 nas folhas. O termo epigenético refere-se a todas as mudanças reversíveis e herdáveis no genoma funcional que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA e que ocorrem em função de adaptações ao meio ambiente. Fatores ambientais podem mudar a maneira como os genes são expressos, sendo que os padrões de expressão epigenéticos são passados obrigatoriamente para os descendentes. (GRAFI; OHAD, 2013; MEYER, 2005; IWASAKI; PASZKOWSKI, 2014).

As menores atividades de NRT1 nas folhas de T15 indicam que a remobilização do nitrogênio foi menor mesmo quando T15 foi cultivada uma única vez em solução com 500 μ M de nitrato,

enquanto as maiores atividades de NRT1 nas folhas de T0 mostram que a remobilização foi maior nas plântulas destas sementes quando cultivadas apenas com água. As plantas de tomate cultivados na agricultura química apresentam intensa remobilização do nitrogênio nas folhas de plantas adubadas com nitrato e por isso o INCAPER recomendou para o solo do sítio Alice (APÊNDICE D) que cada planta de tomate, já adubada na cova, recebesse por cobertura 15 g da formulação 20-00-15 de NPK a cada 15 dias, sendo a primeira aplicação no 15º dia após o plantio até o 60º dia. Do 75º ao 120º dia cada planta teria que receber a cada 15 dias 20 g da formulação 10-00-15 de NPK. Tanto o nitrogênio quanto o potássio são extremamente móveis nas plantas quanto nos solos. As adubações por cobertura aplicadas diretamente sobre as folhas são feitas para diminuir a remobilização do nitrogênio, e também do potássio, das folhas mais antigas para as mais novas nos plantios de tomate cultivados pela agricultura convencional (FILGUEIRA, 2003; INCAPER, 2010; PROHENS; NUEZ, 2008).

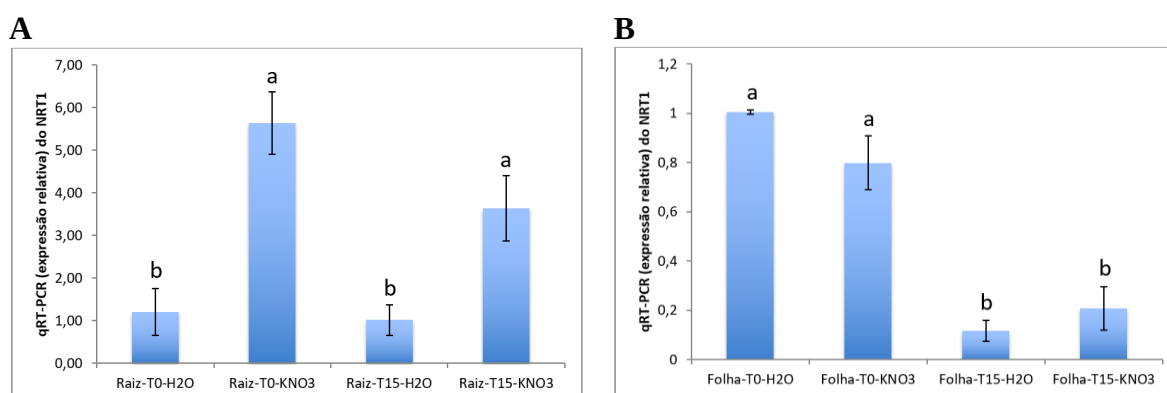


Figura 23 - Expressão do gene NRT1 em raízes (A) e em folhas (B) de tomate 'Especial para Salada'. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste t de Student com 5% de significância.

5.4.2.5 Gene NRT2 – Transportador de Nitrato 2

A grande atividade de NRT1 nas raízes fertilizadas (Figura 23A) indica que a captação de nitrato está acima de 500 μ M. O nitrato descarregado dos vacúolos das sementes pela grande atividade de NRT2 (Figura 24A), somado aos 500 μ M da fertilização podem ter induzido às maiores atividades do NRT1 nas raízes fertilizadas. A atividade de NRT2 nas raízes não fertilizadas (Figura 24A) indica que a captação de nitrato está abaixo de 500 μ M e que ele é, certamente, proveniente dos teores armazenados nos vacúolos do embrião das sementes. Os baixos teores de nitrato em T15-H₂O e T0-H₂O foram pouco transportados para a parte aérea, pois eles mantiveram a menor atividade de NRT1 nas raízes (Figura 23A). O nitrato foi mais assimilado nas raízes onde ocorreu a maior atividade da NR (Figura 25A) nos tratamentos T15-H₂O e T0-H₂O. A maior assimilação do nitrato nas raízes de T15-H₂O e T0-H₂O pode ter

direcionado as plantas nos estágios iniciais de desenvolvimento a investirem mais nas raízes do que em folhas e caules. O transportador NRT2 localizado no tonoplasto do embrião descarrega o nitrato armazenado nos vacúolos das sementes para as vias metabólicas em que o nitrogênio é necessário (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015). As sementes podem absorver nitrato durante o desenvolvimento da planta ou diretamente do teor de nitrato do solo após a maturação e a dispersão. Em espécies como *Arabidopsis thaliana*, o teor de nitrato das sementes está diretamente relacionado aos níveis de nitrato do solo (GALLAGHER, 2014) o que mantém uma correlação positiva entre a dose de nitrato dada à planta-mãe e a capacidade germinativa das sementes produzidas (ALBORESI et al., 2005).

As plantas não fertilizadas T15-H₂O e T0-H₂O foram as que tiveram as menores atividades de NRT2 nas folhas. Nos campos da WVUOAF as plantas não adubadas, NF-T15 e NF-T0, foram as menos infestadas por doenças e pragas e por isso as mais produtivas. As plântulas fertilizadas T15-KNO₃ e T0-KNO₃ tiveram as maiores expressões do gene NRT2 nas folhas (Figura 24B). Nos campos da WVUOAF os tomateiros adubados com composto orgânico, OF-T0 e OF-T15, foram os mais infestados por parasitos nos canteiros e por isso as menos produtivas. Para reduzir a atividade de NRT2 com o intuito de aumentar a resistência das plantas às bactérias, a atitude mais certa é não adubar com nitrato os campos agrícolas. Não houve diferenças significativas na atividade de NRT2 nas raízes (Figura 24A).

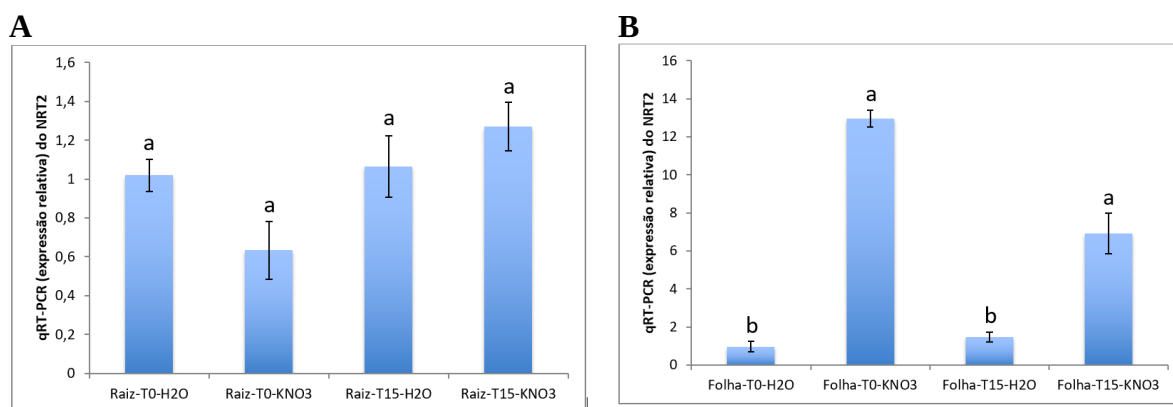


Figura 24 - Expressão do gene NRT2 em raízes (A) e em folhas (B) de tomate 'Especial para Salada'. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste t de Student com 5% de significância.

Para uma resposta de defesa eficaz contra patógenos, as plantas devem coordenar uma reprogramação genética rápida para produzir uma interação incompatível. Há um papel adicional para o gene NRT2 que o liga à resistência de plantas contra patógenos e que muito provavelmente ocorreu neste experimento como uma das defesas dos tomateiros estudados. A atividade do gene NRT2 antagoniza a preparação da defesa vinda do ácido salicílico contra o

agente patogênico bacteriano *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (*Pst*). O mutante *nrt2*, deficiente nos genes NRT2.1 e NRT2.2, exibe resistência a esta bactéria por meio do ácido salicílico. O estímulo às condições ambientais que induzem à inibição do gene NRT2.1 influenciam positivamente na resistência à *Pst*, independentemente do nível total de nitrogênio endógeno nas plantas de tomate. A susceptibilidade causada pela bactéria foi alterada em *nrt2*, provavelmente devido à resistência à fitotoxina bacteriana coronatina. A resistência de mutantes *nrt2* parece ser uma combinação da preparação das defesas dependentes do ácido salicílico e a sensibilidade reduzida à coronatina bacteriana (CAMAÑES et al., 2012). Portanto, para ativar as defesas decorrentes da não expressão do NRT2, como o descrito por Camañes et al. (2012), basta não adubar as plantas com nitrato, como ocorreu no cultivo da agricultura natural neste experimento.

5.4.2.6 Gene NR – Redutase do Nitrato

As plantas não fertilizadas T15-H₂O e T0-H₂O têm as menores atividades de NR nas folhas (Figura 25B) e as menores expressões de NRT1 nas raízes (Figura 23A) mostrando que o nitrato endógeno disponível foi mais assimilado nas raízes do que na parte aérea. Para NR o meio foi determinante na expressão deste gene nas raízes e nas folhas. A atividade da NR foi maior nas folhas e menor nas raízes de *Arabidopsis thaliana* cultivadas em solução com 5.000 µM KNO₃ (WANG et al., 2004) e de cevada (*Hordeum vulgare* L.) (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015). A maior atividade da NR nas folhas foi em consequência da maior atividade de NRT1 nas raízes como Wang et al. (2004) mostrou em *Arabidopsis thaliana*. As plantas T0-KNO₃ e T15-KNO₃ apresentaram estes mesmos padrões para NRT1 (Figura 23A) e NR (Figura 25B) em plantas fertilizadas com nitrato, o que evidencia o grande transporte de nitrato para a parte aérea onde há mais espaço físico e mais estímulos, CO₂, O₂ e luz, para que a atividade da NR tenha sido maior neste experimento e nos trabalhos de Buchanan, Gruissem e Jones (2015) e Wang et al. (2004).

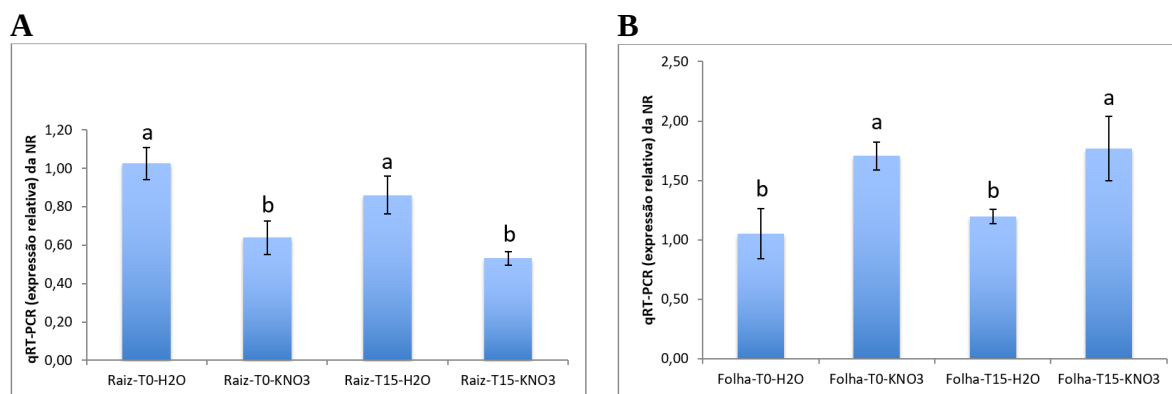


Figura 25 - Expressão do gene NR em raízes (A) e em folhas (B) de tomate ‘Especial para Salada’. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste t de Student com 5% de significância.

5.4.2.7 Interatividade dos genes PAL, AAP2, LHT1, NRT1, NRT2 e NR

Nos tratamentos fertilizadas a produção de aminoácidos a partir do nitrato exógeno foi determinante para as atividades de AAP2, LHT1 e NR nas folhas (Figuras 21B, 22B e 25B) terem sido as maiores quando comparadas com os tratamentos não fertilizados. A atividade conjunta desses genes mostra que os tratamentos fertilizados ocasionam uma intensa produção, e transporte via floema, de aminoácidos nos tomateiros do laboratório e nos campos. As moscas-brancas (*Bemisia tabaci*) percebem a maior circulação de aminoácidos no floema nas plantas de algodão fertilizadas com 2mM de KNO₃ e por isso infestaram mais essas plantas que as não fertilizadas com nitrato (CRAFTS-BRANDNER, 2002).

As atividades dos genes NRT1, NRT2 e NR nos tratamentos não fertilizados e nos tratamentos fertilizados (Figuras 23, 24 e 25) mostrou que a maior assimilação do nitrato nas folhas de T0 e T15 começou com a percepção, pelo NRT1 (Figura 23A) localizado na ponta das raízes e radículas, da presença de 500 µM de nitrato na solução irrigada dos tratamentos fertilizados. As folhas de T15-H₂O foram as que tiveram menos nitrato em seus tecidos, pois os genes NRT1, NRT2 e NR (Figuras 23B, 24B e 25B) apresentaram as mais baixas atividades entre os tratamentos. Por outro lado, as folhas de T0-KNO₃ tiveram mais nitrato devido aos genes NRT1, NRT2 e NR (Figuras 23A, 24A e 25A) apresentarem as mais altas atividades nas raízes deste tratamento quando comparado com os outros. Os resultados de campo, apresentados no Capítulo 1, dos tratamentos não adubados NF-T15 e NF-T0 e dos tratamentos adubados OF-T0 e OF-T15 podem ser explicados, em parte, pelos resultados de expressão dos genes NRT1, NRT2 e NR obtidos nos tratamentos irrigados com H₂O e nos fertilizados com 500 µM de KNO₃ em laboratório. Nos canteiros da WVUOAF NF-T15 perdeu apenas 5,90% de sua produtividade total por causa de lesões provocadas por pragas e doenças enquanto OF-T0

perdeu, também por lesões, 38,16% de seus frutos. De acordo com os resultados encontrados por Camañes et al. (2012) em mutantes *nrt2* de *Arabidopsis thaliana* e levando-se em conta a relação entre os resultados de campo e de laboratório, a maior atividade de NRT2 nas folhas de OF-T0 (Figura 24B) pode ter deixado as plantas menos resistentes aos patógenos, assim como a menor atividade deste gene nas folhas de NF-T15 (Figura 24B) pode ter conferido uma grande resistência a bactérias, o que pode explicar as menores perdas de produtividade no campo.

Nas raízes as maiores atividades dos três genes influentes nas defesas de plantas PAL, AAP2 e LHT1 (Figuras 20A, 21A e 22A) em T15-H₂O aliadas às menores atividades dos genes NRT1, NRT2 e NR nas folhas (Figuras 23B, 24B e 25B) mostraram que pouco nitrato foi assimilado nas folhas, o que pode ter levado as plantas NF-T15 a perderem menos frutos no sistema de cultivo não adubado. Ainda, nas raízes as menores atividades da PAL, AAP2 e LHT1 (Figuras 20A, 21A e 22A) em T0-KNO₃ somadas às maiores atividades nas folhas dos genes NRT1, NRT2 e NR (Figuras 23B, 24B e 25B) mostrou que houve grande captação de nitrato nos solos com pequena assimilação nas raízes e com grande assimilação nas folhas podendo esta diferença do local de assimilação ser uma das causas de as plantas perderem muitos frutos lesionados no sistema de cultivo adubado por composto orgânico. A capacidade de remobilização do nitrogênio nas folhas das plantas T0 foi marcada pela maior atividade do gene NRT1, e isto pode ser uma das causas das plantas T0 terem sido as mais infestadas por pragas e doenças dentro de cada sistema de cultivo nos campos da WVUOAF. Nos tomateiros T0 e T15 a remobilização não sofreu influência do meio e sim da herança epigenética.

Os genes PAL, AAP2 e LHT1 (Figuras 20A, 21A e 22A) nas raízes de T0 no primeiro plantio sem fertilizante a base de nitrato alcançaram os níveis de atividade de T15 na agricultura natural. A presença de nitrato na solução diminuiu significativamente a atividade destes três genes nas sementes T0. Quando a atividades destes genes foram simultaneamente as menores em T0, houve perda de 38,16% da produtividade total no cultivo com adubo orgânico da agricultura orgânica. A combinação das maiores atividades destes genes, possivelmente, fez com que as plantas T0 perdessem 8,14% dos frutos no cultivo da agricultura natural. Esses resultados mostram que a variedade de tomate ‘Especial para Salada’ da Topseed® (T0) adaptou rapidamente suas rotas metabólicas ao sistema de cultivo da agricultura natural.

5.5 CONCLUSÕES

É muito possível que a quebra de resistência de inúmeras variedades comerciais seja feita pela intensa atividade do NRT1 nas plantas continuamente adubadas com nitrato por várias gerações como o ocorrido nas sementes T0 da variedade comercial ‘Especial para Salada’ da Topseed®.

A menor suscetibilidade de T15 no campo, provavelmente, foi devido à menor atividade de NRT1 nas folhas em ambientes com e sem nitrato. A maior resistência das plantas NF-T15, possivelmente, foi obtida pela menor atividade do NRT1 nas folhas dos tomateiros continuamente cultivados sem adubos à base de nitrato, por 15 plantios consecutivos.

Nos tratamentos sem e com nitrato as folhas das plantas T0 tiveram a maior atividade do NRT1 devido à presença de nitrato acumulado nas sementes. Este resultado indica que tomateiros provenientes de sementes continuamente adubadas com nitrato apresentam a remobilização do nitrato como característica na germinação e isto pode estar diretamente relacionado à maior suscetibilidade das plantas T0 no campo.

Nos tratamentos sem e com nitrato as folhas das plantas T15 tiveram a menor atividade do NRT1 em função dos ínfimos teores de nitrato nas sementes. Este resultado indica que tomateiros provenientes de sementes continuamente cultivadas sem adubos não apresentam a remobilização do nitrato como característica na germinação, podendo ser esta característica a origem da maior resistência das plantas T15 no campo.

As plantas T0-KNO₃ e T15-KNO₃, que apresentaram as maiores atividades de NRT1 nas raízes, tiveram no campo, OF-T0 e OF-T15 respectivamente, as maiores perdas. As plantas T15-H₂O e T0-H₂O, que apresentaram as menores atividades de NRT1 nas raízes foram as que tiveram as menores perdas no campo, NF-T15 e NF-T0, respectivamente.

Mais estudos são necessários para mostrar a importância da atividade de NRT1 na perda de defesa das plantas de tomate em solos adubados com nitrato.

A atividade de NRT2 nas folhas foi diretamente proporcional à infestação de pragas e doenças no campo.

Em T15 a PAL manteve alta atividade indicando que os tomateiros adubados ou não adubados produziram flavonoides sinalizadores da interação solo-planta-microrganismo. Estas interações podem ter beneficiado as plantas com uma melhor resistência a pragas e doenças. A menor atividade de T0 adubado diminuiu a capacidade de interação destas plantas com o meio ambiente.

Em T15 fertilizado ou não os genes AAP2 e LHT1 tiveram altas atividades mostrando que a planta se mantém apta a captar aminoácidos do solo. T0 fertilizado diminuiu esta capacidade ao apresentar a menor atividade para AAP2 e LHT1.

Em um mundo onde a demanda de alimentos livres de agrotóxicos é vertiginosamente crescente, parece ser um mal negócio nutrir as plantas com adubos que contenham nitrato.

5.6 REFERÊNCIAS

- ALBORESI, A. et al. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. **Plant, Cell and Environment**, Versailles, v. 28, n. 4, p. 500–512, 2005. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01292.x
- ANDREWS, M.; RAVEN, J. A.; LEA, P. J. Do plants need nitrate? the mechanisms by which nitrogen form affects plants. **Annals of Applied Biology**, Lincoln, v. 163, n. 2, p. 174–199, 2013. doi: 10.1111/aab.12045
- ASLAM, M.; TRAVIS, R. L.; RAINS, D. W. Differential effect of amino acids on nitrate uptake and reduction systems in barley roots. **Plant science : an international journal of experimental plant biology**, Davis, v. 160, n. 2, p. 219–228, 2001. 10.1016/S0168-9452(00)00391-5
- BOUGUYON, E.; GOJON, A.; NACRY, P. Nitrate sensing and signaling in plants. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, Montpellier, v. 23, n. 6, p. 648–654, 2012. doi:10.1016/j.semcdb.2012.01.004
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (EDS.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2nd ed. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. ISBN: 9780470714218, ISBN: 9780470714225
- CAMAÑES, G. et al. A Deletion in NRT2.1 Attenuates *Pseudomonas syringae*-Induced Hormonal Perturbation, Resulting in Primed Plant Defenses. **Plant Physiology**, Castellon, v. 158, n. 2, p. 1054–1066, 2012. doi: 10.1104/pp.111.184424
- CHEN, L.; BUSH, D. R. LHT1, a lysine- and histidine-specific amino acid transporter in *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, Champaign, v. 115, n. 3, p. 1127–1134, 1997. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.115.3.1127>
- CHEN, Z. et al. Biosynthesis of salicylic acid in plants. **Plant signaling & behavior**, West Lafayette, v. 4, n. 6, p. 493–496, 2009. doi: 10.4161/psb.4.6.8392
- COCHRANE, F. C.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: Kinetic characterization of the four PAL isoforms. **Phytochemistry**, Pullman, v. 65, n. 11, p. 1557–1564, 2004. doi:10.1016/j.phytochem.2004.05.006

CRAFTS-BRANDNER, S. J. Plant nitrogen status rapidly alters amino acid metabolism and excretion in *Bemisia tabaci*. **Journal of Insect Physiology**, Phoenix, v. 48, n. 1, p. 33–41, 2002. doi: 10.1016/S0022-1910(01)00140-8

DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L. Nitrogen uptake , assimilation and remobilization in plants : challenges for sustainable and productive agriculture. Versailles, p. 1-12, 2010. **Journal of Experimental Botany**, Versailles doi:10.1093/jxb/erq409

FAOSTAT, 2016. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/CC>

FAN, S.-C. et al. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. **The Plant cell**, Taipei, v. 21, n. 9, p. 2750–2761, 2009. doi: 10.1105/tpc.109.067603

FILGUEIRA, F. A. R. **Solanáceas: Agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, berinjela e jiló**. 1ª ed. Lavras: UFLA, 2003. ISBN: 8587692151

FISCHER, W.-N. et al. Substrate-Specificity and Expression Profile of Amino-Acid Transporters (AAPs) in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, Berlin, v. 270, n. 27, p. 16315-16320, 1995. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/270/27/16315.short>>

GALLAGHER, R. S. **Seed: The ecology of regeneration in plant communities**. 3rd ed. Boston: CAB International, 2014. ISBN 978-1-78064-183-6,

GRAFI, G.; OHAD, N. **Epigenetic Memory and Control in Plants**. 1st, Tel Aviv: Springer, 2013. ISBN 978-3-642-35226-3, ISBN 978-3-642-35227-0, doi 10.1007/978-3-642-35227-0,

HIRNER, A. et al. *Arabidopsis* LHT1 is a high-affinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll. **The Plant cell**, Tübingen, v. 18, n. 8, p. 1931–1946, 2006. doi: 10.1105/tpc.106.041012.

IWASAKI, M.; PASZKOWSKI, J. Epigenetic memory in plants. **The EMBO Journal**, Cambridge, v. 33, n. 18, p. 1–12, 2014. doi: 10.15252/embj.201488883

INCAPER. **Tomate**. 1ª ed. Vitória: INCAPER, 2010. ISBN 978-85-89724-17-3

KADOTANI, N. et al. Exogenous proteinogenic amino acids induce systemic resistance in rice. **BMC Plant Biology**, Kawasaki, v. 16, n. 1, p. 60, 2016. doi: 10.1186/s12870-016-0748-x

KEMP, H. **Investigating the Effect of Plant Amino Acid Transporters AtAAP1 and AtAAP2 on Aphid-Plant Interactions**. 2011. 357 f. Ph.D. thesis, University of Birmingham, Birmingham, 2011.

KORIR, N. K. et al. A novel and efficient strategy for practical identification of tomato (*Solanum lycopersicon*) varieties using modified RAPD fingerprints. **Genetics and Molecular Research**, Nanjing, v. 12, n. 2, p. 1816–1828, 2013. doi: 10.4238/2013.June.11.2

KRUGER, N. J.; HILL, S. A.; RATCLIFFE, R. G. **Regulation of primary metabolic pathways in plants**. 1st ed. Oxford: Springer, 1999. ISBN 978-94-010-6021-9, ISBN 978-94-011-4818-4

KWART, M. et al. Differential expression of 2 related amino-acid transporters with differing substrate-specificity in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, Berlin, v.4, n. 6, p. 993-1002, 1993. 10.1046/j.1365-313X.1993.04060993.x

MALAVOLTA, E. **Manual de Química Agrícola**. 1^a ed. São Paulo: Editora Ceres, 1976. ISBN: 8531800188

MARSCHNER, P. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**, 3rd ed. London: Elsevier, 2012. ISBN : 978-0-12-384905-2

MASCLAUX-DAUBRESSE, C. et al. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: Challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**, Versailles, v. 105, n. 7, p. 1141–1157, 2010. doi:10.1093/aob/mcq02

MENDONÇA, E. D. S.; MATOS, E. D. S. *Matéria Orgânica do Solo: Métodos de Análises*. **Viçosa, MG**, p. 77, 2005.

MEYER, P. **Plant Epigenetics**. 1st ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. ISBN-10: 1-4051-2977-8, ISBN-13: 978-14051-2977-0

OKADA, M. **True health**, 1st ed. Culver: Izunome Association, 1987.

PADGETT, P. E.; LEONARD, R. T. Regulation of nitrate uptake by amino acids in maize cell suspension culture and intact roots. **Plant and Soil**, Riverside, v. 155–156, n. 1, p. 159–161, 1993. doi:10.1007/BF00025008

PADGETT, P.; LEONARD, R. Free amino acid levels and the regulation of nitrate uptake in maize cell suspension cultures. **Journal of Experimental Botany**, Riverside, v. 47, n. 300, p. 871–883, 1996. doi:10.1093/jxb/47.7.871

PÉREZ-GARCIA, A. et al. Cytosolic localization in tomato mesophyll cells of a novel glutamine synthetase induced in response to bacterial infection or phosphinothricin treatment. **Planta**, v. 206, n. 3, p. 426–434, 1998. doi: 10.1007/s004250050418

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Munich, v. 29, n. 9, p. 2002–2007, 2001. doi: 10.1093/nar/29.9.e45

PROHENS, J.; NUEZ, F. **Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae**. 1st ed. Valencia: Springer, 2008. ISBN: 978-0-387-74108-6, 978-0-387-74110-9

SCHEIBLE, W.-R. et al. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. **Plant Journal**, Heidelberg, v. 11, n. 4, p. 671–691, 1997. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.11040671.x

SVENNERSTAM, H. et al. Comprehensive screening of *Arabidopsis* mutants suggests the lysine histidine transporter 1 to be involved in plant uptake of amino acids. **Plant physiology**, Umea, v. 143, n. 4, p. 1853–60, 2007. doi: 10.1104/pp.106.092205.

SVENNERSTAM, H.; GANETEG, U.; NÄSHOLM, T. Root uptake of cationic amino acids by *Arabidopsis* depends on functional expression of amino acid permease 5. **New Phytologist**, Umeå, v. 180, n. 3, p. 620–630, 2008. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02589.x

TAIZ, L. et al. **Plant Physiology and Development**. 6th ed. Santa Cruz: Sinauer Associates, 2015. ISBN: 9781605352558.

WANG, R. et al. Genomic Analysis of the Nitrate Response Using a Nitrate Reductase-Null Mutant of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, La Jolla, v. 136, n. 1, pp. 2512–2522, 2004. doi: 10.1104/pp.104.044610.

6 CAPÍTULO 3

COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NAS FOLHAS DE TOMATEIROS ‘ESPECIAL PARA SALADA’ SELECIONADOS PELA TOPSEED® E PELA AGRICULTURA NATURAL

RESUMO

Os compostos fenólicos produzidos pelas plantas têm como principal função a defesa contra pragas e doenças, de acordo com inúmeros autores. Foram utilizadas as sementes T0 da variedade comercial ‘Especial para Salada’ da Topseed® e (T0) e selecionada da mesma variedade cultivada 15 vezes com os manejos da agricultura natural (T15) Para determinar as substâncias químicas presentes nas folhas que atuam na defesa dos tomateiros, cultivados pelos sistemas de cultivos das agriculturas natural (NF) e orgânica (OF). A partir das folhas secas foram feitas extrações exaustivas pelo método de maceração com etanol para produção do extrato bruto etanólico-EBE. Para o ensaio fitoquímico os EBEs e as frações acetato e butanol foram submetidas a análise por cromatografia em camada delgada-CCD a fim de caracterizar os flavonoides. O precipitado resultante destas duas frações foi identificado por RMN ¹H como sendo o flavonoide rutina. O ensaio fitoquímico mostrou que os tratamentos NF-T0, OF-T0 e OF-T15 produziram em igual intensidade o ácido clorogênico, os flavonoides rutina e hiperosídeo que é uma fitoalexina e que o tratamento NF-T15 não produziu o hiperosídeo e em menor intensidade o ácido clorogênico e rutina. As plantas de NF-T15 foram as que perderam menos frutos e, surpreendentemente, onde os compostos fenólicos foram detectados em menores quantidades, muito embora estivessem no mesmo ambiente dos outros três tratamentos que foram fortemente induzidos a produzir estas substâncias químicas.

Palavras-chave: agricultura natural · tomate · flavonoides · adubo orgânico · rutina · ácido clorogênico · hiperosídeo

6.1 INTRODUÇÃO

A agricultura adubada influencia de alguma forma a síntese de muitos compostos fenólicos de plantas destinados à defesa contra pragas e doenças. Entre os metabólitos secundários, os compostos fenólicos são os produzidos em maior abundância no reino vegetal. A enzima chave que catalisa a biossíntese de compostos secundários é a fenilalanina amônia-liase-PAL (MITCHELL et al., 2007) cuja atividade aumenta, segundo Stewart et al. (2001), em plantas cultivadas sob solos com baixos teores de nutrientes, com ferimentos, infectadas por patógenos e infestadas por insetos, ou sob radiação UV-B (STEWART et al., 2001).

Os compostos fenólicos exibem intensa absorção na região UV do espectro, mesmo os que absorvem fortemente na região do visível (GRONQUIST et al., 2001; LATTANZIO et al., 2006). Flavonoides têm sido relatados como possuidores de atividade antimicrobiana, são sintetizados pelas plantas em resposta às infecções e estão sempre presentes nas camadas de células da epiderme de folhas e em tecidos que são expostos à luz, tal como as pétalas, o pólen e o meristema apical (SISA et al., 2010; WINKEL-SHIRLEY, 2002; YIN et al., 2013). Plantas no campo são expostas à radiação solar com UV-A (320-400 nm), UV-B (290-320 nm) e UV-C (200-290) (DIAZ; FERERES, 2007). As flavonas e flavonóis absorvem a luz UV aproximadamente nos mesmos comprimentos de ondas do espectro luminoso, entre 250 e 350 nm (LATTANZIO et al., 2008). A quercetina, um flavonol, absorve a radiação UV A ($\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$) e UV C ($\lambda_{\text{max}} = 256 \text{ nm}$) (SAEWAN; JIMTAISONG, 2013). A capacidade dos flavonoides de absorver UV pode interferir na imagem da planta para o inseto conferindo uma importante defesa contra pragas e doenças. A infestação de mosca-branca (*Trialeurodes vaporariorum* e *Bemisia tabaci*), tripses (*Frankliniella occidentalis*) e afídeos do algodão (*Aphis gossypii*) estão entre as mais importantes pragas da agricultura mundial e ainda são vetores de doenças virais economicamente importantes. Casas de vegetação construídas com placas de polietileno revestidas por substância que absorve eficientemente a luz UV na faixa entre 200 e 370 nm, protegeram as plantas em seu interior sem o uso de nenhum inseticida. Nesse ambiente a incidência de infestação foi de 20% e da casa de vegetação construída com placas pintadas por substâncias que não absorvem o UV foi de 93%. Antignus et al. (1996) encontraram uma correlação positiva entre o nível de proteção das plantas e a capacidade das placas de polietileno revestidas que absorveram a luz UV. Os mecanismos ainda não são totalmente conhecidos, mas presume-se que os níveis de infestação de pragas reduzidos resultam da interferência sobre a interpretação visual e das respostas comportamentais dos insetos à luz UV absorvida. O comprimento de onda na região do UV tem influência sobre comportamento dos insetos, tais

como, orientação, navegação, localização do hospedeiro e alimentação (ANTIGNUS et al., 1996; DIAZ; FERERES, 2007; HOROWITZ; ISHAAYA, 2004; MUTWIWA et al., 2005).

Como os flavonoides têm uma elevada capacidade de absorção da UV em 250-270 e 335-360 nm (LATTANZIO et al., 2006), pode-se deduzir que estes compostos, encontrados nos tecidos vegetais expostos a luz solar, ao absorverem os raios UV conferem, de alguma forma, proteção às plantas contra a infestação de pragas. Tem sido proposto que os flavonoides nas plantas atuam como proteção contra os efeitos mutagênicos dos raios UV sobre o DNA e sejam importantes também para outras funções a serem esclarecidas (LATTANZIO et al., 2006, 2008). Johnson e Andersson (2002) mostram que as substâncias que absorvem o UV deixam as plantas indisponíveis visualmente para as abelhas. Esses autores realizaram um estudo para verificar a resposta de insetos polinizadores à refletância de raios UV em flores, independentemente de outros comprimentos de onda. Corolas de flores de *Hypoxis hemerocallidea* foram pintadas com protetor solar para humanos capaz de absorver os comprimentos de onda do UV. Os resultados mostraram que as abelhas (*Apis mellifera scutellata*) se alimentaram das flores de *H. hemerocallidea* fortemente reflectoras de UV, rejeitaram as flores que tiveram a refletância do UV eliminada pelo protetor solar, mas continuaram a visitar as flores do controle pintadas com o protetor solar que não continha as substâncias que absorvem o UV (JOHNSON; ANDERSSON, 2002).

O UV-B induziu a produção e o acúmulo de derivados de fenilpropanoides, como ácido clorogênico e vários compostos fenólicos que absorvem o UV, tais quais os flavonoides, em duas espécies selvagens de *Nicotiana* sp.. Essa indução é semelhante aos efeitos produzidos na planta em resposta à infestação de insetos (IZAGUIRRE et al., 2007). Houve uma convergência significativa nos perfis fenólicos induzidos por UV-B e pela herbivoria simulada: ácido clorogênico e isômeros de dicafeoilespermidina, em particular, mostraram um padrão semelhante de resposta aos dois estímulos. A rutina, o único flavonoide que se acumulou em quantidades significativas nos experimentos de Izaguirre et al. (2007), foi apenas induzida por UV-B. Esses resultados sugerem que o efeito antagonista aos insetos é induzido por UV-B que pode ser intermediado, pelo menos em parte, pelo acúmulo de derivados de fenilpropanoides que são semelhantes aos induzidos pela planta em resposta ao ataque de insetos (IZAGUIRRE et al., 2007).

Este trabalho teve a intenção de mostrar que a adubação alóctone no solo, ou a sua ausência, interfere na produção de compostos secundários sobretudo os flavonoides, o ácido clorogênico

e as fitoalexinas e que os teores destas substâncias interferem na relação planta-parasitos nos tratamentos estudados.

6.2 OBJETIVOS

6.2.1 Objetivo geral

Estudar as diferenças químicas nas folhas de tomateiros cultivados com adubação orgânica e sem adubação orgânica.

6.2.2 Objetivos específicos

Relacionar a presença dos compostos fenólicos nas folhas de tomateiros cultivados com adubação orgânica e sem adubação orgânica em quatro tratamentos.

Avaliar o perfil químico das folhas de tomateiro por cromatografia em camada delgada e identificar a presença de flavonoides nas folhas de tomateiro adubados ou não.

6.3 MATERIAIS E MÉTODOS

6.3.1 Cultivos dos tomateiros T15 e T0 sob as condições de manejo da agricultura natural e da agricultura orgânica em Marechal Floriano-ES

O plantio dos quatro tratamentos foi feito em 1º de maio de 2016, no Sítio Alice (20°25'22.43"S e 40°39'06.20"O) localizado no município capixaba de Marechal Floriano que tem clima tropical de altitude, com temperatura e precipitação média anual de 18°C e de 1493 mm anuais. O município possui 36% da área coberta com remanescentes da Mata Atlântica e o solo característico é o Latossolo Vermelho Amarelo-LVA distrófico arenoso e areno-argiloso. A adubação aplicada aos tratamentos OF-T0 e OF-T15 foi feito com cama de galinheiro normalmente usada pelos produtores de tomate do município como adubo orgânico. Os tratamentos NF-T15 e NF-T0 foram os tratamentos do sistema de cultivo da agricultura natural. Os tratamentos OF-T10 e OF-T15 não receberam nenhuma pulverização de defensivos orgânicos permitido por lei.

6.3.2 Material vegetal

Para o estudo químico das folhas de tomateiros (*Solanum lycopersicum* L.) da variedade comercial ‘Especial para Salada’ T15 e T0, semeadas em 1º de maio e coletadas no início da fase reprodutiva em 27 de julho de 2016 no sítio Alice em Marechal Floriano. As folhas foram secas em estufa sob circulação de ar forçada à temperatura de 40°C por 5 dias no Laboratório de Botânica da UFES. Após à secagem, as massas secas resultantes de cada tratamento foram: NF-T15 - 48,14 g; NF-T0 - 45,13 g; OF-T0 - 75,17 g; OF-T15 - 79,65 g.

6.3.3 Preparação dos extratos

A partir das folhas secas foram realizadas extrações exaustivas pelo método de maceração. O etanol foi posteriormente evaporado utilizando Evaporador Rotativo SL-126 da marca SOLAB, a 60°C, até a eliminação completa do solvente. O extrato bruto etanólico-EBE concentrado foi armazenado em recipiente de vidro, fechado com papel alumínio e guardado no escuro até as análises químicas.

Os EBEs foram ressuspensos em uma solução de água:etanol (20% v/v) e submetido a extração fracionada de polaridade crescente utilizando hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Os solventes foram evaporados e com isso obtiveram-se as suas respectivas frações. Durante o processo de fracionamento das parcelas de acetato de etila e butanólica, dos diferentes tratamentos, houve a formação de um precipitado amarelo claro que passou a ser investigado por se tratar de um flavonoide.

6.3.4 Ensaio fitoquímico

As amostras dos EBEs e duas frações foram submetidas a análise por cromatografia em camada delgada-CCD para avaliar a semelhança do perfil cromatográfico. Foram utilizadas placas de alumínio de gel em sílica ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄, medindo 20 cm x 10 cm com 0,20 mm de espessura de fase normal. A fase móvel foi uma mistura de acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico e água na proporção 100:11:11:26. Todas as revelações cromatográficas foram realizadas por métodos físicos com lâmpadas de UV de 254 nm e 365 nm e método químico utilizando o revelador NP/PEG (Solução metanólica com 1% de 2-difenilborinato-aminoetilo) específico para grupos de flavonoides e compostos fenólicos de cadeia simples (WAGNER; BLADT, 2001). Os EBEs e as frações acetato e butanol foram submetidas a análise por CCD

para caracterização de flavonoides. Após purificação por recristalização, o precipitado resultante foi encaminhado para análises de identificação estrutural por RMN ^1H .

As amostras de EBEs das folhas de tomateiro NF-T15, NF-T0, OF-T0 e OF-T15 foram preparadas numa concentração de 10mg/mL de metanol. Dessas diluições foram aplicados 5 μL sobre a placa cromatográfica, além de 5 μL dos padrões de Miricetina-3-O-beta-arabinosideo, Quercetina, Kaempferol, Ácido Clorogênico, Quercitrina, Miricetina, Hiperosideo e Rutina.

6.3.5 Espectro de ressonância magnética nuclear-RMN ^1H

O espectro de RMN unidimensional de ^1H , para elucidação estrutural de um composto químico, foi adquirido num aparelho Varian modelo VNMRs 400 com frequência de 400 MHz do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Metodologias para Caracterização de Óleos Pesados-UFES/LabPetro. Os deslocamentos químicos foram expressos em partes por milhão-ppm. As amostras foram solubilizadas em metanol deuterado para as análises. Os espectros foram tratados no software MestReNova.

6.3.6 Exposição das folhas aos raios ultravioletas

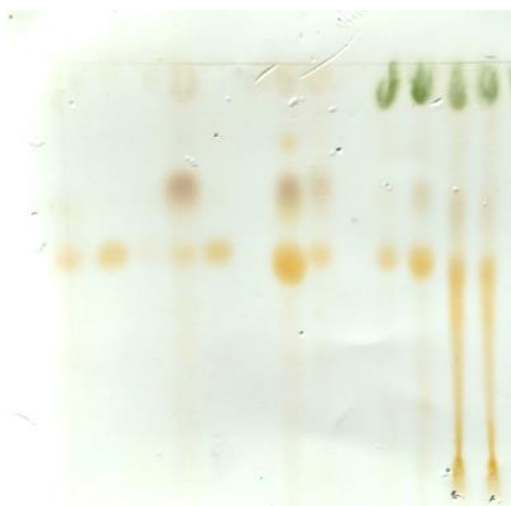
Segmentos de folhas dos quatro tratamentos foram expostos aos raios UV em câmaras reveladoras de placas de gel de agarose e fotografadas no Laboratório de Genética Molecular da WVU. Foi usado para tal uma câmara escura com o transluminador UV eletrônico acoplado à ultracâmera de imagem digital da marca Ultra-Lum Electronic (Electronic UV Transluminator Coupled with Ultracam Digital Imaging)

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

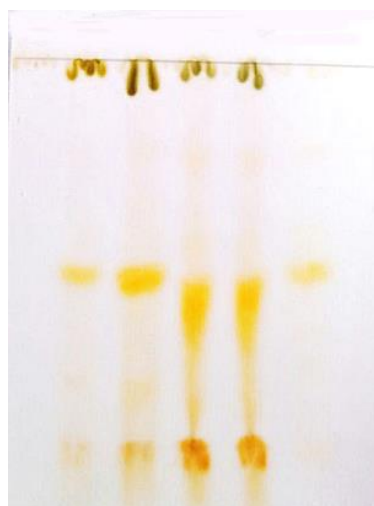
6.4.1 Cromatografia em camada delgada-CCD

Durante o processo de fracionamento dos extratos e das frações acetato e butanol houve a precipitação de sólido amarelado nas frações acetato, butanol e no resíduo aquoso. Logo foi realizada uma CCD com os EBEs (Figura 26) e com as frações que continham os precipitados, assim como os sobrenadantes destes precipitados. O resultado do perfil químico dos EBEs das

folhas dos tomatesiros e a comparação com a substância isolada podem ser observados na Figura 27.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
Figura 26 – Placa de CCD com as frações: 1- Sobrenadante NF-T15; 2-Precipitado NF-T15; 3- Precipitado NF-T15 + H₂O; 4- Sobrenadante NF-T0; 5-Precipitado NF-T0; 6-Sobrenadante OF-T0; 7-Precipitado OF-T0; 8-Sobrenadante OF-T15; 9-Nulo; 10-Extrato bruto NF-T15; 11-Extrato bruto NF-T0; 12- Extrato bruto OF-T0 e 13-Extrato bruto OF-T15.



1 2 3 4 5
Figura 27 – Placa de CCD dos extratos etanólicos de folhas de tomateiro nos tratamentos 1-NF-T15, 2-NF-T0, 3-OF-T0, 4- OF-15 e 5-sólido purificado.

6.4.2 Análise de RMN ¹H para o precipitado

Das partições de acetato de etila e butanol das folhas de tomateiro foi observado um precipitado amarelo (Figura 26). Este precipitado foi analisado por CCD (Figura 27) e observou-se uma mancha amarelada que ficou mais intensa após revelação com NP/PEG. Depois da purificação este precipitado foi submetido a análise de RMN ¹H.

Com o resultado prévio da CCD julgou-se que o precipitado fosse o flavonoide rutina (Figura 27). Os dados de deslocamentos químicos do espectro RMN ¹H foram comparados com os dados da literatura o que confirmou a identificação da rutina. O espectro de RMN ¹H obtido (Figura 28) mostrou os deslocamentos químicos da rutina. As suas ampliações realçam a parte aglicona do flavonol (Figura 29), onde os anéis aromáticos estão em deslocamentos maiores, conforme estrutura química da rutina. A porção açúcar da molécula está destacando o carbono anomérico da porção glicopiranosídeo ligada ao flavonol, assim como a porção rhamnosídeo ligada ao glicopiranosídeo (figuras 30 e 31)

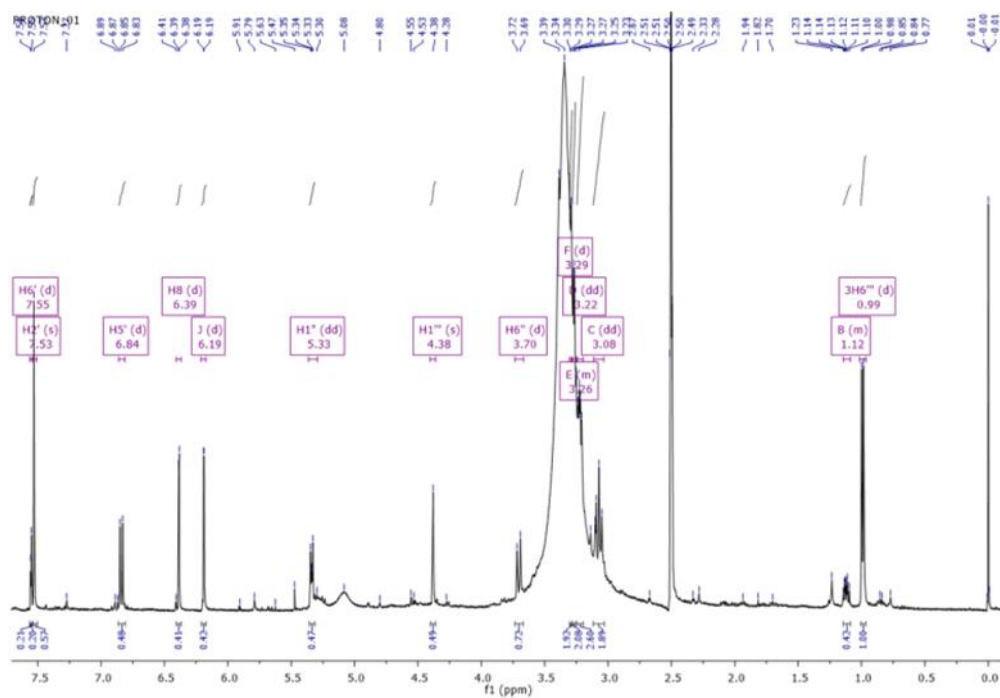
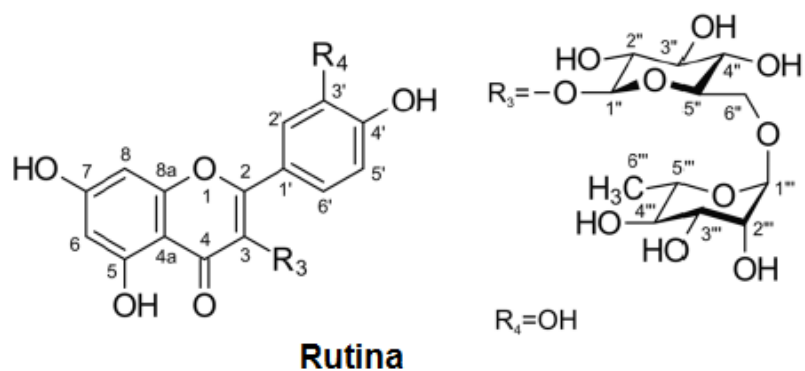


Figura 28 - Espectro de RMN ^1H da rutina isolada das folhas de tomateiro.

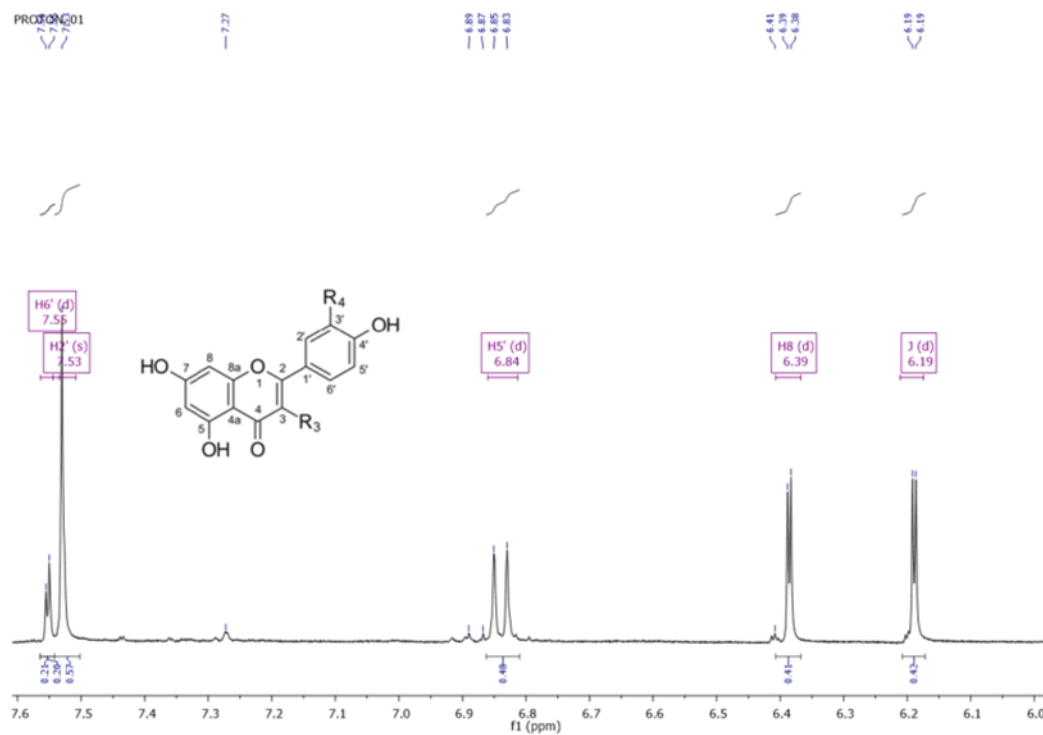


Figura 29 – Amplificação da parte aglicona do flavonol.

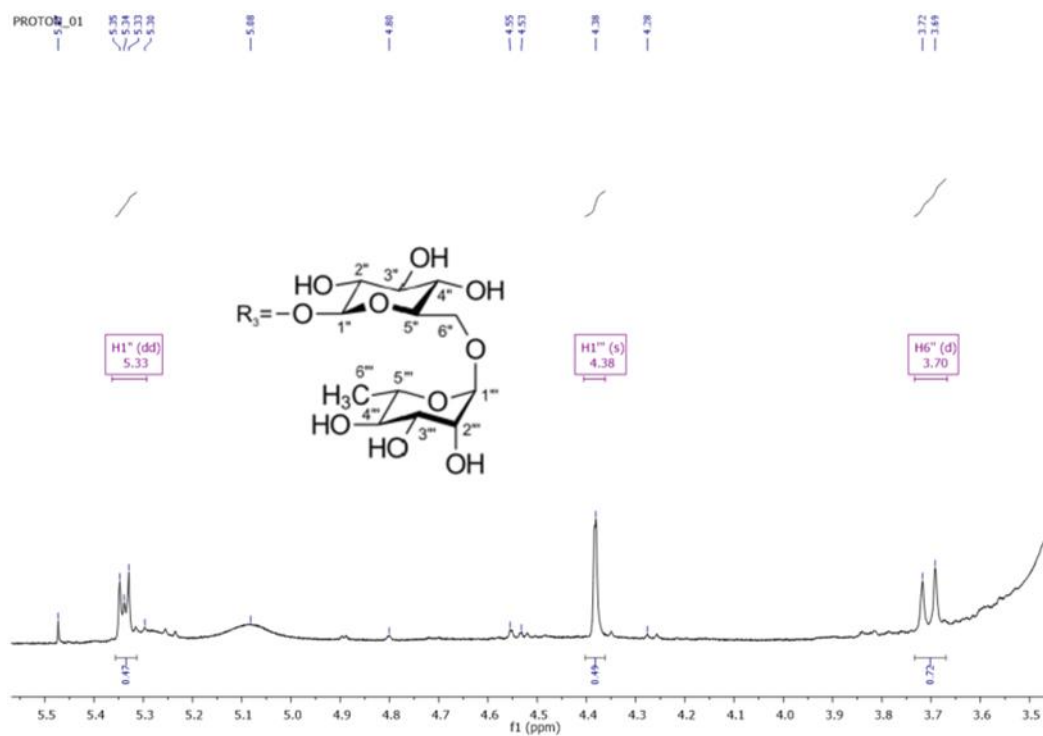


Figura 30 – Ampliação do carbono anomérico da porção glicopiranosídeo ligada ao flavonol, assim como a porção rhamnosídeo ligada ao glicopiranosídeo.

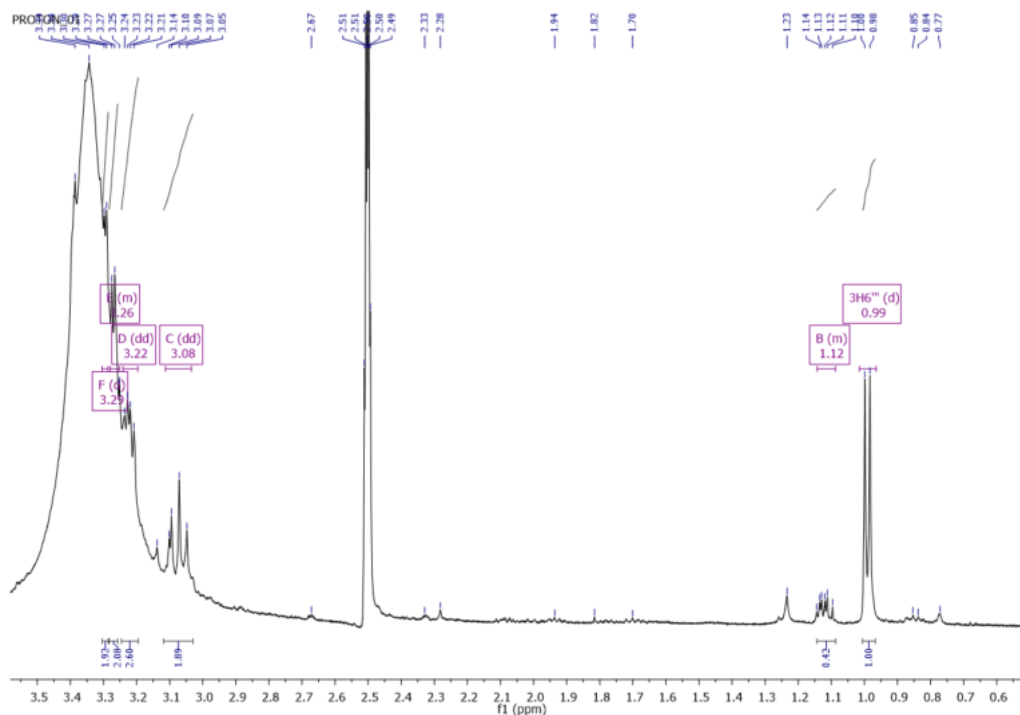


Figura 31 – Ampliação mostrando os grupos metilenos e o grupamento metila da porção rhamnosídeo.

Os resultados das análises do RMN ^1H revelaram o isolamento da quercetina-3-O-rutinosídeo, mais comumente conhecida como rutina. A rutina, que está presente nos quatro tratamentos em concentrações não avaliadas nesse trabalho (Figuras 27 e 32) também é chamada de rutosídeo, quercetina-3-O-rutinosídeo, soporina ou vitamina P, é o flavonoide glicosídeo que combina o flavonol mais abundante na natureza, a quercetina, e o dissacarídeo rutinose. As principais fontes de rutina na natureza são os vegetais folhosos, as frutas cítricas e o trigo-sarraceno (*Fagopyrum esculentum*). A rutina tem as maiores afinidades de absorção de UV, ou absorbâncias máximas, próximas a 201 nm (UV-C), 257 nm (UV-B) e 352 nm (UV-A). Portanto, a rutina é um composto que absorve toda a gama de raios UV. A rutina é um flavonoide glicosídico cuja síntese é fortemente induzida mais por plantas sob os raios UV-B e muito menos, ou quase nada por insetos. Segundo Izaguirre et al. (2007) os raios UV-B induziram o acúmulo de vários compostos fenólicos que absorvem esses raios. Houve uma convergência significativa do ácido clorogênico induzido por UV-B e por herbivoria simulada, mostrando um padrão semelhante de resposta a estes dois estímulos. No entanto, a rutina, o único flavonoide que se acumulou em quantidades significativas nos experimentos, foi apenas induzida por UV-B (IZAGUIRRE et al., 2007).

6.4.3 Respostas fitoquímicas dos tomateiros T15 e T0 cultivados nos sistemas de cultivos das agriculturas natural e orgânica

Após a revelação com NP/PEG, os resultados identificaram a presença de três substâncias, sendo que o ácido clorogênico, na coluna 8, e a rutina, na coluna 12 da Figura 32, apresentaram o mesmo fator de retenção com colorações diferentes, e a fitoalexina hiperosídeo (Coluna 11 da figura 32) que está presente nos tratamentos NF-T0, OF-T0 e OF-T15 e ausente no NF-T15.

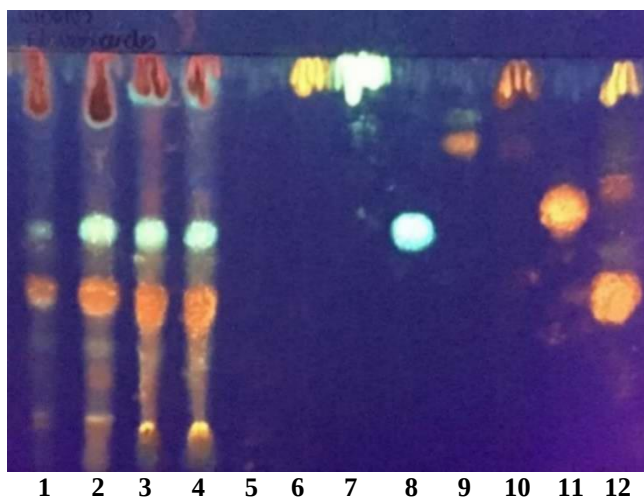


Figura 32 – Amostras de EBEs (10 mg/mL): 1-NF-T15, 2-NF-T0, 3-OF-T0, 4-OF-T0. Padrões (5 µL): 5-Miricetina-3-O-beta-arabinosídeo, 6-Quercetina, 7-Kaempferol, 8-Ácido Clorogênico, 9-Quercitrina, 10-Miricetina, 11-Hiperosídeo e 12-Rutina.

Uma variedade de inibidores químicos e uma gama de processos bioquímicos são induzidos na planta por patógenos. Nos campos agrícolas é corriqueira a defesa através de níveis aumentados de compostos fenólicos nas plantas (STEWART et al., 2001). Alguns dos compostos fenólicos envolvidos nos mecanismos de defesa são comuns em plantas, saudáveis e doentes. Porém, a síntese ou acumulação deles é acelerada após a infecção. Tais compostos podem ser chamados fenólicos comuns. Estes incluem o ácido clorogênico que é tóxico para os patógenos. O ácido clorogênico (CGA, ácido 5-O-cafeoilquinico) é o principal fenilpropanoide em muitas plantas, incluindo a batata (*Solanum tuberosum*), o tomateiro (*Solanum lycopersicon*), a maçã (*Malus domestica*) e o café (*Coffea arabica*) (PAYYAVULA et al., 2015). Frutos, caules e folhas de tomateiros (*Solanum lycopersicum* L.) transgênico tiveram a biossíntese de lignina reduzida pela baixa atividade de cinamoil-CoA redutase resultando no aumento da disponibilidade do seu precursor cinamoil-CoA que estimulou a produção de compostos fenólicos solúveis como o ácido clorogênico e rutina (VAN DER REST et al., 2006). A enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) controla um ponto da ramificação chave na via biossintética dos fenilpropanoides

que tem a fenilalanina, um metabólito primário, como substrato para a síntese de lignina e de vários flavonoides e isoflavanoides que são fitoalexinas. (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

Os tomateiros NF-T0, OF-T0 e OF-T15 produziram hiperosídeo, uma fitoalexina sintetizada por indução de fatores ambientais, mas mesmo assim foram as mais infestadas e tiveram mais frutos lesados que as plantas NF-T15. Embora as plantas NF-T15 estejam sob as mesmas pressões ambientais, elas não produziram a fitoalexina hiperosídeo em suas folhas (Figura 32), haja vista terem sido as menos infestadas por pragas e doenças nos campos experimentais de Marechal Floriano e na WVUOAF. Nesses tomateiros a total ausência da fitoalexina hiperosídeo, as quantidades de ácido clorogênico (Figura 32) e de rutina podem ter conferido mais eficiência na defesa das plantas NF-T15. Curiosamente os tomateiros NF-T15 também foram os que produziram menos lignina em seus frutos (Figura 15), porém aparentemente têm menos rutina e ácido clorogênico (Figura 32), sendo este resultado o contrário do apresentado por Van Der Rest et al. (2006) em seus estudos. Levando-se em conta a ausência da fitoalexina hiperosídeo nas folhas de NF-T15 pode-se afirmar que os esporos dos fungos que causaram danos aos outros tratamentos, não induziram a produção das defesas canônicas conhecidas até aqui nos tomateiros NF-T15. As fitoalexinas são compostos fenólicos, não presentes em plantas saudáveis, em geral são sintetizadas nas plantas apenas após infecção, lesão ou por estímulos de certas secreções fúngicas, e servem para inibir os microrganismos que infestam as plantas (STANGARLIN et al., 2011). As fitoalexinas são compostos antimicrobianos lipofílicos de baixo peso molecular que se acumulam rapidamente em locais de infecções incompatíveis com patógenos. O hiperosídeo (hiperina, quercetina-3-O-galactosídeo; HYP) é um composto fenólico pertencente ao grupo dos flavonoides glicosilados, encontrado em diferentes espécies vegetais. Apresenta-se como um pó amarelo, se comportando como uma molécula relativamente hidrofílica. (LI et al., 2014).

6.4.4 Exposição das folhas aos raios ultravioletas

De alguma maneira as folhas dos tomateiros NF-T15 absorveram mais os raios na faixa do UV (Figura 33) e podem ter deixado a visão das plantas indisponível para os insetos, sendo essa uma das causas das plantas terem sido as menos infestadas de pragas e doenças nos campos. As folhas de OF-T0 foram as mais visíveis ao serem expostas aos raios UV o que pode ter deixado os tomateiros adubados mais visíveis aos parasitos a procura de alimentos.

Os flavonoides como a rutina, que absorvem os raios UV-A, UV-B e UV-C, se acumulam nas camadas superficiais do tecido vegetal, podem alterar significativamente as propriedades ópticas de frutas, flores e folhas. As folhas de NF-T15 quando expostas aos raios UV apresentaram a melhor capacidade de absorvê-los e por isso mantiveram-se mais escuras que as folhas de NF-T0, OF-T0 e OF-T15 (Figura 33). As folhas de NF-T15 produziram menos flavonoides (Figura 32) que os outros tratamentos, no entanto a absorção do UV foi mais intensa. Pode-se inferir que as folhas de NF-T0, OF-T0 e OF-T15 que tiveram melhores teores de flavonoides também tiveram mais aminoácidos livres totais, de acordo com os resultados encontrados pelo autor nas folhas de tomateiros da variedade comercial ‘Especial para Salada’ adubados e não adubados (TAVARES, 2006). O UV absorvido pelas folhas NF-T0, OF-T0 e OF-T15 emitiu fluorescência (Figura 33) e por isso as deixou mais visíveis para os insetos. O brilho apresentado pelas folhas NF-T0, OF-T0 e OF-T15 na figura 33 pode sinalizar aos insetos a presença abundante de aminoácidos livres para alimentá-los fartamente, aumentar sua população e virarem pragas. O equilíbrio entre flavonoides e aminoácidos livres totais possivelmente deixou as folhas de NF-T15 visualmente indisponíveis para os insetos, o que pode ter induzido essas plantas a não produzirem a fitoalexina hiperosídeo. Por outro lado, o desequilíbrio entre flavonoides e aminoácidos livres totais deixou as folhas mais visíveis para o inseto, o que pode ter induzido a produção de hiperosídeo, já que a primeira proteção falhou. Embora Tavares (2006) tenha mostrado que tomateiros ‘Especial para Salada’ adubadas produzem mais aminoácidos livres totais que os tomateiros não adubados, estudos mais detalhados devam ser feitos a respeito da influência do equilíbrio entre flavonoides e aminoácidos livres sobre a absorção e emissão de fluorescência dos raios UV nas folhas de plantas adubadas e não adubadas.

O comprimento de onda na região do UV tem influência sobre comportamento dos insetos para localizar o hospedeiro fornecedor de alimento (ANTIGNUS et al., 1996; DIAZ; FERERES, 2007; HOROWITZ; ISHAAYA, 2004; MUTWIWA et al., 2005). Insetos como as moscas-brancas (*Bemisia tabaci*) perceberam a maior circulação de aminoácidos no floema nas plantas de algodão (*Gossypium hirsutum* L., cv. Coker) adubadas com 2 mM de KNO₃ e por isso essas plantas foram mais visitadas por esses insetos (CRAFTS-BRANDNER, 2002). Aminoácidos aromáticos são intrinsecamente fluorescentes quando excitado com luz UV. Estas substâncias têm uma característica comum: todas contêm estruturas de anel aromático que absorvem luz UV para excitação. Os aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina podem emitir ondas UV mostrando-se fluorescentes estando livres ou fazendo parte de proteínas e peptídeos (HELD,

2006). Assim, a fluorescência dos aminoácidos aromáticos pode deixar as folhas das plantas adubadas mais visíveis para os insetos.

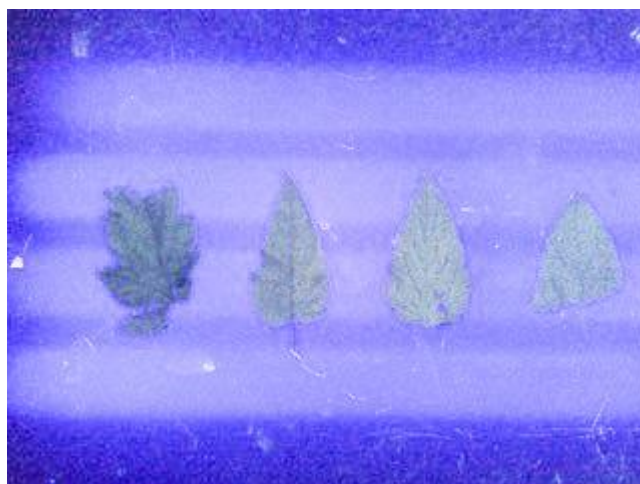


Figura 33 – Folhas dos tomateiros da variedade comercial ‘Especial para Salada’ sob raios UV. Na sequência da esquerda para direita têm-se os tratamentos NF-T15, NF-T0, OF-T0 e OF-15.

6.5 CONCLUSÕES

Os tomateiros NF-T15 apresentaram uma rota metabólica para defesa de suas folhas mais eficiente que não produziu a fitoalexina hiperosídeo, não houve indução para aumentar a produção de ácido clorogênico e o teor de rutina foi semelhante aos tratamentos NF-T0, OF-T0 e OF-T15. Surpreendentemente, as plantas NF-T15 que apresentaram as menores perdas no campo foram as que tiveram os menores teores de fenóis em suas folhas e frutos.

Os tratamentos NF-T0, OF-T0 e OF-T15 produziram hiperosídeo e mais ácido clorogênico do que NF-T15, porém estas defesas foram dramaticamente ineficientes, redundando em grandes perdas de frutos nos campos.

A produção de compostos fenólicos nas folhas dos cultivos adubados com adubo orgânicos não conferiu a defesa observada em NF-T15, deixando evidente que não foram apenas os teores de flavonoides que tornaram NF-T15 mais resistente.

Estudos mais apurados devem ser feitos para se avaliar a influência dos flavonoides em geral e da rutina sobre as defesas visuais conferidas às plantas.

6.6 REFERÊNCIAS

- ANTIGNUS, Y. et al. Ultraviolet-absorbing plastic sheets protect crops from insect pests and from virus diseases vectored by insects. **Environmental Entomology**, Bet Dagan, v. 25, n. 5, p. 919–924, 1996. doi: 10.1093/ee/25.5.919
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (EDS.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. 2nd ed. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. ISBN: 9780470714218, ISBN: 9780470714225
- CRAFTS-BRANDNER, S. J. Plant nitrogen status rapidly alters amino acid metabolism and excretion in *Bemisia tabaci*. **Journal of Insect Physiology**, Phoenix, v. 48, n. 1, p. 33–41, 2002. doi: 10.1016/S0022-1910(01)00140-8
- DIAZ, B.; FERERES, A. Ultraviolet-blocking materials as a physical barrier to control insect pests and plant pathogens in protected crops. **Pest Technology**, Madrid, v. 1, p. 85–95, 2007.
- GRONQUIST, M. et al. Attractive and defensive functions of the ultraviolet pigments of a flower (*Hypericum calycinum*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Ithaca, v. 98, n. 24, p. 13745–50, 2001. doi:10.1073/pnas.231471698
- HELD, P. Quantitation of Peptides and Amino Acids with a Synergy™ HT using UV Fluorescence. **BioTek Application Note**, Winooski, p. 1–8, 2006.
- HOROWITZ, A. R.; ISHAAYA, I. **Insect Pest Management**. 1st ed. Berlin: Springer-Verlag, 2004. ISBN 978-3-642-05859-2, ISBN 978-3-662-07913-3
- IZAGUIRRE, M. M. et al. Solar ultraviolet-B radiation and insect herbivory trigger partially overlapping phenolic responses in *Nicotiana attenuata* and *Nicotiana longiflora*. **Annals of Botany**, Buenos Aires, v. 99, n. 1, p. 103–109, 2007. doi:10.1093/aob/mcl226
- JOHNSON, S. D.; ANDERSSON, S. A simple field method for manipulating ultraviolet reflectance of flowers. **Canadian Journal of Botany**, Scottsville, v. 80, n. 12, p. 1325, 2002. doi: 10.1139/B02-116
- LATTANZIO, V. et al. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: **Phytochemistry: Advances in Research**, 2006, p. 23-67, Editor: Filippo Imperato. ISBN: 81-308-0034-9

LATTANZIO, V. et al. **Recent Advances in Polyphenol Research**. v 1, 1st ed., Chichester: Wiley-Blackwell, 2008. ISBN-13: 978-1-4051-5837-4, ISBN-10: 1-4051-5837-9.

LI, W. et al. Combination of quercetin and hyperoside has anticancer effects on renal cancer cells through inhibition of oncogenic microRNA-27a. **Oncology Reports**, Shanghai, v. 31, n. 1, p. 117–124, 2014. doi: 10.3892/or.2013.2811

MITCHELL, A. E. et al. Ten-year comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of flavonoids in tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 55, n. 15, p. 6154–6159, 2007. doi:10.1021/jf070344

MUTWIWA, U. N. et al. Effects of UV-absorbing plastic films on greenhouse whitefly (Homoptera : Aleyrodidae). **Journal of Economic Entomology**, Hannover, v. 98, n. 4, p. 1221–1228, 2005. doi: 10.1603/0022-0493-98.4.1221

PAYYAVULA, R. S. et al. Synthesis and regulation of chlorogenic acid in potato : Rerouting phenylpropanoid flux in HQT -silenced lines. **Plant Biotechnology Journal**, Prosser, v. 13, p. 551–564, 2015. doi: 10.1111/pbi.12280

SAEWAN, N.; JIMTAISON, A. Photoprotection of natural flavonoids. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, Chiang Rai, v. 3, n. 9, p. 129–141, 2013. doi: 10.7324/JAPS.2013.3923

SISA, M. et al. Photochemistry of flavonoids. **Molecules**, Bloemfontein, v. 15, n. 8, p. 5196–5245, 2010. doi:10.3390/molecules15085196

STANGARLIN, J. R. et al. A Defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 10, p. 18–46, 2011.

STEWART, A. J. et al. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. **Plant, Cell and Environment**, Glasgow, v. 24, n. 11, p. 1189–1197, 2001. doi: 10.1046/j.1365-3040.2001.00768.x

TAVARES, N. S. **Respostas ecofisiológicas e bioquímicas de duas cultivares de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) cultivadas em sistemas de agricultura natural e convencional**. 2006. 126 f. dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, 2006.

VAN DER REST, B. et al. Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) induces dramatic changes in soluble phenolic pools. **Journal of Experimental Botany**, Castanet, v. 57, n. 6, p. 1399–1411, 2006. doi:10.1093/jxb/erj120

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drugs Analysis, a Thin Layer Chromatography**. 2nd ed. Berlin: Springer, 2001. ISBN 9783540586760

WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Current Opinion in Plant Biology**, Blacksburg, v. 5, p. 218–223, 2002. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00256-X

YIN, Y. et al. Quercitrin Protects Skin from UVB-induced Oxidative Damage. **Toxicol Appl Pharmacol.**, Shenyang, v. 269, n. 2, p. 89–99, 2013. doi:10.1016/j.taap.2013.03.015.

7 CONCLUSÕES FINAIS

A variedade comercial de tomate ‘Especial para Salada’ da Topseed® adaptou-se aos métodos da agricultura natural, com produtividade entre 29,00 e 37,00 t/ha, o que torna viável a possibilidade de outras variedades comerciais de tomate terem a mesma performance no sistema de cultivo da agricultura natural.

As rotas metabólicas que produzem compostos secundários de defesa, como a lignina e compostos fenólicos, estão menos ativadas nas plantas NF-T15, embora os mecanismos de defesa destes tomateiros tenham sido os mais eficientes. A menor perda de água dos frutos NF-T15 está relacionada com os resultados do mais eficiente mecanismo de defesa apresentado neste trabalho. O mesmo mecanismo que levou os frutos a perderem menos água também conferiu a melhor defesa que certamente está ligada à permeabilidade da cutícula conferida pelos ácidos graxos. Essa modalidade de defesa precisa ser melhor compreendida em estudos de ecofisiologia mais detalhados.

Os aminoácidos são as fontes de nitrogênio mais adequadas para as plantas de tomate, pois os genes que os transportam nas raízes tiveram as menores atividades apenas quando as sementes T0 estiveram em ambientes adubados por nitrato.

A fonte de nitrogênio, orgânico ou inorgânico, fornecida aos tomateiros que produziram as sementes T15 e T0 foi determinante nos diversos resultados aferidos neste trabalho, tanto nas diferentes condições de campo quanto nos laboratórios.

As plantas não adubadas originadas das sementes T15 são caracterizadas por serem nutridas pelos aminoácidos, um dos nutrientes do solo, por outro lado, as plantas adubadas originadas de semente T0 têm como característica serem nutridas pelo nitrato, um dos nutrientes dos adubos.

Nas folhas o gene NRT1 apresentou as maiores atividades em T0 e as menores atividades em T15, independentemente de terem sido os tomateiros adubados ou não. A atividade de NRT1 nas folhas cotiledonares pode ser estudado para avaliar a suscetibilidade a pragas e doenças dos tomateiros cultivados em diversos sistemas de cultivo. O gene NRT1, quando superativado pela presença de nitrato no solo e em sementes produzidas por plantas continuamente adubadas com nitrato, pode ser o indutor de rotas metabólicas que diminuem as defesas das plantas adubadas.

O adubo orgânico contribuiu para que genes associados à defesa não fossem expressados ou passassem a ter menor atividade nas plantas adubadas e por isto o adubo foi prejudicial à produtividade dos tomateiros cultivados no sistema de plantio orgânico.

8 REFERÊNCIAS

- ABUZINADAH, R. A.; READ, D. J. Utilization of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Sheffield, v. 103, n. 3, p. 481–493, 1986a. doi: 10.1111/j.1469-8137.1986.tb02886.x
- ABUZINADAH, R. A.; READ, D. J. The Role of Proteins in the Nitrogen Nutrition of Ectomycorrhizal Plants. **New Phytologist**, Sheffield, v. 103, n. 3, p. 507–514, 1986b. doi: 10.1111/j.1469-8137.1986.tb02888.x
- ÅGREN, G. I.; FRANKLIN, O. Root:shoot ratios, optimization and nitrogen productivity. **Annals of Botany**, Uppsala, v. 92, n. 6, p. 795–800, 2003. doi:10.1093/aob/mcg203
- AMÂNCIO, S.; STULEN, I. **Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants**. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 2004. ISBN: 978-1-4020-2727-7, 978-1-4020-2728-4
- ANDREWS, M.; RAVEN, J. A.; LEA, P. J. Do plants need nitrate? the mechanisms by which nitrogen form affects plants. **Annals of Applied Biology**, Lincoln, v. 163, n. 2, p. 174–199, 2013. doi: 10.1111/aab.12045
- ANTIGNUS, Y. et al. Ultraviolet-absorbing plastic sheets protect crops from insect pests and from virus diseases vectored by insects. **Environmental Entomology**, Dagan, v. 25, n. 5, p. 919–924, 1996. doi: 10.1093/ee/25.5.919
- ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). 2016.
- ASLAM, M.; TRAVIS, R. L.; RAINS, D. W. Differential effect of amino acids on nitrate uptake and reduction systems in barley roots. **Plant science : an international journal of experimental plant biology**, Davis, v. 160, n. 2, p. 219–228, 2001. 10.1016/S0168-9452(00)00391-5
- AZEVEDO, E. SCHMIDT, W. KARAM, K. Agricultura familiar orgânica e qualidade de vida: Um estudo de caso em Santa Rosa de Lima, SC, Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Dourados, v. 6, n. 3, p. 81-106, 2011. ISSN: 1980-9735
- BACH, C. E. et al. Measuring phenol oxidase and peroxidase activities with pyrogallol, L-DOPA, and ABTS: Effect of assay conditions and soil type. **Soil Biology and Biochemistry**, Irvine, v. 67, p. 183–191, 2013. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.08.022

BANTING, J. D. Studies on the Persistence of *avena fatua*. **Canadian Journal of Plant Science**, Saskatchewan, v. 46, n. 2, p. 129–140, 1966. doi: 10.4141/cjps66-021.

BARKER, A. V.; PILBEAM, D. J. (EDS.). **Handbook of Plant Nutrition**. Boca Raton: CRC Press, 2007. ISBN: 13: 978-1-4398-8198-9

BICK, J. A. et al. Amino acid carriers of *Ricinus communis* expressed during seedling development: molecular cloning and expression analysis of two putative amino acid transporters, RcAAP1 and RcAAP2. **Plant Mol. Biol.**, Southampton, v. 36, n. 3, p. 377–385, 1998. doi: 10.1023/A:1005903229458

BLOOM, A. J. The increasing importance of distinguishing among plant nitrogen sources. **Current Opinion in Plant Biology**, Davis, v. 25, n. 2, p. 10–16, 2015. doi: 10.1016/j.pbi.2015.03.002

BONGUE-BARTELSMAN, M.; PHILLIPS, D. A. Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. **Plant physiology and biochemistry**, Davis, v. 33, n. 5, p. 539–546, 1995.

BORÉM, A. *Melhoramento de Plantas*, 3ª ed. Viçosa: Editora UFV, 2001. ISBN: 85-7269-099-9

BOURNE JR, J. K. **The End of Plenty: The Race to Feed a Crowded World**. 1st ed. New York: W. W. Norton, 2015. ISBN: 9780393352962.

BOWLES, T. M. et al. Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. **Soil Biology and Biochemistry**, Davis, v. 68, p. 252–262, 2014. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.10.004.

BRENNER, E. D. et al. Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling. **Trends in Plant Science**, New York, v. 11, n. 8, p. 413–419, 2006. doi:10.1016/j.tplants.2006.06.009

BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. Ecological significance and complexity of N-source preference in plants. **Annals of Botany**, Toronto, v. 112, n. 6, p. 957–963, 2013. doi:10.1093/aob/mct157

BURNS, R. G.; DICK, R. P. **Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications**. 1st. New York: Marcel Dekker. ISBN: 0-8247-0614-5

- CAESAR-TONTHAT, T. C. et al. Generation of antibodies for soil aggregating basidiomycete detection as an early indicator of trends in soil quality. **Applied Soil Ecology**, Sidney, v. 18, n. 2, p. 99–116, 2001. doi: 10.1016/S0929-13
- CAMAÑES, G. et al. A Deletion in NRT2.1 Attenuates *Pseudomonas syringae*-Induced Hormonal Perturbation, Resulting in Primed Plant Defenses. **Plant Physiology**, Castellon, v. 158, n. 2, p. 1054–1066, 2012. doi: 10.1104/pp.111.184424
- CAMARGO, F. P. DE; CAMARGO FILHO, W. P. Produção de tomate de mesa no Brasil, 1990-2006: Contribuição da área e da produtividade. **Horticultura Brasileira**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. s1018-s1021, 2008.
- CANALES, J. et al. Systems analysis of transcriptome data provides new hypotheses about *Arabidopsis* root response to nitrate treatments. **Frontiers in plant science**, Santiago, v. 5, n. February, p. 22, 2014. doi: 10.3389/fpls.2014.00022
- CAPORAL, F. R., COSTABEBER, J. A. Agroecologia. enfoque científico e estratégico. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v.3, n.2, 2002.
- CASTAINGS, L. et al. Nitrogen signalling in *Arabidopsis*: How to obtain insights into a complex signalling network. **Journal of Experimental Botany**, Versailles, v. 62, n. 4, p. 1391–1397, 2011. doi:10.1093/jxb/erq375
- CEGLIE, F. G.; AMODIO, M. L.; COLELLI, G. Effect of Organic Production Systems on Quality and Postharvest Performance of Horticultural Produce. **Horticulturae**, Valenzano, v. 2, n. 4, p. 7, 2016. doi:10.3390/horticulturae2020004
- CHA, J.-Y. et al. Microbial and biochemical basis of a *Fusarium* wilt-suppressive soil. **The ISME Journal**, Jinju, p. 1–11, 2015. doi:10.1038/ismej.2015.95.
- CHAPIN, F. S.; MOILANEN, L.; KIELLAND, K. Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge. **Nature**, Berkeley, v. 361, n. 6408, p. 150–153, 1993. doi:10.1038/361150a0
- CHAPIN III, F. S.; MATSON, P. A.; MOONEY, H. A. **Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology**. New York: Springer, 2002. ISBN 0-387-95439-2, ISBN 0-387-95443-0
- CHAPIN III, F. S.; MATSON, P. A.; VITOUSEK, P. M. **Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology**. 2nd. ed. New York: Springer 2011. ISBN 978-1-4419-9503-2, ISBN 978-1-4419-9504-9 e doi: 10.1007/978-1-4419-9504-9

- CHEN, C.; XU, Z. Editorials On the Nature and Ecological Functions of Soil Soluble Organic Nitrogen (SON) in Forest Ecosystems. **Biochemistry**, Brisbane, v. 6, n. 2, p. 63–66, 2006. doi: 10.1065/jss2006.06.159
- CHEN, L.; BUSH, D. R. LHT1, a lysine- and histidine-specific amino acid transporter in *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, Urbana, v. 115, n. 3, p. 1127–1134, 1997. doi: 10.1104/pp.115.3.1127
- CHRISTOU, M. et al. Dissolved organic nitrogen in contrasting agricultural ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, Athens, v. 37, n. 8, p. 1560–1563, 2005. doi: 10.1016/j.soilbio.2005.01.025
- CRAWFORD, N. M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The Plant cell**, La Jolla, v. 7, n. 7, p. 859–68, 1995. doi:10.1105/tpc.7.7.859
- DANGOUR, A. D. et al. Nutritional quality of organic foods: a systematic review. **American Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 90, n. 3, p. 680–685, 2009. doi: 10.3945/ajcn.2009.28041
- DATTA, S. et al. Root hairs: Development, growth and evolution at the plant-soil interface. **Plant and Soil**, Oxford, v. 346, n. 1, p. 1–14, 2011. doi: 10.1007/s11104-011-0845-4
- DELLO IOIO, R. et al. Cytokinins Determine *Arabidopsis* Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation. **Current Biology**, Rome, v. 17, n. 8, p. 678–682, 2007. doi: 10.1016/j.cub.2007.02.047
- DERKSEN, D. A.; BLACKSHAW, R. E.; BOYETCHKO, S. M. Sustainability, conservation tillage and weeds in Canada. **Canadian Journal of Plant Science**, Brandon, v. 76, n. 4, p. 651–659, 1996. doi: 10.4141/cjps96-115.
- DÍAZ, B.; FERRERES, A. Ultraviolet-blocking materials as a physical barrier to control insect pests and plant pathogens in protected crops. **Pest Technology**, Madrid, v. 1, p. 85–95, 2007. URI: <http://hdl.handle.net/10261/13673>.
- DINDAR, E.; ŞAĞBAN, F. O. T.; BAŞKAYA, H. S. Evaluation of soil enzyme activities as soil quality indicators in sludge-amended soils. **Journal of Environmental Biology**, Bursa, v. 36, n. July, p. 919–926, 2015. PMID: 26364470.
- DIXON, R.; PAIVA, N. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. **The Plant cell**, Ardmore, v. 7, n. 7, p. 1085–1097, 1995. doi: 10.1105/tpc.7.7.1085

FAOSTAT, 2016. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/CC>

FILGUEIRA, F. A. R. **Solanáceas: Agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, berinjela e jiló**. 1^a ed. Lavras: UFLA, 2003. ISBN: 8587692151

FOEHSE, D.; JUNGK, A. Influence of phosphate and nitrate supply on root hair formation of rape, spinach and tomato plants. **Plant and Soil**, Göttingen, v. 74, n. 3, p. 359–368, 1983. doi: 10.1007/BF02181353

FRIEDMAN, M. Anticarcinogenic, cardioprotective, and other health benefits of tomato compounds lycopene, α -tomatine, and tomatidine in pure form and in fresh and processed tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Albany, v. 61, n. 40, p. 9534–9550, 2013. doi: 10.1021/jf402654e

GERMAN, D. P. et al. The Michaelis-Menten kinetics of soil extracellular enzymes in response to temperature: A cross-latitudinal study. **Global Change Biology**, Irvine, v. 18, n. 4, p. 1468–1479, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2486.2011.02615.x

GILBERT, G. S. EVOLUTIONARY ECOLOGY OF PLANT DISEASES IN NATURAL ECOSYSTEMS. **Annual Review of Phytopathology**, Santa Cruz, v. 40, n. 1, p. 13–43, 2002. doi: 10.1146/annurev.phyto.40.021202.110417

GILROY, S.; JONES, D. L. Through form to function: Root hair development and nutrient uptake. **Trends in Plant Science**, State College, v. 5, n. 2, p. 56–60, 2000. doi: 10.1016/S1360-1385(99)01551-4

GLIESSMAN, S. R. **Agroecology: The Ecology of Sustainable Food Systems**. 2nd ed. Santa Cruz: CRC Press, 2006. ISBN 9781498715577

GRAFI, G.; OHAD, N. **Epigenetic Memory and Control in Plants**. 1st, Tel Aviv: Springer, 2013. doi 10.1007/978-3-642-35227-0

GRAYSTON, S. J.; VAUGHAN, D.; JONES, D. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: The importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. **Applied Soil Ecology**, Aberdeen, v. 5, n. 1, p. 29–56, 1997. doi: 10.1016/S0929-1393(96)00126-6

GROSSMAN, J. D.; RICE, K. J. Evolution of root plasticity responses to variation in soil nutrient distribution and concentration. **Evolutionary Applications**, Davis, v. 5, n. 8, p. 850–857, 2012. doi: 10.1111/j.1752-4571.2012.00263.x

GULDEN, R. H.; SHIRTLIFFE, S. J.; GORDON THOMAS, A. Secondary seed dormancy prolongs persistence of volunteer canola in western Canada. **Weed Science**, Saskatoon, v. 51, n. 6, p. 904–913, 2003. doi: 10.1614/P2002-170.

HALF, T. H. **Plant Roots: The Ridden Half**. 4th. Boca Raton: CRC Press, 2013. ISBN-13: 978-1-4398-4649-0.

HARINIKUMAR, K. M.; BAGYARAJ, D. J. Effect of crop rotation on native vesicular arbuscular mycorrhizal propagules in soil. **Plant and Soil**, Bangalore, v. 110, n. 1, p. 77–80, 1988. doi: 10.1007/BF02143542

HENKEL, M. **21st Century Homestead: Sustainable Agriculture III-Agricultural Practices**. 1st ed. Raleigh: Lulu Press 2015. ISBN: 9781312939752

HENRY, H. A. L.; JEFFERIES, R. L. Interactions in the uptake of amino acids, ammonium and nitrate ions in the Arctic salt-marsh grass, *Puccinellia phryganodes*. **Plant, Cell and Environment**, Toronto, v. 26, n. 3, p. 419–428, 2003. doi: 10.1046/j.1365-3040.2003.00973.x

HENRY, R. J.; NEVO, E. Exploring natural selection to guide breeding for agriculture. **Plant Biotechnology Journal**, Brisbane, v. 12, n. 6, p. 655–662, 2014. doi: 10.1111/pbi.12215

HESPANHOL, R. Perspectivas da agricultura sustentável no Brasil. **Confins**, Presidente Prudente, n. 2 p. 1–15, 2008. doi: 10.4000/confins.2353

HIRNER, A. et al. *Arabidopsis* LHT1 is a high-affinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll. **The Plant cell**, Tübingen, v. 18, n. 8, p. 1931–1946, 2006. doi: 10.1105/tpc.106.041012.

HOLLAND, E. A.; COLEMAN, D. C. Litter Placement Effects on Microbial and Organic Matter Dynamics in an Agroecosystem. **Ecology**, Fort Collins, v. 68, n. 2, p. 425–433, 1987. doi: 10.2307/1939274

HOORMAN, J. J. The Role of Soil Bacteria. **Ohio State University Extension**, Columbus, p. 1-4, 2011.

HOROWITZ, A. R.; ISHAAYA, I. (EDS.). **Insect Pest Management: Field and Protected Crops**. 1st ed., New York: Springer, 2004. ISBN 978-3-642-05859-2, ISBN 978-3-662-07913-3.

LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA. Rio de Janeiro: IBGE, v.29 n.12 p.1-82, 2016.

INCAPER. **Tomate**. 1ª ed. Vitória: INCAPER, 2010. ISBN 978-85-89724-17-3

JAAP, B.; HOPKINS, D. W.; BENEDETTI, A. (EDS.). **Microbiological Methods for Assessing Soil Quality**. Cambridge: CABI Publishing, 2006. ISBN-13: 978 0 0851 99 0989, ISBN-10: 0 85199 098 3

JENSEN, E. S. Rhizodeposition of N by pea and barley and its effect on soil N dynamics. **Soil Biology and Biochemistry**, Roskilde, v. 28, n. 1, p. 65–71, 1996. doi: 10.1016/0038-0717(95)00116-6

JL, Y. **The role of cytosolic glutamine synthetases in abiotic stress and development in *Arabidopsis thaliana***. 2011. 96 f. Ph.D. thesis, University of Saskatchewan, Saskatoon, 2011.

JIAN, Y. et al. A preliminary study on DNA sequence diversity of soil microbial community affected by agricultural chemicals. **Acta Ecologica Sinica**, v. 20, n. 6, p. 1021–1027, 2000. cba:533722

JONES, D. L. et al. Role of dissolved organic nitrogen (DON) in soil N cycling in grassland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Bangor, v. 36, n. 5, p. 749–756, 2004. doi: 10.1016/j.soilbio.2004.01.003

JONES, D. L. et al. Dissolved organic nitrogen uptake by plants - an important N uptake pathway? **Soil Biology and Biochemistry**, Bangor, v. 37, n. 3, p. 413–423, 2005. doi: 10.1016/j.soilbio.2004.08.008

JONES, D. L.; DARRAH, P. R. Amino acids influx at the soil-root interface of *Zea mays* L. and its consequences in the rhizosphere. **Plant and Soil**, Ithaca, v. 163, p. 1–12, 1994. doi:10.1007/BF00033935

JONES JR., J. B. **Hydroponics: A Practical Guide for the Soilless Grower**. Boca Raton: CRC Press, 2005. ISBN: 0-8493-3167-6.

KAMIYAMA, A. **Agricultura sustentável**. São Paulo: SMA, 2011. ISBN: 978-85-86624-84-

KELL, D. B. Breeding crop plants with deep roots: Their role in sustainable carbon, nutrient and water sequestration. **Annals of Botany**, Manchester, v. 108, n. 3, p. 407–418, 2011. doi:10.1093/aob/mcr175.

KIEM, R.; KÖGEL-KNABNER, I. Contribution of lignin and polysaccharides to the refractory carbon pool in C-depleted arable soils. **Soil Biology and Biochemistry**, München, v. 35, n. 1, p. 101–118, 2003. doi: 10.1016/S0038-0717(02)00242-0

KOMAROVA, N. Y. et al. AtPTR1 and AtPTR5 transport dipeptides in planta. **Plant Physiology**, Bern, v. 148, n. 2, p. 856–869, 2008. doi: 10.1104/pp.108.123844

KONONOVA, M. M. **Soil organic matter**: Its nature, its role in soil formation and in soil fertility, 2nd, Oxford: Pergamon Press, 1966. ISBN: 978-0-08-011470-5

KUZYAKOV, Y.; DOMANSKI, G. Carbon input by plants into the soil. Review. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Stuttgart, v. 163, n. 4, p. 421–431, 2000. doi: 10.1002/1522-2624(200008)163:4<421::AID-JPLN421>3.0.CO;2-R.

KUZYAKOV, Y.; XU, X. Competition between roots and microorganisms for nitrogen: Mechanisms and ecological relevance. **New Phytologist**, Göttingen, v. 198, n. 3, p. 656–669, 2013. doi: 10.1111/nph.12235

KWAK, Y. S.; WELLER, D. M. Take-all of wheat and natural disease suppression: A review. **Plant Pathology Journal**, Jinju, v. 29, n. 2, p. 125–135, 2013. doi: 10.5423/PPJ.SI.07.2012.0112

LAIRON, D. Nutritional quality and safety of organic food . A review. **Agronomy**, Marseille, v. 30, p. 33–41, 2010. doi: 10.1051/agro/2009019

LAL, R. (ED.). **Encyclopedia of Soil Science**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2005. ISBN 9780849338304

LAMBERS, H.; COLMER, T. D. (EDS.). **Root Physiology**: from Gene to Function. Dordrecht: Springer, 2005. v. 1. ISBN-10 1-4020-4099-7.

LARKIN, R.; HOPKINS, D.; MARTIN, F. Suppression of Fusarium wilt of watermelon by nonpathogenic Fusarium oxysporum and other microorganisms recovered from disease-suppressive soil. **Phytopathology**, Beltsville, v. 86, n. 8, p. 812–819, 1996. doi: 10.1094/Phyto-86-812

LATTANZIO, V. et al. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: **Phytochemistry**: Advances in Research, 2006, p. 23-67, Editor: Filippo Imperato. ISBN: 81-308-0034-9

LEADLEY, P. W.; REYNOLDS, J. F.; CHAPIN III, F. S. A model of nitrogen uptake by *Eriophorum Vaginatum* roots in the field: Ecological implications. **Ecological Monographs**, Durham, v. 67, n. 1, p. 1–22, 1997. doi: 10.1890/0012-9615(1997)067[0001:AMONUB]2.0.CO;2

LEE, R.; CHO, H. Auxin, the organizer of the hormonal/environmental signals for root hair growth. **Frontiers in plant science**, Seoul, v. 4, n. November, p. 448, 2013. doi: 10.3389/fpls.2013.00448

LEE, Y. H. et al. AAP1 transports uncharged amino acids into roots of *Arabidopsis*. **Plant Journal**, Pullman, v. 50, n. 2, p. 305–319, 2007. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03045.x.

LIPSON, D.; NÄSHOLM, T. The unexpected versatility of plants: Organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems. **Oecologia**, Boulder, v. 128, n. 3, p. 305–316, 2001. doi: 10.1007/s004420100693

LIU, D. et al. OsHT, a Rice Gene Encoding for a Plasma-Membrane Localized Histidine Transporter. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 47, n. 1, p. 92–99, 2005. doi:10.1111/j.1744-7909.2005.00016.x.

LOZANO-JUSTE, J.; LEÓN, J. Enhanced abscisic acid-mediated responses in *nia1nia2noa1-2* triple mutant impaired in NIA/NR- and AtNOA1-dependent nitric oxide biosynthesis in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Valencia, v. 152, n. 2, p. 891–903, 2010. doi: 10.1104/pp.109.148023

LYNCH, J. M.; WHIPPS, J. M. Substrate flow in the rhizosphere. **Plant and Soil** Littlehampton, v. 129, n. 1, p. 1–10, 1990. doi: 10.1007/BF00011685

MA, L.; AHUJA, L. R.; BRUULSEMA, T. (EDS.). **Quantifying and Understanding Plant Nitrogen Uptake for Systems Modeling**. Boca Raton: CRC Press, 2009. ISBN 9781420052954

MALAVOLTA, E. **Manual de Química Agrícola**. 1ª ed. São Paulo: Editora Ceres, 1976. ISBN: 8531800188

MARSCHNER, P. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3rd ed. London: Elsevier, 2012. ISBN : 978-0-12-384905-2

MAZOYER, M.; ROUDART, L. **História das agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea**. São Paulo: Editora UNESP; Brasília, DF: NEAD, 2010. ISBN 978-85-7139-994-5 (Editora UNESP), ISBN 978-85-60548-60-6 (NEAD).

MAZZOLA, M. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, Wenatchee, v. 81, n. 1–4, p. 557–564, 2002. doi:10.1023/A:1020557523557.

MERRIFIELD, K. The secret life of soil. **Oregon State University Extension Service**, Corvallis, p. 1-1, 2010. Disponível em: <<http://extension.oregonstate.edu/gardening/secret-life-soil-0>>. Acesso em 2 de janeiro de 2016.

MERRILL, S. D.; TANAKA, D. L.; HANSON, J. D. Root Length Growth of Eight Crop Species in Haplustoll Soils. **Soil Science Society of America Journal**, Mandan, v. 66, n. 3, p. 913, 2002. doi:10.2136/sssaj2002.9130

MIYAWAKI, K. et al. Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Toyonaka, v. 103, n. 44, p. 16598–603, 2006. doi: 10.1073/pnas.0603522103

MIYAWAKI, K.; MATSUMOTO-KITANO, M.; KAKIMOTO, T. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: Tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. **Plant Journal**, Osaka, v. 37, n. 1, p. 128–138, 2004. doi: 10.1046/j.1365-3113X.2003.01945.x

MURPHY, D. V. et al. Soluble organic nitrogen in agricultural soils. **Biology and Fertility of Soils**, Harpenden, v. 30, n. 5–6, p. 374–387, 2000. doi:10.1007/s003740050018

MUTWIWA, U. N. et al. Effects of UV-absorbing plastic films on greenhouse whitefly (Homoptera : Aleyrodidae). **Journal of Economic Entomology**, Hannover, v. 98, n. 4, p. 1221–1228, 2005. doi: 10.1603/0022-0493-98.4.1221

NANNIPIERI, P. et al. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, Firenze, v. 54, n. 4, p. 655-670, 2003. doi: 10.1046/j.1365-2389.2003.00556.x

NÄSHOLM, T.; HUSS-DANEL, K.; HÖGBERG, P. Uptake of Organic Nitrogen in the Field By Four Agriculturally Important Plant Species. **Ecology**, Umeå, v. 81, n. 4, p. 1155–1161, 2000. doi: 10.1890/0012-9658(2000)081[1155:UOONIT]2.0.CO;2

NÄSHOLM, T.; KIELLAND, K.; GANETEG, U. Uptake of organic nitrogen by plants. **New Phytologist**, Umeå, v. 182, n. 3, p. 31–48, 2009. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02751.x

NÄSHOLM, T.; PERSSON, J. Plant acquisition of organic nitrogen in boreal forests. **Physiologia Plantarum**, Umeå, v. 111, n. 4, p. 419–426, 2001. doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110401.x

NEPA - NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 4ª ed. Campinas: UNICAMP, 2011.

ODUM, E. P.; BARRETT, G. W. **Fundamentos de Ecologia**, 5ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2007. ISBN-13: 978-85-221-0541-0, ISBN-10: 85-2210541-3

OKADA, M. **True health**, 1st ed. Culver: Izunome Association, 1987.

PADGETT, P. E.; LEONARD, R. T. Regulation of nitrate uptake by amino acids in maize cell suspension culture and intact roots. **Plant and Soil**, Riverside, v. 155–156, n. 1, p. 159–161, 1993. doi:10.1007/BF00025008

PADGETT, P.; LEONARD, R. Free amino acid levels and the regulation of nitrate uptake in maize cell suspension cultures. **Journal of Experimental Botany**, Riverside, v. 47, n. 300, p. 871–883, 1996. doi:10.1093/jxb/47.7.871

PAUNGFOO-LONHIENNE, C. et al. Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Stanford, v. 105, n. 11, p. 4524–9, 2008. doi: 10.1073/pnas.0712078105

PERALTA, I. E.; SPOONER, D. M.; KNAPP, S. Taxonomy of Wild Tomatoes and Their Relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae). **Systematic Botany Monographs**, Cuyo, v. 84, n. 2, 2008. doi: 10.2307/25027972

PÉREZ, S.; AHMED, A. I. S.; CABEZAS, D. Molecular and biochemical characterization of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants cv. Micro-Tom under lead (Pb)-induced stress. **Biotechnologia Aplicada**, Mayabeque, v. 30, n. 3, p. 194–198, 2013.

PERSSON, J.; NÄSHOLM, T. Regulation of amino acid uptake in conifers by exogenous and endogenous nitrogen. **Planta**, Umeå, v. 215, n. 4, p. 639–644, 2002. doi: 10.1007/s00425-002-0786-5

PIMENTEL, D. et al. Environmental, Energetic, and Economic Comparisons of Organic and Conventional Farming Systems. **BioScience**, Ithaca, v. 55, n. 7, p. 573, 2005. doi: 10.1641/0006-3568(2005)055[0573:EEAECO]

PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. (EDS.). **The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. ISBN-10: 0-8493-3855-7, ISBN-13: 978-0-8493-3855-7

PRIMAVESI, A. M. **Manejo Ecológico do solo**. 1^a ed., São Paulo: Nobel, 1981. ISBN: 8521300042.

PRIMAVESI, A. M. **Cartilha do Solo**. 1^a ed. São Paulo: Fundação Mokiti Okada-MOA, 2006. ISBN 85-88173.07-7

PRIMAVESI, A. M. Agroecologia e Manejo do Solo. **Agriculturas**, v. 5, n. 3, p. 7–10, 2008. Disponível em: <<http://aspta.org.br/wp-content/uploads/2014/10/Artigo-1-Agroecologia-e-manejo-do-solo.pdf>>. Acesso em 23 de dezembro de 2015.

PROHENS, J.; NUEZ, F. **Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae**. 1st ed. Valencia: Springer, 2008. ISBN: 978-0-387-74108-6, 978-0-387-74110-9

RECH, T. D. et al. Efeito da acícula e de mudas de pinus na qualidade da água percolada em colunas de um Cambissolo álico típico da região de recarga do sistema aquífero integrado Guarani / Serra Geral. In: XXVI Congresso Brasileiro de Agronomia, 2009, Gramado. **Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Agronomia**, 2009, Gramado.

REGANOLD, J. P.; WACHTER, J. M. Organic agriculture in the twenty-first century. **Nature Plants**, Pullman, v. 2, n. February, p. 15221, 2016. doi: 10.1038/NPLANTS.2015.221

ROBINSON, D.; RORISON, I. H. Root hairs and plant growth at low nitrogen availabilities. **New Phytologist**, Sheffield, v. 107, p. 681–693, 1987. doi: 10.1111/j.1469-8137.1987.tb00906.x

SAINJU, U. M.; JABRO, J. Effects of Soil Aggregation and Tillage Practices on Soil Quality, Structure and Nutrient Cycling. **Agricultural Systems Research Unit: Soil Aggregation and Tillage Practices**, p. 1-2, 2014. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/Research/docs.htm?docid=10539>>. Acesso em 18 de novembro de 2015.

SALSAC, L. et al. Nitrate and ammonium nutrition in plants. **Plant Physiology Biochemistry**, Versailles, v. 25, n. 6, p. 805–812, 1987.

SANTOS, J. V. Observar, conhecer e integrar. Passos para uma perspectiva sistêmica. Entrevista especial com Ana Primavesiolo. **Instituto Humanitas Unisinos**, 2016. Disponível em: < <http://www.ihu.unisinos.br/entrevistas/554700-observar-conhecer-e-integrar-passos-para-uma-perspectiva-sistemica-entrevista-especial-com-ana-primavesi>>. Acesso em 25 de março de 2017.

SARNIGUET, A.; LUCAS, P.; LUCAS, M. Relations between take-all, soil conduciveness to the disease, population of fluorescent Pseudomonads and nitrogen fertilizers. **Plant Soil**, Le Rheu, v. 145, n. 1973, p. 17–27, 1992. doi:10.1007/BF00009537.

SCHEIBLE, W.-R. et al. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. **Plant Journal**, Heidelberg, v. 11, n. 4, p. 671-691, 1997a. doi: 10.1046/j.1365-3113X.1997.11040671.x

SCHEIBLE, W.-R. et al. Nitrate Acts as a Signal to Induce Organic Acid Metabolism and Repress Starch Metabolism in Tobacco. **The Plant cell**, v. 9, n. May, p. 783–798, 1997b. doi:10.1105/tpc.9.5.783

SCHMIDT, S.; NÄSHOLM, T.; RENTSCH, D. Organic nitrogen. **New Phytologist**, Brismane, v. 203, n. 1, p. 29–31, 2014. doi/10.1111/nph.12851

SCHMIDT, W. Root systems biology. **Frontiers in Plant Science**, Taipei, v. 5, n. May, p. 1–2, 2014. doi: 10.3389/fpls.2014.00215

SHEN, W. et al. Higher rates of nitrogen fertilization decrease soil enzyme activities, microbial functional diversity and nitrification capacity in a Chinese polytunnel greenhouse vegetable land. **Plant and Soil**, Nanjing, v. 337, n. 1, p. 137–150, 2010. doi: 10.1007/s11104-010-0511-

SHERROD, L. A. et al. Cropping Intensity Enhances Soil Organic Carbon and Nitrogen in a No-Till Agroecosystem. **Soil Science Society of America**, Madison, v. 67, p. 1533–1543, 2003. doi: 10.2136/sssaj2003.1533

SHI, S. et al. Effects of selected root exudate components on soil bacterial communities. **FEMS Microbiology Ecology**, Christchurch, v. 77, n. 3, p. 600–610, 2011. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01150.x

SHIMIZU-SATO, S.; TANAKA, M.; MORI, H. Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. **Plant Molecular Biology**, Nagoya, v. 69, n. 4, p. 429–435, 2009. doi: 10.1007/s11103-008-9416-3

SINSABAUGH, R. L. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Albuquerque, v. 42, n. 3, p. 391–404, 2010. doi:10.1016/j.soilbio.2009.10.014

SISA, M. et al. Photochemistry of flavonoids. **Molecules**, Bloemfontein, v. 15, n. 8, p. 5196–5245, 2010. doi:10.3390/molecules15085196

SMITH-SPANGLER, C. et al. Are Organic Foods Safer or Healthier Than Conventional Alternatives? **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 157, n. 5, p. 348–366, 2012. doi: 10.7326/0003-4819-157-5-201209040-00007

SOIL SURVEY STAFF. Unlock the secrets in the soil: Basics & Benefits. January 2013.

SOMMER, R. et al. Effects of Zero Tillage and Residue Retention on Soil Quality in the Mediterranean Region of Northern Syria. **Open Journal of Soil Science**, Nairobi, v. 4, n. March, p. 109–125, 2014. doi: 10.4236/ojss.2014.43015.

SOUZA, J. L. DE. **Agricultura Orgânica**. Vitória: INCAPER, 2015. ISBN: 8585496-09-6

STEWART, A. J. et al. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. **Plant, Cell and Environment**, Glasgow, v. 24, n. 11, p. 1189–1197, 2001. doi: 10.1046/j.1365-3040.2001.00768.x

SU, Y. H.; LIU, Y. B.; ZHANG, X. S. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. **Molecular Plant**, Tai'an, v. 4, n. 4, p. 616–625, 2011. doi: 10.1093/mp/ssr007

SVENNERSTAM, H. et al. Comprehensive screening of *Arabidopsis* mutants suggests the lysine histidine transporter 1 to be involved in plant uptake of amino acids. **Plant physiology**, Umeå, v. 143, n. 4, p. 1853–60, 2007. doi: 10.1104/pp.106.092205.

TAIZ, L. et al. **Plant Physiology and Development**. 6th ed. Santa Cruz: Sinauer Associates, 2015. ISBN: 9781605352558.

TEGEDER, M.; RENTSCH, D. Uptake and partitioning of amino acids and peptides. **Molecular Plant**, Pullman, v. 3, n. 6, p. 997–1011, 2010. doi: 10.1093/mp/ssq047

TSUTSUMI, D. **Study on Root System Development by Modeling Approach**. 2003. 141 f. Ph.D. thesis, Kyoto University, Kyoto, 2003.

UPHOPP, N. et al. (EDS.). **Biological approaches to sustainable soil systems**. Boca Raton: CRC Press, 2006. ISBN-10: 1-57444-583-9, ISBN-13: 978-1-57444-583-1.

VAN BREEMEN, N. Nitrogen cycle: Natural organic tendency. **Nature**, Wageningen, v. 415, n. 6870, p. 381–382, 2002. doi :10.1038/415381a

VAN BRUGGEN, A. H. C. **Plant Disease Severity in High-Input Compared to Reduced-Input and Organic Farm Systems** **Plant Disease**, Davis, v. 79, n. 10, p. 976–984, 1995. doi: 10.1094/PD-79-0976.

VERSLUES, P. E.; SHARMA, S. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. **The Arabidopsis book**, Taipei, v. 8, p. e0140, 2010. doi: 10.1199/tab.0140

WARREN, C. R. Organic N molecules in the soil solution: What is known, what is unknown and the path forwards. **Plant and Soil**, Sydney, v. 375, n. 1–2, p. 1–19, 2014. doi: 10.1007/s11104-013-1939-y

WILLETT, V. B. et al. Dissolved organic nitrogen regulation in freshwaters. **Journal of environmental quality**, Cardiff, v. 33, n. 1, p. 201–209, 2004. doi: 10.2134/jeq2004.0201

WORKNEH, F. et al. Variables associated with corky root and Phytophthora root rot of tomatoes in organic and conventional farms **Ecology and Epidemiology**. **Phytopathology**, Davis, v. 83, n. 5, p. 581–589, 1993. doi: 10.1094/Phyto-83-581.

WU, F.; MENG, L.; WANG, X. Soil enzyme activities in vegetable rotation and continuous cropping system of under Shed Protection. **Plant Nutrition and Fertilizer Science**, Harbin, v. 12, n. 4, p. 554–558, 2006.

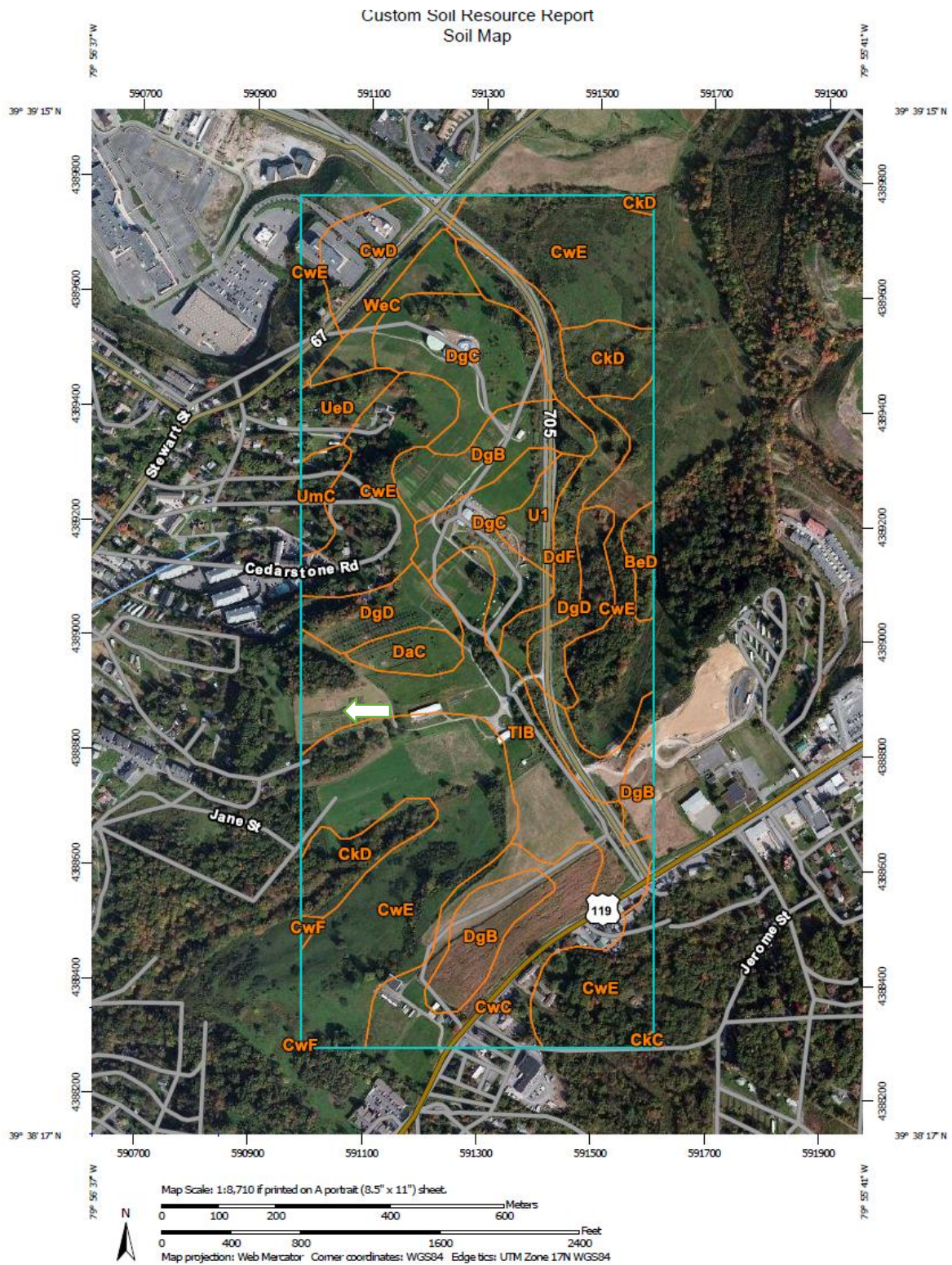
YANG, Y. H. et al. Effects of agricultural chemicals on DNA sequence diversity of soil microbial community: A study with RAPD marker. **Microbial Ecology**, Nanjing, v. 39, n. 1, p. 72–79, 2000. doi: 10.1007/s002489900180

YI, K. et al. A basic helix-loop-helix transcription factor controls cell growth and size in root hairs. **Nature genetics**, Norwich, v. 42, n. 3, p. 264–267, 2010. doi:10.1038/ng.529

YU, Z. et al. Contribution of amino compounds to dissolved organic nitrogen in forest soils. **Biogeochemistry**, Davis, v. 61, n. 2, p. 173–198, 2002. doi:10.1023/A:1020221528515

APÊNDICES

APÊNDICE A - Mapa de solos da WVUOAF. A área do experimento, indicada pela seta, está na seção TIB.



APÊNDICE B – Parcelas experimentais das agriculturas natural e orgânica.

Parcelas experimentais da agricultura natural com 66,15 m² (4,90 m x 13,50 m)

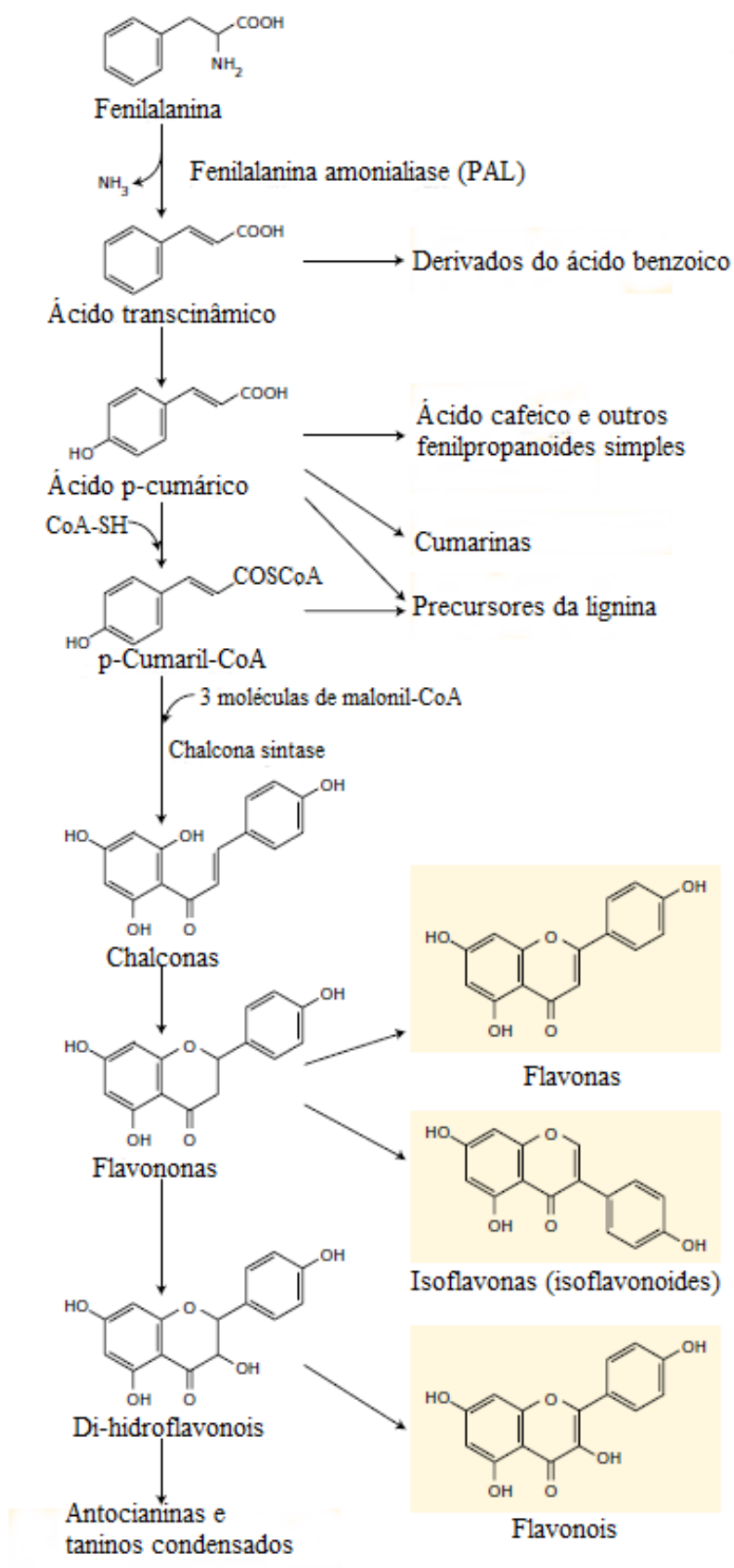
Agricultura Natural-NF			
T15	1 muda T15	1 muda T0	T15
T15	5 mudas T15	5 mudas T0	T15
T15	5 mudas T0	5 mudas T15	T15
T15	5 mudas T15	5 mudas T0	T15
T15	5 mudas T0	5 mudas T15	T15
T15	5 mudas T15	5 mudas T0	T15
T15	1 muda T15	1 muda T0	T15
Passagem gramada de 1 metro de largura entre canteiros			

Borda	Plantas estudadas
-------	-------------------

Parcelas experimentais da agricultura orgânica com 66,15 m² (4,90 m x 13,50 m)

Agricultura orgânica-OF			
Passagem gramada de 1 metro de largura entre canteiros NF e OF			
T15	1 muda T15	1 muda T0	T0
T15	5 mudas T15	5 mudas T0	T0
T15	5 mudas T0	5 mudas T15	T0
T15	5 mudas T15	5 mudas T0	T0
T15	5 mudas T0	5 mudas T15	T0
T15	5 mudas T15	5 mudas T0	T0
T15	1 muda T15	1 muda T0	T0
Estradinha gramada			

APÊNDICE C - Via dos fenilpropanoides que tem a PAL como a principal enzima (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015; TAIZ et al. 2015. [8.Referências]).



APÊNDICE D - Análises químicas e físicas do Sítio Alice, Marechal Floriano-ES

Diário
12/04/14

Sede



Centro Regional de Desenvolvimento Rural Centro Serrano
Rod. BR 262 km 94 CEP: 29.375.000 Venda Nova do Imigrante
Tel: (27) 3248.1181 Email: crdcserrano@incaper.es.gov.br
CGC/MF: 27.273.416.0001-30 - Insc. Estadual: 080.638.35-0

Laboratório de Análises de Solos

Registro Nº: 1107
Cliente: Nelson Salgado Tavares
Propriedade: Sítio Rita

Município: Marechal Floriano-ES
Data: 10/09/2014
Valor: R\$ 36,41

Referência	Referência do Cliente	pH	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H + AL
Laboratório		H ₂ O	mg/dm ³			cmol _c /dm ³			
1	Tomate	6,5	420	79	7	4,5	0,7	0,0	2,7

Referência	SB	t	T	V	m	ISNa	MO	P-rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
Laboratório	cmol _c /dm ³			%			dag/kg	mg/L	mg/dm ³					
1	5,5	5,5	8,2	67	0	0,0	2,7	-	30,0	54,7	23,4	4,6	0,6	-

pH em água - Relação 1:2,5
P - Na - K - Fe - Zn - Mn - Cu - Extrator Mehlich-1
Ca - M - Al - Extrator KCl - 1 mol/L
H + Al - Correlação com pH SMP
B - Extrator água quente
S - Extrator Fósforo monocalcico em ácido acético
SB - Soma de bases trocáveis

t - Capacidade de troca catiônica efetiva
T - Capacidade de troca catiônica a pH 7 (CTC)
V - Índice de saturação em bases
m = Índice de saturação em alumínio
ISNa = Índice de saturação de sódio
MO - Matéria orgânica (C.org. x 1.724)
P-rem - Fósforo remanescente ou de equilíbrio

Responsável Técnico
ANDRÉ GUARÇONI MARTINS
D.Sc. SOLOS E NUTRIÇÃO DE PLANTAS
CREA 011166-D

Interpretação da Análise do Solo

Estimativa da textura do solo em função do fósforo remanescente (P-rem)

P-rem (mg/L)	Estimativa da textura do solo
0 - 10	Argilosa
10 - 40	Média
40 - 60	Arenosa

Classes de interpretação para fósforo disponível em função da cultura e da textura do solo

Determinação	Método	Unidade	Cultura	Textura	Classificação		
					Baixo	Médio	Alto
Fósforo (P)	Mehlich-1	mg/dm ³	Perene	Argilosa	< 5	5 - 10	> 10
				Média	< 10	10 - 20	> 20
				Arenosa	< 20	20 - 30	> 30
			Anual	Argilosa	< 20	20 - 40	> 40
				Média	< 40	40 - 60	> 60
				Arenosa	< 60	60 - 80	> 80
			Hortaliça	Argilosa	< 30	30 - 60	> 60
				Média	< 60	60 - 100	> 100
				Arenosa	< 100	100 - 150	> 150

Classes de interpretação para potássio disponível em função da cultura

Determinação	Método	Unidade	Cultura	Classificação		
				Baixo	Médio	Alto
Potássio (K)	Mehlich-1	mg/dm ³	Perene/Anual	< 60	60 - 150	> 150
			Hortaliça	< 80	80 - 200	> 200

Classes de interpretação para cátions, enxofre e matéria orgânica

Determinação	Método	Unidade	Classificação		
			Baixo	Médio	Alto
Cálcio (Ca)	KCl 1M	cmol/dm ³	< 1,5	1,5 - 4,0	> 4,0
Magnésio (Mg)	KCl 1M	cmol/dm ³	< 0,5	0,5 - 1,0	> 1,0
Alumínio (Al)	KCl 1 M	cmol/dm ³	< 0,3	0,3 - 1,0	> 1,0
Enxofre (S)	CaH ₂ PO ₄ 0,01 M	mg/dm ³	< 5,0	5,0 - 10	> 10
Acidez potencial (H + Al)	Correlação pH SMP	cmol/dm ³	< 2,5	2,5 - 5,0	> 5,0
Soma de bases (SB)	K + Ca + Mg + Na	cmol/dm ³	< 2,0	2,0 - 5,0	> 5,0
CTC efetiva (t)	SB + Al	cmol/dm ³	< 2,5	2,5 - 6,0	> 6,0
CTC pH 7 (T)	SB + H + Al	cmol/dm ³	< 4,5	4,5 - 10	> 10
Saturação em bases (V)	SB/CTC x 100	%	< 50	50 - 70	> 70
Saturação de alumínio (m)	Al/t x 100	%	< 20	20 - 40	> 40
Matéria orgânica (MO)	Colorimétrico	dag/dm ³	< 1,5	1,5 - 3,0	> 3,0

Classes de interpretação para micronutrientes disponíveis no solo

Determinação	Método	Unidade	Classificação		
			Baixo	Médio	Alto
Boro (B)	Água quente	mg/dm ³	< 0,35	0,35 - 0,9	> 0,9
Zinco (Zn)	Mehlich - 1	mg/dm ³	< 1,0	1,0 - 2,2	> 2,2
Cobre (Cu)	Mehlich - 1	mg/dm ³	< 0,8	0,8 - 1,8	> 1,8
Ferro (Fe)	Mehlich - 1	mg/dm ³	< 20	20 - 45	> 45
Manganês (Mn)	Mehlich - 1	mg/dm ³	< 5,0	5,0 - 12	> 12



CENTRO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO RURAL

Rod. BR 101 Norte – Km 125 - Caixa Postal, 62 CEP: 29.915-140 – LINHARES/ES
 Tel: (0xx27) 3371-1210 / 4959 – Fax: (0xx27) 3371-4942
 E-mail: crdrcentronorte@incaper.es.gov.br

LABORATÓRIO DE ANÁLISES DE SOLOS

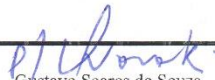
SOLICITANTE: NELSON S. TAVARES
 PROPRIEDADE:
 ENDEREÇO: MARECHAL FLORIANO/ES

RESULTADO DE ANÁLISE GRANULOMÉTRICA

REGISTRO	IDENTIFICAÇÃO AMOSTRA	AREIA GROSSA	AREIA FINA	SILTE	ARGILA	CLASSIFICAÇÃO TEXTURAL
		g / kg				
274	TOMATE 0-20	539	97,80	183,00	180	Franco Arenoso

- Método analítico: EMBRAPA (2011)

Data: 05 / 09 / 2014


 Gustavo Soares de Souza
 Eng. Agrônomo – D.Sc.
 CREA-ES 028042/D
 Responsável técnico



INCAPER

INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL

Produtor: Luiz Cláudio

Adubação para a Cultura do Tomate

Espaçamento (m x m): x = 20.000 pl/ha

Análise do Solo:

420	P (mg/dm ³)
79	K (mg/dm ³)
8,2	CTC (T) (cmol _c /dm ³)
67	V (%)

PRNT do calcário: %

Quantidade de Calcário: 1,2 t/ha (dolomítico) = 120 g/m²

Quantidade de Nutrientes: 280 kg/ha de N
 (Para todo o ciclo da cultura) 0 kg/ha de P₂O₅
 550 kg/ha de K₂O

Quantidade de Fertilizantes:

Adubação por Cova: 15 g/cova de 20-00-30 ou 3 L de esterco bovino
 0 g/cova de Superfosfato Simples
 6 g/cova de FTE

Adubação de cobertura: 15 g/ planta de 20-00-30 aos 15, 30, 45 e 60 dias do plantio
 20 g/ planta de 10-00-30 aos 75, 90, 105 e 120 dias do plantio

Observações:

- 1) Se utilizar esterco de cama de aves, reduzir a dose pela metade. Se utilizar esterco de gaiola, reduzir a dose para 1/3. Se utilizar composto, aplicar a mesma dose do esterco bovino.
- 2) Reduzir 10% de P₂O₅ para cada 5 toneladas de esterco de gado ou 2 toneladas de esterco de aves
- 3) Reduzir a dose de nitrogênio no caso de excessivo vigor vegetativo das plantas.
- 4) No caso de ocorrência de podridão apical, pulverizar os frutos em formação com solução de 6 g/L de Cloreto de Cálcio semanalmente, enquanto persistir a ocorrência nos frutos novos.
- 5) A deficiência de magnésio (amarelo baixeiro) pode ser corrigida com pulverizações nas folhas de solução 20 g/L de sulfato de magnésio, duas a três vezes. A adição de 5 g/L de uréia favorece a absorção foliar do magnésio.
- 6) Produtividade esperada = 100 t/ha de produto comercial

Data: