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

Sinais elétricos em microtomateiros mutantes em ABA: aspectos eletrofisiológicos e metabólicos sob diferentes condições hídricas

Fábia Barbosa da Silva

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2020**

Fábia Barbosa da Silva
Licenciada em Ciências Biológicas

Sinais elétricos em microtomateiros mutantes em ABA: aspectos eletrofisiológicos e metabólicos sob diferentes condições hídricas

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO FERRAZ DE OLIVEIRA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Silva, Fábيا Barbosa da

Sinais elétricos em microtomateiros mutantes em ABA: aspectos eletrofisiológicos e metabólicos sob diferentes condições hídricas/ Fábيا Barbosa da Silva - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

85 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Sinalização elétrica 2. Ácido abscísico 3. Potencial de ação 4. Comunicação 5. Medicação extracelular I. Título

Dedicatória

*Aos meus pais Florisbela e Cacildo, a minha irmã Flávia e meus sobrinhos Bruna e Brener, e
a nossa Sofia minha filha amada, dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, força e proteção. Aos meus pais, pelo amor não só comigo, mas com a nossa Sofia, paciência, dedicação, doação incentivo e pelo apoio incondicional, com certeza minha força, meu tudo.

A minha irmã, que transmite amor, apoio e força mesmo estando longe. Aos meus sobrinhos Bruna e Brener, pelo amor e esperança. A toda minha família, pelo carinho e incentivo.

Ao meu orientador Professor Ricardo Ferraz de Oliveira, exemplo de dedicação, pela orientação, ensinamentos e oportunidades oferecidas. Obrigada pela amizade durante todos esses anos e pelo carinho desde do dia que lhe falei sobre a vinda da Sofia. Me apoiou, incentivou e aconselhou durante todos os momentos. Obrigada de coração.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Programa de pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela oportunidade de realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos.

A todos amigos do Laboratório de Estudo de Plantas Sob Estresse, Aldeir, Diogo e Gabriel pelos agradáveis momentos que passamos juntos, aprendizados, pela disponibilidade e dedicação nas análises realizadas. À Francynês que me ajudou em todas as etapas da tese, estudos e pelos conselhos, meu muito obrigada.

Aos meus amigos e irmãos de coração Diego, Zélia e Daniele, pela amizade, lealdade, convivência, amparo em todos os momentos.

Ao Prof. Carlos Alberto Labate e a Thaís pela parceria nas análises metabólicas que enriqueceu o trabalho e pelos ensinamentos durante o período que estive no Laboratório de Genética Funcional de Plantas, muito obrigada.

Ao Dr. José Bruno Malaquias pela parceria nas análises estatísticas e a disponibilidade em ensinar sempre que solicitado.

As secretárias do programa de pós-graduação e do LEPSE, pela amizade, dedicação, competência e profissionalismo que sempre empenharam em seus trabalhos.

A Dona Neuza, faxineira do LEPSE, que sempre empenhou em seu trabalho e deixou as salas sempre tão cheirosas. Obrigada também pela amizade.

A todos meus colegas e amigos de pós-graduação e da ESALQ, pela amizade, companheirismo e pelo compartilhamento de conhecimentos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela dedicação e ensinamentos repassados durante toda minha jornada de acadêmica.

E por fim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que este estudo se tornasse realidade, muito obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. CARACTERIZAÇÃO DE MULTIVARIÁVEIS DE SINAIS ELÉTRICOS GERADOS ESPONTANEAMENTE E EVOCADOS POR ESTÍMULO ELÉTRICO EM MICROTOMATEIROS MUTANTES EM ÁCIDO ABSCÍSICO	19
RESUMO	19
ABSTRACT	19
2.1. INTRODUÇÃO	20
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.2.1. Material vegetal e condições de crescimento	21
2.2.2. Registro da atividade elétrica	22
2.2.3. Análise estatística	23
2.3. RESULTADOS	24
2.3.1. Sinais elétricos gerados espontaneamente	24
2.3.2. Comportamento periódico de potenciais de ação e de variação espontâneos	27
2.3.3. O estímulo elétrico induz a propagação de potenciais de ação	28
2.4. DISCUSSÃO	30
2.5. CONCLUSÃO	33
3. EFEITO DA PROPAGAÇÃO DE POTENCIAIS DE AÇÃO NAS TROCAS GASOSAS DE MICROTOMATEIRO MUTANTES EM ABA APÓS ESTÍMULO DE REIDRATAÇÃO	39
RESUMO	39
ABSTRACT	39
3.1. INTRODUÇÃO	39
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.2.1. Material vegetal e condições experimentais	41
3.2.2. Potencial da água	42
3.2.3. Atividade elétrica	43
3.2.4. Trocas gasosas	44
3.2.5. Análise estatística	44
3.3. RESULTADOS	45
3.3.1. Potencial de água das plantas	45
3.3.2. Ritmo diário do potencial de repouso dos mutantes em ABA	45
3.3.3. Respostas das trocas gasosas ao sinal elétrico após o estímulo de reidratação	46
3.4. DISCUSSÃO	52
3.5. CONCLUSÃO	55
4. CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO E SUA CONTRIBUIÇÃO NA EVOCAÇÃO DE SINAIS ELÉTRICOS EM MUTANTES DE ABA	63
RESUMO	63
ABSTRACT	63
4.1. INTRODUÇÃO	63
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	65
4.2.1. Material vegetal e condições experimentais	65
4.2.2. Atividade elétrica	66
4.2.3. Análises metabólicas	67
4.2.3.1. Extração de metabólitos e derivatização das amostras	67
4.2.3.2. GC/TOFMS	68
4.2.3.3. Identificação dos metabólitos	68
4.2.4. Análise estatística	69
4.3. RESULTADOS	69
4.3.1. O estímulo de reidratação induz a propagação de potencial de ação em mutante deficiente em ABA	69
4.3.2. Análise comparativa entre os mutantes em ABA e o tipo selvagem: alterações metabólicas que contribuíram para a separação dos tratamentos	70
4.4. DISCUSSÃO	72
4.4.1. O déficit hídrico altera o metabolismo de plantas de MTwt e MTNCED mas não evoca sinais elétricos após o estímulo de reidratação	73

4.4.2. Déficit hídrico prepara as plantas de MT <i>not</i> na evocação de potenciais de ação após a aplicação do estímulo de reidratação	74
4.5. CONCLUSÃO	77
6 CONCLUSÃO GERAL	85

RESUMO

Sinais elétricos em microtomateiros mutantes em ABA: aspectos eletrofisiológicos e metabólicos sob diferentes condições hídricas

A pesquisa sobre a sinalização em plantas tradicionalmente se concentra no papel dos fitohormônios, ondas de cálcio e espécie reativas de oxigênio como moléculas sinalizadoras de longa distância. No entanto, sabe-se que as plantas têm a capacidade de gerar sinais elétricos necessários nas comunicações intra e intercelulares em resposta a diferentes fatores ambientais, como luz, ferimentos, estresse hídrico e fotoperiodismo. No entanto, ainda não está claro se a comunicação elétrica está ligada à presença de outras vias de sinalização como a via do ácido abscísico ou, ainda, se durante períodos de estresse, como o déficit hídrico, o ajuste metabólico está relacionado com a geração de sinais elétricos após a reidratação das plantas. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho caracterizar os sinais elétricos gerados em plantas de tomateiros mutantes em ácido abscísico e identificar as mudanças eletrofisiológicas e metabólicas que estejam associadas à propagação de sinais elétricos na resposta à seca e ao estímulo de reidratação nestas plantas. Foram realizados três estudos independentes para avaliar a geração de sinais elétricos em microtomateiros, cultivar Micro-Tom (MT) do tipo selvagem (*MTwt*) e dos mutantes isogênico *MTnotabilis* (*MTnot*) e transgênico *MTsp12::NCED* (*MTNCED*). O primeiro estudo avaliou quais sinais elétricos são gerados espontaneamente e evocados via estímulo elétrico. O segundo e o terceiro estudo foram realizados para avaliar o efeito do déficit hídrico e do estímulo de reidratação nas trocas gasosas, no metabolismo e na geração de potenciais de ação nos microtomateiros e, ainda, o efeito dos sinais elétricos nas respostas fisiológicas. Potenciais de ação espontâneos foram observados com maior frequência no *MTnot* em comparação ao *MTwt* e *MTNCED*. Por outro lado, potenciais de variação espontâneos ocorreram com maior frequência no *MTNCED*, demonstrando que o ABA influencia na propagação do sinal. Além disso, a exposição das plantas ao déficit hídrico induziu uma despolarização crescente do potencial elétrico da membrana plasmática em *Mtwt* e *MTnot*, o que contribuiu na geração de potenciais de ação após a aplicação do estímulo de reidratação. No *MTwt*, o sinal elétrico induziu aumento na taxa fotossintética, condutância estomática e taxa transpiratória. Em contraste, as variáveis de trocas gasosas foram reduzidas nos mutantes em ABA. Adicionalmente, os maiores níveis de ácido glutâmico, asparagina e GABA sob déficit hídrico podem ter influenciado na indução e propagação do sinal elétrico em *MTnot*.

Palavras-chave: Sinalização elétrica, Ácido abscísico, Potencial de ação, Comunicação; Medicação extracelular

ABSTRACT

Electrical signals in ABA mutant microtomatos: electrophysiological and metabolic aspects under different water conditions

Research on plant signaling has traditionally focused on the role of phytohormones, calcium waves and reactive oxygen species as long-distance signaling molecules. However, it is known that plants have the ability to generate electrical signals necessary for intra and intercellular communications in response to different environmental factors, such as light, injuries, water stress and photoperiodism. However, it is not yet clear whether electrical communication is linked to the presence of other signaling pathways such as the abscisic acid pathway, or whether, during periods of stress, such as water deficit, metabolic adjustment is related to the generation of electrical signals after rehydration of the plants. Therefore, the objective of this work was to characterize the electrical signals generated in plants of mutant tomato plants in abscisic acid and to identify the electrophysiological and metabolic changes that are associated with the propagation of electrical signals in response to drought and the rehydration stimulus in these plants. Therefore, the objective of this work was to characterize the electrical signals generated in plants of mutant tomato plants in abscisic acid and to identify the electrophysiological and metabolic changes that are associated with the propagation of electrical signals in response to drought and the rehydration stimulus in these plants. Three independent studies were carried out to evaluate the generation of electrical signals in microtomatoes, cultivar Micro-Tom (MT) of the wild type (*MTwt*) and of the isogenic mutants *MTnotabilis* (*MTnot*) and transgenic *MTsp12::NCED* (*MTNCED*). The first study evaluated which electrical signals are spontaneously generated and evoked via electrical stimulus. The second and third studies were carried out to evaluate the effect of water deficit and the rehydration stimulus on gas exchange, metabolism and the generation of action potentials in microtomatoes and also the effect of electrical signals on physiological responses. Spontaneous action potentials were observed more frequently in *MTnot* compared to *MTwt* and *MTNCED*. On the other hand, spontaneous variation potentials occurred more frequently in *MTNCED*, demonstrating that ABA influences signal propagation. In addition, the plants exposed to water deficit induced an increasing depolarization of the electrical potential of the plasma membrane in *MTwt* and *MTnot*, which contributed to the generation of action potentials after the application of the rehydration stimulus. In *MTwt*, the electrical signal induced an increase in photosynthetic rate, stomatal conductance and transpiration. In contrast, gas exchange traits were reduced in ABA mutants. Additionally, the higher levels of glutamic acid, asparagine and GABA under water deficit may have influenced the induction and propagation of the electrical signal in *MTnot*.

Keywords: Electrical signaling, Abscísico acid, Action potential, Comunicación, Extracellular medication

1. INTRODUÇÃO GERAL

As plantas por seu estilo de vida sésstil são capazes de reunir e atualizar informações continuamente sobre o ambiente e, assim, tomar decisões que conciliem o seu bem-estar. A comunicação eficiente, coordenação da alocação de recursos, sinalização rápida entre partes da planta acima e abaixo do solo estão entre os atributos necessários para respostas adaptativas ao ambiente (Ruan et al., 2013; Xu et al., 2015), e isso acontece em função de uma sofisticada rede de sinalização presente nas células que propaga informações a curta e longas distâncias. Essa rede é composta por sinais hidráulicos, químicos (ondas de Ca^{2+} , EROs e ABA) e elétricos que diferem não apenas em sua natureza química, mas também em suas velocidades de propagação (Huber e Bauerle, 2016).

Embora a maior parte do conhecimento das respostas adaptativas de plantas às mudanças ambientais vêm de estudos envolvendo sinais químicos e hidráulicos (Torres-Ruiz et al., 2015; Li et al., 2017), existem evidências de que estímulos ambientais como mudanças na intensidade de luz (Szechyńska-Hebda et al., 2017) e na disponibilidade hídrica do solo (Vuralhan-Eckert et al., 2018) e a interação de sinais oriundos de fontes hidráulicas e químicas podem modificar o potencial elétrico da membrana e induzir a geração e propagação de sinais elétricos (Fromm e Lautner, 2007; Gallé et al., 2015; Vodenev et al., 2015; Szychynska-Hebda et al., 2017). Isso ocorre uma vez que as membranas celulares possuem H^+ -ATPases e canais iônicos dependentes de voltagem que, em conjunto, são responsáveis pelo estabelecimento do potencial elétrico da membrana celular (Falhof et al., 2016). Quando as plantas são sujeitas a mudanças no ambiente, alterações potenciais da membrana podem ser evocadas rapidamente (Wang et al., 2019) e propagadas pelas membranas de células adjacentes excitáveis (Volkov e Ranatunga, 2006) da raiz para as folhas e vice-versa, permitindo que as plantas coordenem, a distâncias significativas, diferentes atividades fisiológicas (Lautner et al., 2005), bioquímicas (Oyarce e Gurovich, 2010) e moleculares (Mousavi et al., 2013).

Até o momento, três tipos de sinais elétricos são reconhecidos em plantas: os potenciais de ação (PA), potenciais de variação (PV) e os potenciais sistêmicos (PS) (From e Lautner, 2012; Zimmermann e Mithöfer, 2013; Gallé et al., 2015). O PA se destaca como sinal elétrico que se propaga a longas distâncias e está relacionado com a ativação transitória de canais iônicos (Ca^{2+} , Cl^- e K^+) (Felle e Zimmermann, 2007) e com a inativação da H^+ -ATPase (Vodenev et al., 2006; Sukhov e Vodenev 2009). É uma reação elétrica de curto prazo, que inclui a despolarização rápida (diminuição de uma diferença de potencial elétrico) e

repolarização (recuperação da diferença de potencial) da membrana plasmática (Beilby, 2007). O caráter “tudo ou nada” desse potencial ocorre em virtude das mudanças instantâneas e momentâneas no potencial elétrico da membrana celular, que desencadeia sinais com amplitude e velocidades constantes (Trebacz et al., 2006). Estímulos que não danificam o tecido induzem a autopropagação de PA como, por exemplo, correntes elétricas (Macedo et al., 2015), arrefecimento (Król et al., 2006), toque (Degli Agosti, 2014), alterações na intensidade luminosa (Pikulencko e Bulychyev) e déficit hídrico (Vuralhan-Eckert et al., 2018). Além dos PAs induzidos por estímulos, também podem ocorrer potenciais de ação espontâneos (SAPs), os quais ocorrem na ausência de estímulos externos e desconhecidos (Zawadki et al., 1995). Stolarz e Dziubińska (2017), por exemplo, observaram a propagação de SAPs em *Helianthus annuus* durante transição de claro/escuro, quando ocorria movimento do caule. Propagação de SAPs em resposta ao fotoperíodo também foi observado em microtomateiro deficiente em ABA (Macedo et al., 2015).

Já o PV é propagado através do xilema e pode ser gerado por estímulos bióticos e abióticos que danificam o tecido, como queima (Katicheva et al., 2015; Zhao et al., 2015), corte e herbivoria (Salvador-Recatalá; Farmer, 2014). Este sinal é caracterizado por uma fase inicial de despolarização rápida similar ao mecanismo iônico do PA, no entanto, é seguido de uma fase repolarização lenta em função do desligamento transitório da H^+ -ATPase, podendo durar até 30 minutos (Stahlberg et al., 2006; Huber e Bauerle, 2016). Embora não bem explicada, a propagação de PV está associada com variações na pressão hidráulica do xilema, possivelmente oriundas de sinais hidráulicos (SH) (Stahlberg, 2005). É sugerido que danos aos tecidos de plantas aumentem a pressão hidráulica na zona estimulada, a qual induz uma onda hidráulica e/ou sinal hidráulico a ser propagado por toda a planta (Mancuso, 1999). A passagem desse sinal é geralmente acompanhada por uma forte despolarização da membrana que segue mais lentamente com uma onda hidráulica conduzindo o alongamento da membrana e afetando canais de íons mecano-sensíveis (Davies, 2006; Vodeneev et al., 2015). É importante mencionar aqui que o PV não se autoperpetua porque são sempre precedidos por uma mudança de pressão hidráulica positiva e, portanto, sua despolarização é induzida hidraulicamente (Stahlberg e Cosgrove, 1996, 1997).

Em contraste, o PS é um sinal sistêmico induzido por fatores abióticos e bióticos, autopropagável e transmitido via evento de hiperpolarização, relacionado à ativação da H^+ -ATPase na membrana plasmática (Zimmermann et al., 2009). No entanto, a participação de canais de Ca^{2+} e K^+ na propagação de PS é provável, uma vez que esse sinal foi suprimido em plantas deficientes a esses nutrientes (Lautner et al., 2005). Apesar de ser o menos investigado

em plantas, sinais de hiperpolarização foram observados em *Zea mays* após a aplicação simultânea dos estímulos de queima e reidratação (Vuralhan-Eckert et al., 2018) e em *Arabidopsis* após estímulo de herbivoria (Zimmermann et al., 2009). Zimmermann et al. (2016) também observaram a propagação de PS na zona estimulada após a indução de PV e/ou PA. Isso significa que tanto a despolarização quanto a hiperpolarização na zona estimulada devem induzir alguns processos semelhantes que participam da propagação da SP (Sukhov et al., 2019).

As propagações de sinais elétricos podem induzir várias respostas fisiológicas em plantas (Gallé et al., 2015). Kaiser e Grams (2006) reportaram um declínio transiente no rendimento quântico do FSII e na condutância estomática após a propagação de PV em folhas de *Mimosa pudica* estimuladas com queima. Já a propagação de PA foi relatada por aumentar a taxa de assimilação CO₂ sob condições normais de luminosidade em plantas de milho após estímulo de reidratação (Grams et al., 2007). Os autores observaram que a propagação do PA iniciou cerca de 10 minutos após a estimulação, atingindo o pico máximo em 20-30 min, o que evidencia que o PA pode induzir respostas positivas à fotossíntese e no controle estomático. Adicionalmente, apesar de o ABA ser um sinal de estresse hídrico e essencial na regulação estomática (Kuromori et al., 2018), esse fitohormônio também é necessário no desenvolvimento de alterações fisiológicas induzidas por PA (Herde et al., 1999). Do mesmo modo que aminoácidos como o glutamato e a asparagina tem sido relatado por influenciar na propagação de sinais elétricos como o PA em plantas sob estresse (Toyota et al., 2018; Lapeikaite et al., 2019).

Diante dessa abordagem, evidencia-se que há informações na literatura sobre alterações nos processos eletrofisiológicos ocasionados por sinais elétricos, o que sugere a possibilidade de interação com outras vias de sinalização como a do ABA em resposta a estresses ambientais. A caracterização da sinalização eletrofisiológica e do envolvimento do ABA é obtida a partir de estudos com mutantes específicos nesse fitohormônio, dentre eles, os mutantes *MTnotabilis* (deficiente em ABA) e *MTsp12::NCED* (superexpressando ABA). Assim, esse estudo nos permitirá elucidar se a geração de sinais elétricos está envolvida nas respostas de defesa desses mutantes submetidos a diferentes regimes hídricos. Além de salientar a importância de trabalhos voltados para o comportamento e eletrofisiologia vegetal, tanto em nível de plantas, como em nível de seus constituintes, resgatando a importância dos sinais elétricos para as plantas. Sendo assim, a pergunta que quero responder nesse estudo é se: sinais elétricos atuam na sinalização a longa distância induzindo respostas fisiológicas e metabólicas

em tomateiro mutante em ABA após cessar o déficit hídrico. Para responder essa pergunta, objetivou-se com esse estudo caracterizar sinais elétricos gerados no tomateiro cv. Micro-Tom (*wt*) e nos mutantes *MTnotabilis* e *MTNCED*, bem como investigar a relação entre a sinalização elétrica e química nas trocas gasosas e nos níveis de metabólitos das plantas submetidas aos tratamentos de déficit hídrico e após o estímulo de reidratação.

Referências

- Baluška, F. (2013). Long-distance systemic signaling and communication in plants. Berlin: Springer.
- Beilby, M. J. (2007). Action potential in charophytes. *International review of cytology*, 257, 43-82.
- Davies, E. (2006). Electrical signals in plants: facts and hypotheses. In *Plant electrophysiology* (pp. 407-422). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Degli Agosti, R. (2014). Touch-induced action potentials in *Arabidopsis thaliana*. *Archives des Sciences*, 67, 125-138.
- Falhof, J., Pedersen, J. T., Fuglsang, A. T., & Palmgren, M. (2016). Plasma membrane H⁺-ATPase regulation in the center of plant physiology. *Molecular Plant*, 9(3), 323-337.
- Felle, H. H., & Zimmermann, M. R. (2007). Systemic signalling in barley through action potentials. *Planta*, 226(1), 203.
- Fromm J, Lautner S (2007) Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant Cell Environ* 30: 249–257.
- Fromm, J., and Lautner, S. (2012). “Plant electrophysiology: signaling and responses,” in *Plant Electrophysiology*, ed A. G. Volkov (Berlin; Heidelberg:Springer-Verlag), 1–377.
- Gallé, A., Lautner, S., Flexas, J., & Fromm, J. (2015). Environmental stimuli and physiological responses: the current view on electrical signalling. *Environmental and Experimental Botany*, 114, 15-21.
- Gallé, A., Lautner, S., Flexas, J., & Fromm, J. (2015). Environmental stimuli and physiological responses: the current view on electrical signalling. *Environmental and Experimental Botany*, 114, 15-21.
- Grams, T. E., Koziol, C., Lautner, S., Matyssek, R., & Fromm, J. (2007). Distinct roles of electric and hydraulic signals on the reaction of leaf gas exchange upon re-irrigation in *Zea mays* L. *Plant, Cell & Environment*, 30(1), 79-84.

- Herde O, Pena Cortes H, Wasternack C, Willmitzer L, Fisahn J (1999) Electric signaling and *pin2* gene expression on different abiotic stimuli depend on a distinct threshold level of endogenous abscisic acid in several abscisic acid-deficient tomato mutants. *Plant Physiol* 119: 213–218
- Huber AE, Bauerle TL (2016) Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge. *J Exp Bot* 67: 2063–2079.
- Kaiser H. & Grams T.E.E. (2006) Rapid hydro-passive opening and subsequent active stomatal closure follow heat-induced electrical signals in *Mimosa pudica*. *Journal of Experimental Botany* 57, 2087– 2092.
- Katicheva, L., Sukhov, V., Bushueva, A., & Vodeneev, V. (2015). Evaluation of the open time of calcium channels at variation potential generation in wheat leaf cells. *Plant signaling & behavior*, 10(3), e993231.
- Krol, E., Dziubinska, H., Stolarz, M., and Trebacz, K. (2006). Effects of ion channel inhibitors on cold- and electrically-induced action potentials in *Dionaea muscipula*. *Biol. Plantarum*. 50, 411–416.
- Kuromori, T., Seo, M., & Shinozaki, K. (2018). ABA transport and plant water stress responses. *Trends in plant science*, 23(6), 513-522.
- Lapeikaite, I., Dragunaite, U., Pupkis, V., Ruksenas, O., & Kisnieriene, V. (2019). Asparagine alters action potential parameters in single plant cell. *Protoplasma*, 256(2), 511-519.
- Lautner, S., Grams, T. E. E., Matyssek, R., & Fromm, J. (2005). Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis. *Plant Physiology*, 138(4), 2200-2209.
- Li, W., Jia, L., & Wang, L. (2017). Chemical signals and their regulations on the plant growth and water use efficiency of cotton seedlings under partial root-zone drying and different nitrogen applications. *Saudi journal of biological sciences*, 24(3), 477-487.
- Macedo FCO, Dziubinska H, Trebacz K, Oliveira RF, Moral RA (2015) Action potentials in abscisic acid-deficient tomato mutant generated spontaneously and evoked by electrical stimulation. *Acta Physiol Plant* 37:207.
- Mancuso, S. (1999). Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in *Vitis vinifera*. *Functional Plant Biology*, 26(1), 55-61.
- Mousavi SA, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE (2013) GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signaling. *Nature* 500: 422–426.
- Oyarce, P., & Gurovich, L. (2010). Electrical signals in avocado trees: Responses to light and water availability conditions. *Plant signaling & behavior*, 5(1), 34-41.

- Ruan, Y. L. (2012). Signaling role of sucrose metabolism in development. *Molecular Plant*, 5(4), 763-765.
- Salvador-Recatalà, V., Tjallingii, W. F., & Farmer, E. E. (2014). Real-time, in vivo intracellular recordings of caterpillar-induced depolarization waves in sieve elements using aphid electrodes. *New Phytologist*, 203(2), 674-684.
- Stahlberg R, Cleland ERE, Van Volkenburgh E. Decrement and amplification of slow wave potentials during their propagation in *Helianthus annuus* L. shoots. *Planta* 2005; 220:550–8.
- Stahlberg R, Robert E, Cleland, Van Volkenburgh Elizabeth. Slow wave potentials – a propagating electrical signal unique to higher plants. In: Baluska F, Mancuso S, Volkmann D, editors. *Communication in plants. Neuronal aspects of plant life*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2006. p. 291–309.
- Stahlberg, R., & Cosgrove, D. J. (1997). The propagation of slow wave potentials in pea epicotyls. *Plant physiology*, 113(1), 209-217.
- Sukhov, V., & Vodeneev, V. (2009). A mathematical model of action potential in cells of vascular plants. *Journal of Membrane Biology*, 232(1-3), 59.
- Sukhov, V., Sukhova, E., Vodeneev, V., 2019. Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 146, 63–84.
- Szechyńska-Hebda, M., Lewandowska, M., & Karpiński, S. (2017). Electrical signaling, photosynthesis and systemic acquired acclimation. *Frontiers in physiology*, 8, 684.
- Torres-Ruiz, J. M., Diaz-Espejo, A., Perez-Martin, A., & Hernandez-Santana, V. (2015). Role of hydraulic and chemical signals in leaves, stems and roots in the stomatal behaviour of olive trees under water stress and recovery conditions. *Tree Physiology*, 35(4), 415-424.
- Toyota, M., Spencer, D., Sawai-Toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., Koo, A. J., ... & Gilroy, S. (2018). Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science*, 361(6407), 1112-1115.
- Trebacz K, Dziubinska H, Krol E (2006) Electrical signals in long-distance communication in plants. In: Baluška F, Mancuso S, Volkmann D (eds) *Communication in plants. Neuronal aspects of plant life*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 277–290
- Vodeneev V, Akinchits E, Sukhov V (2015) Variation potential in higher plants: mechanisms of generation and propagation. *Plant Signal Behav* 10: e1057365.

- Vodeneev VA, Opritov VA, Pyatygin SS (2006) Reversible changes of extracellular pH during action potential generation in a higher plant *Cucurbita pepo*. *Russ J Plant Physiol* 53: 481–487.
- Volkov, A. and Ranatunga, D.R. (2006) Plants as Environmental Biosensors. *Plant Signaling & Behavior*, 1, 105-115.
- Vuralhan-Eckert, J., Lautner, S., & Fromm, J. (2018). Effect of simultaneously induced environmental stimuli on electrical signalling and gas exchange in maize plants. *Journal of plant physiology*, 223, 32-36.
- Wang, Z. Y., Qin, X. H., Li, J. H., Fan, L. F., Zhou, Q., Wang, Y. Q., ... & Huang, L. (2019). Highly reproducible periodic electrical potential changes associated with salt tolerance in wheat plants. *Environmental and experimental botany*, 160, 120-130.
- XU, W.; CUI, K.; XU, A.; NIE, L.; HUANG, J.; PENG, S. Drought stress condition increases root to shoot ratio via alteration of carbohydrate partitioning and enzymatic activity in rice seedlings. *Acta Physiology Plantarum*, v. 37, p. 1-11, 2015.
- Zawadzki, T., Dziubińska, H., & Davies, E. (1995). Characteristics of action potentials generated spontaneously in *Helianthus annuus*. *Physiologia Plantarum*, 93(2), 291-297.
- Zhao, D. J., Wang, Z. Y., Huang, L., Jia, Y. P., & Leng, J. Q. (2014). Spatio-temporal mapping of variation potentials in leaves of *Helianthus annuus* L. seedlings in situ using multi-electrode array. *Scientific reports*, 4(1), 1-7.
- Zimmermann, M. R., Hafke, J. B., Van Bel, A. J., & Furch, A. C. (2013). Interaction of xylem and phloem during exudation and wound occlusion in *Cucurbita maxima*. *Plant, cell & environment*, 36(1), 237-247.
- Zimmermann, M. R., Maischak, H., Mithöfer, A., Boland, W., & Felle, H. H. (2009). System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding. *Plant physiology*, 149(3), 1593-1600.
- Zimmermann, M. R., Mithöfer, A., Will, T., Felle, H. H., & Furch, A. C. (2016). Herbivore-triggered electrophysiological reactions: Candidates for systemic signals in higher plants and the challenge of their identification. *Plant physiology*, 170(4), 2407-2419.

2. CARACTERIZAÇÃO DE MULTIVARIÁVEIS DE SINAIS ELÉTRICOS GERADOS ESPONTANEAMENTE E EVOCADOS POR ESTÍMULO ELÉTRICO EM MICROTOMATEIROS MUTANTES EM ÁCIDO ABCSÍCIO

RESUMO

O monitoramento em in vivo da atividade elétrica entre os tecidos e órgãos de plantas pode ser utilizado para estudar mecanismos de transporte de informações e respostas fisiológicas provenientes de estímulos externos. Estes sinais são caracterizados principalmente em potencial de ação (PA) e de variação (PV), relacionados a sinalização de longa e curta distância, respectivamente. Potências de ação espontâneos (SAPs) também podem ocorrer na ausência de estímulos conhecidos a uma frequência ajustada às condições ambientais. Por outro lado, potências de variações espontâneos (SVPs) ainda são desconhecidos. Neste trabalho, a geração espontânea e evocação de sinais elétricos via estímulo elétrico foram monitoradas durante 72 horas usando eletrodos Ag/AgCl, inseridos no caule e pecíolos de tomateiros cv. Micro – Tom, sendo: *notabilis* (*MTnot*), e *MTsp12::NCED* (*MTNCED*) e tipo selvagem (*MTwt*). O *MTnot* gerou mais SAPs comparado ao *MTwt* e *MTNCED*, os quais se propagaram pelo caule e pecíolos, com uma velocidade de transmissão de 0, 50 cm min⁻¹. A propagação de PVSs ocorreu principalmente no início da manhã, com maior frequência no *MTwt*. *MTNCED* registrou menor quantidade de SVPs o que foi associado ao nível de despolarização da membrana. O estímulo elétrico por sua vez promoveu a geração de potenciais de ação em todos os genótipos estudados. Os mutantes *MTnot* e *MTNCED* foram menos sensíveis ao estímulo elétrico, sendo necessário um maior estímulo para atingir o limiar de excitação.

Palavras-chave: Sinais espontâneos; Potencial de ação; Potencial de variação; Medições extracelulares; *notabilis*; *NCED*

ABSTRACT

In vivo monitoring of electrical activity between plant tissues and organs can be used to study information transport mechanisms and physiological responses to external stimuli. These signals are mainly characterized as action potential (AP) and variation potential (VP), related to long- and short-distance signaling, respectively. Spontaneous action potentials (SAPs) may also occur in the absence of known stimuli at frequencies adjusted to environmental conditions. By contrast, the mechanism of spontaneous variation potentials (SVPs) remain unknown. In this work, spontaneous generation and evocation of electrical signals via electrical stimulation were monitored for 72 h using Ag/AgCl electrodes inserted into the stem and petioles of two mutant tomatoes, cv. Micro-Tom *notabilis* (*MTnot*) and *MTsp12::NCED* (*MTNCED*), and wild type (*MTwt*). *MTnot* generated more SAPs than did *MTwt* and *MTNCED*, propagated through the stem and petioles, with a transmission speed of 0.50 cm min⁻¹. SVPs propagation occurred mainly in the early morning, most often in *MTwt*. *MTNCED* gave a lower number of SVPs that were associated with membrane depolarization level. The electrical stimuli promoted the generation of APs in all studied genotypes. Mutants *MTnot* and *MTNCED* were less sensitive to electrical stimulation, requiring greater stimuli to reach the excitation threshold.

Keywords: Spontaneous signals; Action potential; Variation potential; Extracellular measurement; *notabilis*; *NCED*

2.1. Introdução

As plantas percebem e transmitem informações do ambiente mediante sinais rápidos e lentos, derivados de fontes hidráulica, químicas e elétricas. Os sinais elétricos têm sido descritos por promover sinalização rápida e a longas distâncias, interagindo com sinais hidráulicos e químicos preparando a planta para responder de forma mais seletiva aos estímulos ambientais (Gilroy et al., 2016). A membrana celular é a principal fonte de geração de sinais elétricos devido as suas propriedades bioelétricas. As membranas possuem canais iônicos (Fromm e Lautner 2007; Felle e Zimmermann 2007) que induzem mudanças transitórias no potencial elétrico da membrana (Vodeneev et al., 2015) por meio de mecanismos ativos e passivos (Hills et al. 2012). Dentre os sinais elétricos reconhecidos em plantas, os potenciais de ação (PA), potenciais de ação espontâneos (SAPs) (Trebacz et al., 2006; Fromm e Lautner, 2007) e potenciais de variação (PV) (Stahlberg et al., 2006; Vodeneev et al., 2015) são propagados a taxas muito rápidas (mm s^{-1} a vários cm s^{-1}) e são capazes de integrar outras vias de sinalização (Sukhov, 2016; Sukhova et al., 2017).

Potenciais de ação, por exemplo, podem induzir a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs). Sabe-se que as EROs são reguladoras de canais iônicos, portanto, torna-se bastante provável um *crosstalk* com sinais elétricos (Shabala et al., 2016). O sinal hidráulico, por sua vez, é a base de geração de PV e quando associado às EROs, são responsáveis pela diminuição na assimilação de CO_2 e pelo fechamento estomático dependente de ABA (Pavlovic et al., 2011; Gallé et al., 2013; Sukhov et al., 2016). O ABA é essencial no crescimento de plantas (Baueret et al., 2013), contudo, sua atuação na adaptação de plantas via controle estomático em condições de déficit hídrico, é considerada a mais importante (Duarte et al., 2019). Herde et al., (1999) reportaram que a síntese de ABA é necessária para o desenvolvimento de alterações fisiológicas induzidas por PA. Assim como o ABA é induzido por PAs e PVs a partir de estímulos ao toque (Hlavácková et al., 2006; Krausko et al., 2017) e correntes elétricas (Herde et al., 1999) e, também pode regular a atividade de canais de K^+ (Cuin et al., 2018) e Ca^{+2} (Meimoun et al., 2009) modulando a propagação de PAs.

É evidente que sinais elétricos interagem com outras vias de sinalização. No entanto, ainda não está claro se a sinalização elétrica funciona em modo de iniciação para os sinais hidráulicos e químicos, ou se eles atuam simultaneamente, com a mesma importância (Shabala et al., 2016). Os mutantes são ferramentas importantes para caracterização de respostas elétricas (Gil et al., 2009; Macedo et al., 2015; Kupisz et al., 2017) e para entender as vias de sinalização e suas funções nas plantas. Os mutantes *MTnot* e *MTNCED* com sub e superexpressão de ABA,

obtidos mediante a introgressão de mutações na cultivar de micro-tomateiro “Micro-Tom” (*wt*) podem fornecer novas informações sobre o efeito de sinais químicos na evocação e propagação de sinais elétricos, bem como o nível de excitabilidade destas plantas mediante eletroestimulação.

O *MTnot* apresenta uma mutação no gene da enzima *NCED* (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase) que cliva um carotenoide na via de síntese de ABA, gerando apenas 42% do nível total de ABA em relação ao tipo selvagem (Burbidge et al., 1999). Esse mutante tem uma alta taxa transpiratória e baixa condutividade hidráulica da raiz, o que explica seu baixo potencial de turgor. Essas características resultam em menor crescimento e expansão foliar, bem como características de desidratação em relação ao tipo selvagem. Por outro lado, o transgênico *MTNCED* superexpressa a enzima *NCED*, caracterizado por apresentar altos níveis de ABA em relação à planta selvagem. O *MTNCED* apresenta características fisiológicas contrárias as observadas no *MTnot* (Thompson et al., 2000). O fenótipo, associado ao ciclo de vida curto dessas plantas, tornam o *MTwt* e os mutantes *MTnot* e *MTNCED* plantas-modelos importantes para estudos eletrofisiológicos. Dessa forma, o presente estudo objetivou caracterizar os sinais elétricos gerados espontaneamente e evocados por estimulação elétrica no tomateiro cv. Micro-Tom (*wt*) e nos mutantes *MTnot* e *MTNCED*.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de microtomateiros cultivar Micro-Tom (MT) (*MTwt*) e os mutantes isogênicos *MTnotabilis* (*MTnot*) e *MTsp12::NCED* (*MTNCED*) foram obtidos a partir da coleção de Micro-Tom do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento de Plantas da Universidade de São Paulo, Brasil. As sementes foram semeadas em vasos (350 dm⁻³) contendo substrato Basaplant® (Agro Base, Artur Nogueira, SP, Brasil) (1:1) e suplementado com vermiculita expandida com 1 g L⁻¹ 10:10:10 NPK e 4 g L⁻¹ calcário dolomítico (MgCO₃ + CaCO₃). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação do Laboratório de Controle Hormonal, sob condições controladas de irradiância (250 a 350 μmol fótons m⁻² s⁻¹), temperatura (~28 °C), umidade relativa (40 a 60%), fotoperíodo 12h/12 h (dia/noite). As plantas foram mantidas sob capacidade de campo, com 4 regas automáticas diárias. As plantas de *MTnot* foram cultivadas no mesmo ambiente, porém cobertas com campanas, obtendo umidade relativa de 70 a 90%.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados composto por três genótipo sendo, o (MT*wt*) e os mutantes MT*not* e MT*NCED*, com 10 repetições.

2.2.2. Registro da atividade elétrica

Plantas com 55 dias de idade foram aclimatadas por 72 horas em gaiola de Faraday, com isolamento eletromagnético, no Laboratório de Estudo de Plantas Sob Estresse – LEPSE. As plantas foram mantidas em condições de temperatura e umidade similares à casa de vegetação, com radiação fotossinteticamente ativa (PAR, $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a partir de fonte de luz fluorescente no nível da planta e fotoperíodo de 12/12 h (dia/noite). Após o período de aclimação, foram inseridos quatro eletrodos de medição, com o El1 inserido no pecíolo da folha e os El2, El3 e El4 no caule das plantas (Figura 1). Os eletrodos tem em sua extremidade Ag/AgCl (fio de prata de 0,25 ou 0,5 mm de diâmetro). Cada eletrodo foi conectado a um sistema de aquisição de dados (LAB-TRAX-4/24T, WPI LLC, Sarasota, FL, EUA) com quatro canais e amplificador, conectados a um computador e controlados pelo software LabScribe (iWorx, Dover, NH. EUA). Um eletrodo de referência foi mantido no solo. Durante as avaliações, as campanas foram removidas das plantas MT*not*. As medições elétricas foram iniciadas três horas após a inserção dos eletrodos nas plantas, tempo necessário para que a tensão possa ser estabilizada em todos os eletrodos. A resistência de entrada de cada sinal foi de 100 M Ω .

Foram medidas as características dos sinais de amplitude (mV), duração do pico ($t_{1/2}$, s) e velocidade para potenciais de ação (PA) e SAPs e a amplitude para potenciais de variação espontânea (SVPs). A velocidade foi calculada considerando a distância entre os eletrodos (cm) e o tempo necessário (min) para o PA atravessar o segmento caule ou foliar (Macedo et al. 2015). Os SAPs e SVPs foram medidos pelo monitoramento contínuo da atividade elétrica por 72 horas, na ausência de estímulos externos controlados ou intencionais (Zawadzki et al., 2008). Durante esse período, o ambiente foi mantido isolado para eliminar qualquer influência externa. A fim de registrar potenciais de ação (PA) evocados por estimulação elétrica, uma corrente elétrica do tipo contínua foi fornecida extracelularmente através de eletrodos de superfície Ag/AgCl localizados no ápice da haste das plantas (Figura 1). Tensões diferentes foram usadas para determinar o limiar de excitação.

Figura 1. Arranjo dos eletrodos (El) na planta: $\pm$ eletrodos de estimulação elétrica no ápice, El1 inserido no pecíolo, El2, El3 e El 4 inseridos no caule, e o eletrodo de referência, R, inserido no solo.

Figura 1. Arranjo dos eletrodos (El) na planta: $\pm$ eletrodos de estimulação elétrica no ápice, El1 inserido no pecíolo, El2, El3 e El 4 inseridos no caule, e o eletrodo de referência, R, inserido no solo.

2.2.3. Análise estatística

As variáveis discretas (número de sinais) coletadas ao longo do tempo foram analisadas com estrutura de tratamentos fatorial. A interação entre os fatores foi evidenciada por meio de uma análise de Deviance, sendo que os fatores, tratamentos versus intervalos de tempo, foram considerados como fixos. As variáveis discretas foram analisadas com um modelo linear generalizado do tipo quasipoisson enquanto que para as demais foi adotado o modelo Gaussiano (distribuição normal). A qualidade do ajuste do modelo foi confirmada com um envelope simulado meio normal utilizando o pacote hnp (Moral et al. 2017). Os contrastes de médias entre os tratamentos foram conduzidos por meio da função glht do pacote multcomp (Torsten et al. 2008) do programa R.

As variáveis amplitude, duração e velocidade dos sinais elétricos geradas de forma espontânea foram avaliadas por meio da análise de componentes principais (PCA) com a finalidade de identificar a variação e ordenação das respostas observadas em cada genótipo dentro de cada respectivo intervalo de tempo. Os dados foram padronizados pela divisão da

diferença entre cada observação e média aritmética de cada variável de interesse pelo desvio padrão da mesma variável. Os componentes foram selecionados de acordo com os autovalores provenientes da matriz de correlação e de acordo com a presença de componentes com autovalores maiores do que 1 (Kaiser, 1974; Malaquias et al. 2017). Todas as análises foram realizadas no software R (R CORE TEAM, 2019).

2.3. Resultados

2.3.1. Sinais elétricos gerados espontaneamente

Dois tipos de propagação de sinais elétricos espontâneos foram observados através das medições contínuas da atividade elétrica: (1) sinalização de longa distância, que desencadeou a despolarização rápida da membrana [potenciais de ação espontâneos, SAPs e (2) sinalização de curta distância, relacionada à despolarização lenta da membrana potenciais de variação espontâneos, SVPs. Os SAPs foram registrados em todas as plantas de *MTwt* e *MTnot* analisadas. No mutante *MTNCED* apenas 40% das plantas propagaram SPAs (dados não mostrados). O número total de SAPs e a velocidade de propagação do sinal elétrico foi maior em plantas de *MTnot* comparados ao *MTwt* e *MTNCED* (Tabela 1). No entanto, a propagação de SAPs não diferiu estatisticamente entre as horas do dia e noite. Os dados referentes a duração ($t_{1/2}$) não apresentaram normalidade e homogeneidade de variância e foram transformados usando a função “boxcox” do pacote “MASS” do R. Os valores de lâmbda que maximizam a função foram extraídos e substituídos na fórmula: $YT=Y\lambda-1/\lambda$ (Box & Cox, 1964).

Tabela 1. Número total (NSPAs), amplitude (AMP, mV), duração ($t_{1/2}$, s) e velocidade de propagação (V, $\text{cm}^2 \text{min}^{-1}$) dos potenciais de ação espontâneos (SPAs) em microtomateiros Micro-Tom (MT) selvagem (*MTwt*) e mutantes *MTnotabilis* (*MTnot*) e *MTNCED*, durante 72 h de medições contínuas de atividade elétrica.

Genótipos	NSPAs ^[a]	AMP (mV)	$t_{1/2}$ (s)	V ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) ^[b]
<i>MTwt</i>	$0,16 \pm 0,05\text{ab}$	$10,05 \pm 1,47$	$12,92 \pm 2,46$	$0,21 \pm 0,06 \text{ b}$
<i>MTnotabilis</i>	$0,36 \pm 0,09 \text{ a}$	$11,67 \pm 1,63$	$10,93 \pm 1,06$	$0,50 \pm 0,04 \text{ a}$
<i>MTNCED</i>	$0,091 \pm 0,05 \text{ b}$	$10,75 \pm 2,89$	$12,92 \pm 2,46$	$0,36 \pm 0,05 \text{ ab}$
$F_{2,9}$		0,3060		
p		0,7437		
λ			-0,7	

Dados representam médias $\pm$ erro padrão ($n = 10$). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si por contrastes de médias gerados por modelo linear generalizado do tipo quasepoisson^[a], e pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ^[b].

Na figura 2 é apresentado o registro de SAPs após as 6 pm quando a luz foi desligada. É possível observar uma despolarização de longo prazo nos quatro eletrodos e os picos de SAPs.

Figura 2. Propagação de potenciais de ação espontâneos em plantas de *MTwt* (A) e mutantes *MTnot* (B) e *MTNCED* (C) após as 6 pm quando a luz foi desligada.

A maior geração de SPVs foi registrada entre às 4 e 6 am, em todos os genótipos. Plantas do tipo selvagem (*MTwt*) propagaram um maior número de SPVs, em relação às demais plantas (Tab. 2), enquanto que o *MTNCED* apresentou menor propagação de SPVs (Tab. 2) e menor amplitude de despolarização do SPVs (Tab.3). O registro das variações espontâneas

(SPVs) de membrana (EL1), no período de 4 e 6 am, para as plantas *MTwt*, *MTnot* e *MTNCED* estão apresentados na figura 3.

Tabela 2. Número de potenciais de variação espontâneos (SPVs) em microtomateiros Micro-Tom (MT) selvagem (*MTwt*) e mutantes *MTnotabilis* (*MTnot*) e *MTNCED*, durante 72 h de medições contínuas de atividade elétrica.

	Horário	<i>MTwt</i>	<i>MTnot</i>	<i>MTNCED</i>
Número de SPVs	00 – 02 am	0,20 ($\pm$ 0,13)	0,10 ($\pm$ 0,10)	0,40 ($\pm$ 0,26)
	02 – 04 am	0,60 ($\pm$ 0,33)	0,20 ($\pm$ 0,34)	0,50 ($\pm$ 0,34)
	04 – 06 am	1,70 ($\pm$ 0,15) a	1,50 ($\pm$ 0,16) ab	1,20 ($\pm$ 0,41) b
	06 – 08 am	0,10 ($\pm$ 0,10)	0,10 ($\pm$ 0,10)	0,80 ($\pm$ 0,36)
	08 – 10 am	0,20 ($\pm$ 0,13)	0,10 ($\pm$ 0,10)	0,20 ($\pm$ 0,20)
	10 – 12 am	0,40 ($\pm$ 0,26)	0,20 ($\pm$ 0,20)	0,20 ($\pm$ 0,20)
	12 – 14 pm	0,20 ($\pm$ 0,13)	0,00 ($\pm$ 0,00)	0,50 ($\pm$ 0,22)
	14 – 16 pm	0,40 ($\pm$ 0,30)	0,40 ($\pm$ 0,21)	0,30 ($\pm$ 0,21)
	16 – 18 pm	0,40 ($\pm$ 0,16)	0,30 ($\pm$ 0,10)	0,30 ($\pm$ 0,15)
	18 – 20 pm	0,40 ($\pm$ 0,22)	0,10 ($\pm$ 0,10)	0,70 ($\pm$ 0,30)
	20 – 22 pm	0,60 ($\pm$ 0,22)	0,10 ($\pm$ 0,10)	1,00 ($\pm$ 0,44)
	22 – 00 pm	0,10 ($\pm$ 0,10)	0,00 ($\pm$ 0,00)	0,40 ($\pm$ 0,30)

Dados representam médias $\pm$ erro padrão (n = 10). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si por contrastes de médias gerados por modelo linear generalizado do tipo quasepoisson.

Tabela 3. Amplitude dos potenciais de variação espontâneos (SPVs, mV) em microtomateiros Micro-Tom (MT) selvagem (*MTwt*) e mutantes *MTnotabilis* (*MTnot*) e *MTNCED* durante 72 h de medições contínuas de atividade elétrica

Genótipos	SPVs (mV)
<i>MTwt</i>	18,58 ($\pm$ 1,86) a
<i>MTnot</i>	17,34 ($\pm$ 2,56) a
<i>MTNCED</i>	12,39 ($\pm$ 1,07) b

Dados representam médias $\pm$ erro padrão (n = 10). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si por contrastes de médias gerados por modelo linear generalizado do tipo quasepoisson (p < 0,05).

Figura 3. Propagação de potenciais de variação espontâneos (SPVs) registrados no período de 4 e 6 am em microtomateiros Micro-Tom (MT) selvagens (*MTwt*) (A) e mutantes *MTnotabilis* (*MTnot*) (B) e *MTNCED* (C).

2.3.2. Comportamento periódico de potenciais de ação e de variação espontâneos

Analisando a variação total dos dados foi possível verificar que os dois primeiros componentes principais explicam juntos mais de 97% da variação observada, sendo 62,39% pelo PC1 e 32,49% pelo PC2 e 2,65% pelo PC3 (Figura 4). Os escores observados para os três primeiros componentes principais são: 0,4970 npa [número de PA] + 0,5120 apa [amplitude do PA] + 0,4980 dpa [duração do PA] + 0,4888 vpa [velocidade de PA] – 0,0527 npv [número de PV] e -0,03008 apv [amplitude de pv] (1° componente); 0,00423 npa + 0,0509 apa + 0,0544 dpa + 0,0073 vpa + 0,7040 npv e 0,07061 apv (2° componente); e -0,0122 npa -0,1505 apa - 0,5991 dpa + 0,7829 vpa – 0,0201 npv + 0,0691 apv (3° componente). Observa-se que as variáveis relacionadas ao sinal SAP tiveram maior participação no PC1, sinal SVP no PC2 e a

amplitude e duração dos SAPs no PC3 (Figure 4). As plantas de *MTwt* e *MTnotabilis* expressaram os maiores valores de amplitude, duração, velocidade e números de SPAs, durante o intervalo de 18 a 20 horas (Figure 4), onde as variáveis amplitude e duração de SAPs apresentam maiores valores em comparação a velocidade de propagação do sinal.

Figura 4. Análise de componentes das principais variáveis elétricas geradas de forma espontânea: número total de SPAs (SPA, no.), amplitude (SAPs, mV), duração (t1/2, s) e velocidade de propagação dos potenciais de ação (V, cm² min⁻¹), número total (no.) e amplitude de SVP em microtomateiros tipo selvagem *MTwt* e os mutantes *MTnot* e *MTNCED*, durante 72 h de medições contínuas de atividade elétrica. As áreas de contorno do biplot foram definidas de acordo com os escores observados para o componente principal 3 – conforme proposto e utilizado por Malaquias et al. (2017).

A análise de componentes principais revela que as maiores médias das variáveis amplitude de SVP e o número deste sinal foram encontradas em todos os genótipos no intervalo de 4 a 6 horas da manhã, além de apresentar alta correlação entre si (cosseno de $\theta = 0,9517$). Avaliando os SAPs, foi possível observar alta correlação entre número e amplitude ($\theta: 0.9270$), número e duração ($\theta: 0.9038$), número e velocidade ($\theta: 0.8843$), amplitude e duração ($\theta: 0.9829$), amplitude e velocidade ($\theta: 0.9271$) e velocidade e duração ($\theta: 0.8450$).

2.3.3. O estímulo elétrico induz a propagação de potenciais de ação

Plantas de *MTwt*, *MTnot* e *MTNCED* submetidas a um estímulo de tensão elétrica de 8V/4s, 13V/4s e 16V/4s respectivamente, tiveram como resposta a propagação de PAs ao longo do caule e pecíolo, e ainda com amplitudes variáveis (Figura 5). No entanto, a variação na

tensão elétrica aplicada indica que o limiar de excitação dos mutantes *MTnot* e *MTNCED* foi maior que no *MTwt*. Nas plantas de *MTwt* a rota de transmissão do PA após o estímulo elétrico iniciou no EL2, seguindo basipetalmente pelo EL3 e EL4 localizados no caule (Fig. 4A). Nos mutantes *MTnot* e *MTNCED* o PA também seguiu basipetalmente, mas iniciando no EL1 e então propagado pelo caule (Fig. 4B-C).

Figura 5. Propagação de potenciais de ação (PAs) registrados em microtomateiros Micro-Tom (MT) selvagens (*MTwt*) (A) e mutantes *MTnotabilis* (*MTnot*) (B) e *MTNCED* (C) após estimulação elétrica no ápice da haste.

A porcentagem de excitabilidade foi maior no mutante *MTnot* do que no *MTwt* e *MTNCED* (Tab. 4). No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos no número de PAs propagados, na amplitude do sinal, na duração do pico ($t_{1/2}$, s) e na velocidade de transmissão do sinal. Os dados referentes a velocidade não apresentaram normalidade e homogeneidade de variância e foram transformados usando a função “boxcox”

do pacote “MASS” do R. Os valores de λ que maximizam a função foram extraídos e substituídos na fórmula: $YT=Y\lambda-1/\lambda$ (Box & Cox, 1964) (Tab. 4).

Tabela 4. Tabela 4. Número de plantas que geraram potenciais de ação (PAs) (NPPAs), excitabilidade (E, %), número de PAs (NPAs), amplitude (AMP, mV), duração ($t_{1/2}$, s) e velocidade (V, $\text{cm}^2 \text{min}^{-1}$) de propagação dos potenciais de ação registrados após a estimulação elétrica em *MTwt* e mutantes *MTnot* e *MTNCED*.

Genótipos	NPPA	E (%)	NPAs	AMP (mV)	$t_{1/2}$ (s)	V (cm s^{-1})
<i>MTwt</i>	4	40	$1,5 \pm (0,28)$	$7,68 (\pm 1,43)$	$14,14 (\pm 1,08)$	$0,32 (\pm 0,037)$
<i>MTnotabilis</i>	7	70	$1,6 \pm (0,40)$	$14,40 (\pm 2,53)$	$10,95 (\pm 1,42)$	$0,44 (\pm 0,070)$
<i>MTNCED</i>	5	50	$1,2 \pm (0,20)$	$13,28 (\pm 1,90)$	$14,34 (\pm 2,60)$	$0,28 (\pm 0,010)$
$F_{2,7}$			0,5090	1,8735	1,3258	4,2612
p			0,6217	0,7437	0,3249	0,0705
λ						-1,4

2.4. Discussão

Nós demonstramos que as plantas de tomate Micro-Tom tipo selvagem (*MTwt*) e os mutantes em ABA: *MTnotabilis* (*MTnot*) e *MTNCED* propagam potenciais de ação (SAPs) e potenciais de variação (SVPs) espontâneos na ausência de um estímulo externo conhecido. No entanto, quando uma tensão elétrica é aplicada apenas potenciais de ação (PA) foram propagados em plantas de Micro-Tom. Geralmente, a evocação de SAPs está associada a mudanças na intensidade luminosa e transições claro-escuro (Król et al., 2010; Macedo et al., 2015; Kupisz et al., 2017), no entanto, a frequência de propagação pode ser ajustada diante a condição ambiental exposta. Respostas similares para SAPs foram observadas em *Solanum lycopersicum* (Macedo et al., 2015) e *Helianthus annuus* (Stolarz e Dziubinska, 2017). Em plantas de *MTwt* e *MTnot*, a despolarização persistente no potencial elétrico após as 18 horas contribuiu para exceder o limiar de excitabilidade requerido para desencadear os SAPs (Figura 2 e 4). Essa resposta pode estar associada com o efeito do desligamento da luz na desfosforilação gradual da H^+ -ATPase, como observado em *Marchantia polymorpha* (Okumura et al., 2012; Kupisz et al., 2017). A regulação da H^+ -ATPase é importante tanto redução da hidrólise de ATP no escuro quanto na manutenção da força próton motriz (fpm), regulando o transporte de íons importante para manter a integridade de complexos proteicos fotossintéticos (Kozuma et al., 2017). Já o significado fisiológico dos SAPs no escuro ainda não está claro, mas evidências apontam para um controle na ativação da respiração mitocondrial e na produção de ATP (Kupisz et al., 2017).

A maior propagação de SAPs em plantas de *MTnot* demonstra que, além da luz, a quantidade de ABA influencia na geração de sinais elétricos. Macedo et al. (2015) observaram a propagação de SAPs em plantas de micro-tomateiro tipo selvagem e no mutante *sitiens*, que possui cerca de 8% do nível total de ABA, principalmente no início da manhã, em resposta ao fotoperíodo. Mutantes ABA-deficientes são altamente sensíveis a mudanças ambientais (Thompson et al., 2004). Assim, observa-se que as plantas de *MTnot* estavam em condições naturalmente desfavoráveis, possivelmente contribuindo para o aumento da transmissão de SAPs. Além disso, o ABA pode regular a atividade de canais de K^+ como o AKT2 (Cherel et al., 2002) e GORK (Becker et al., 2003) modulando a excitabilidade da membrana e a geração de PAs (Cuin et al., 2018) e, no tomate, a presença de uma quantidade mínima de ABA é essencial para a geração de PAs (Herde et al., 1999). Herde et al. (1999) observaram a propagação de PAs em *Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker tipo selvagem e nos mutantes ABA-deficientes *notabilis* e *flacca* após estímulo de ferimento, queima e corrente elétrica, e relacionaram a geração de sinais com o maior acúmulo de ABA nessas condições de estresse.

Os PAs em geral se propagam pelo floema com amplitude e velocidade constantes, variando de 0,1 a 10,0 cm s^{-1} de acordo com a espécie vegetal (Sukhov et al., 2016; Huber e Bauerle, 2016), com base no princípio do “*tudo ou nada*” (Treback et al., 2006; Sukhov, 2016). A rápida velocidade de propagação dos SAPs (0,50 cm s^{-1}) em *MTnot* (tab. 1), pode estar associada a atividade de canais iônicos na membrana celular e ao fluxo de íons através da membrana. Resultados similares foram observados em *Helianthus annuus*, sob diferentes condições de luz (Stolarz e Dziubinska, 2017). Após desencadeado o sinal elétrico, informações sobre as condições ambientais podem ser transmitidas a longas distâncias (Bauerle, 2016; Sukhov et al., 2018) e ainda, interconectar com outras vias de sinalização, como ondas de Ca^{2+} , EROs, sinais hidráulicos e hormonais, mediando respostas metabólicas para o equilíbrio do sistema (Yan et al., 2009). É importante notar que a amplitude e duração dos SAPs no *MTwt* e *MTnot* no período das 18 às 20 horas foi maior que a velocidade de propagação do sinal. De fato, quanto maior a amplitude de despolarização e o tempo para a repolarização do potencial elétrico, mais lenta será a velocidade de propagação do sinal pelo sistema vascular. A despolarização da membrana ocorre devido a abertura de canais de Ca^{2+} e o aumento na concentração citosólica desse íon que promove a inativação da H^+ -ATPase e abertura de canais de efluxo de Cl^- (Vodeneev et al., 2006; Sukhov e Vodeneev, 2009). A repolarização, por outro

lado, é promovida pelo efluxo de K^+ e reativação da H^+ -ATPase (Sukhov e Vodeneev, 2009) que impulsiona o potencial de membrana retornar ao potencial de repouso.

Além dos SAPs gerados espontaneamente, a aplicação de uma tensão elétrica induziu a evocação e propagação de APs nas plantas de *MTwt* e os mutantes *MTnotabilis* e *MTNCED*. No entanto, os mutantes *MTnot* e *MTNCED* foram menos sensíveis ao estímulo elétrico, requerendo um estímulo de maior intensidade para que o limiar de excitação fosse atingido, de 13V/4s e 16V/4s, respectivamente. O limiar de excitação e a excitabilidade podem variar entre espécies pois depende da atividade dos canais iônicos, de seus estados de fosforilação/desfosforilação e das condições metabólicas dos tecidos, células e órgãos (Krol et al., 2010). O mecanismo de geração de PA depende da atividade dos canais iônicos e sua propagação pode influenciar no crescimento das plantas (Takamura, 2006), nas trocas gasosas (Fromm e Lautner, 2007) e na expressão gênica (Davies et al., 1997). Herde et al., (1995,1996) reportaram que a aplicação de uma corrente elétrica de 10V/30s induziu a propagação de PAs seguido da expressão do gene *pin2* e um aumento nos níveis de ABA em tomate. A rota propagação do PA nas plantas de micro-tom seguiu principalmente pelo caule e sua variação na amplitude de propagação indica que a excitação possivelmente foi transmitida ao longo de vasos de floema individuais, mas não ao longo do sistema de transmissão do floema (Stolarz e Dziubinska, 2017).

Através do monitoramento in vivo por 72 horas contínuas observamos que a transmissão de potenciais de variação espontâneos (SVPs) (Figura 2) nos genótipos estudados no início da manhã pode ter ocorrido devido mudanças na tensão hidráulica dos tecidos. As alterações na pressão hidrostática dos tecidos são mediadas por uma comunicação hidroeletrólítica (Wagner et al., 2006) que influencia diretamente na ativação de canais de íons mecanossensíveis e na despolarização da membrana (Mousavi et al., 2013), importantes na geração de PV (Zawadzki, 2001; Vodeneev; Sukhov, 2015). As plantas são capazes de antecipar mudanças metabólicas e hidráulicas devido a codificação de informações temporais provenientes de um relógio circadiano interno, o que possibilita a interação eficiente do organismo com o ambiente (Gagliano et al., 2016). Já as causas da geração de SVPs são desconhecidas. Sugere-se que um estudo detalhado acoplando análises de potencial elétrico e de trocas gasosas na antemã pode mostrar pistas sobre seu significado fisiológico. Gallé et al. (2013) observaram que o PV influencia diretamente na fotossíntese através da redução da condutância mesofílica (g_m) em plantas de soja após estímulo por queima.

A menor quantidade de SVPs geradas pelas plantas do mutante *MTNCED* pode estar associada ao nível de despolarização das células-guardas induzindo uma menor resposta

hidroelétrica dos tecidos (Tab 2 e Fig 4). Meimoun et al. (2009) evidenciaram que, em células-guardas em suspensão de *Arabidopsis*, o ABA induz mudanças na concentração de Ca^{2+} citoplasmático inativando a H^{+} -ATPase e consequentemente a despolarização da membrana. Esse efeito é essencial para o fechamento estomático e regulação das trocas gasosas das plantas. Assim, as plantas de *MTNCED*, por superexpressar o ABA, poderiam ter células-guardas mais despolarizadas. Isso influenciaria no grau de abertura dos estômatos, na variação da tensão hidrostática dos tecidos foliares e consequentemente em um menor potencial elétrico celular. A amplitude de despolarização do SVPs no *MTNCED* corrobora com estas informações (tab. 3 e fig. 4), demonstrando uma menor atividade de canais iônicos e consequentemente menor fluxo de íons através da membrana. O mecanismo iônico de formação de PV, no geral, depende do influxo de Ca^{2+} e da inativação de canais iônicos e da H^{+} -ATPase, que é a base de despolarização a longo prazo do PV (Vodeneev et al., 2015; Sukhov, 2016; Sukhova et al., 2017). Assim, é possível que, em plantas *MTNCED*, a concentração de Ca^{2+} intracelulares seja aumentada, o que poderia impactar na despolarização induzida por ABA.

2.5. Conclusão

O monitoramento in vivo por 72 horas contínuas demonstrou que plantas de *MTwt*, e os mutantes *MTNCED* e *MTnot* propagam sinais elétricos espontâneos como os SAPS e SVPs. O mutante *MTnot* gerou maior quantidade de SAPs do que o *MTwt* e *MTNCED*, demonstrando que o ABA influencia na propagação do sinal. O maior número de SVPs, por sua vez, ocorreu no início da manhã, sendo que o *MTNCED* gerou menos SVPs quando comparado ao *MTwt* sugerindo um efeito do ABA na despolarização da membrana. Os PAs foram gerados por estimulação elétrica e demonstraram se propagar basipetalmente ao longo do caule, nos três genótipos avaliados. Os mutantes *MTnot* e *MTNCED* demonstraram ser menos sensíveis aos estímulos elétricos, apresentando um limiar de excitação mais elevado que o *MTwt*.

Referências

- Bauer H, Ache P, Lautner S, Fromm J, Hartung W, Al-Rasheid KAS, Sonnewald S, Sonnewald U, Kneitz S, Lachmann N (2013). The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis. *Curr Biol* 23: 53–57.
- Becker D, Hoth S, Ache P, Wenkel S, Roelfsema MRG, Meyerhoff O, Hedrich R (2003). Regulation of the ABA-sensitive *Arabidopsis* potassium channel gene GORK in response to water stress. *FEBS letters* 554: 119–126.
- Box GEP, Cox DR (1964) An analysis of transformations. *J Royal Soc* 26: 211–252.
- Burbidge A, Grieve TM, Jackson A, Thompson A, McCarty DR, Taylor IB (1999). Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize Vp14. *Plant J* 17: 427–431.
- Chérel I, Michard E, Platet N, Mouline K, Alcon C, Sentenac H, Thibaud JB (2002). Physical and functional interaction of the *Arabidopsis* K⁺ channel AKT2 and phosphatase *AtPP2CA*. *The Plant Cell* 14: 1133–1146.
- Cuin T, Dreyer I, Michard E (2018). The role of potassium channels in *Arabidopsis thaliana* long distance electrical signalling: AKT2 modulates tissue excitability while GORK shapes action potentials. *Int Jo Mol Sci* 19: 926.
- Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90:537–548.
- Duarte KE, de Souza WR, Santiago TR (2019). Identification and characterization of core abscisic acid (ABA) signaling components and their gene expression profile in response to abiotic stresses in *Setaria viridis*. *Sci Rep* 9:4028.
- Felle HH, Zimmermann MR (2007). Systemic signalling in barley through action potentials. *Planta* 226: 203–214.
- Fromm J, Lautner S (2007). Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant Cell Environ* 30: 249–257.
- Gagliano M, Vyazovskiy VV, Borbély AA, Grimonprez M, Depczynski M (2016). Learning by association in plants. *Sci Rep* 6: 38427.
- Gallé A, Lautner S, Flexas J, Ribas-Carbo M, Hanson D, Roesgen J (2013) Photosynthetic responses of soybean (*Glycine max* L.) to heat-induced electrical signaling are predominantly governed by modifications of mesophyll conductance for CO₂. *Plant Cell Environ* 36: 542–552.

- Gil PM, Gurovich L, Schaffer B, García N, Iturriaga R (2009). Electrical signaling, stomatal conductance, ABA and ethylene content in avocado trees in response to root hypoxia. *Plant Signal Behav* 4: 100–108.
- Gilroy S, Bialasek M, Suzuki N, Górecka M, Devireddy AR, Karpinski S, Mittler R (2016). ROS, calcium, and electric signals: Key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant Physiol* 171: 1606–1613.
- Herde O, Atzorn R, Fisahn J, Wasternack C, Willmitzer L, Peña-Cortés H (1996). Localized wounding by heat initiates the accumulation of proteinase inhibitor II in abscisic acid deficient plants by triggering jasmonic acid biosynthesis. *Plant Physiol* 112: 853–860.
- Herde O, Pena Cortes H, Wasternack C, Willmitzer L, Fisahn J (1999). Electric signaling and *pin2* gene expression on different abiotic stimuli depend on a distinct threshold level of endogenous abscisic acid in several abscisic acid-deficient tomato mutants. *Plant Physiol* 119: 213–218.
- Herde O, Peña-Cortés H, Fisahn J (1995). Proteinase inhibitor II gene expression induced by electrical stimulation and control of photosynthetic activity in tomato plants *Plant Cell Physiol* 36: 737–743.
- Hills A, Chen ZH, Amtmann A, Blatt MR, Lew VL (2012). On Guard, a computational platform for quantitative kinetic modeling of guard cell physiology. *Plant Physiol* 159: 1026–1042.
- Hlavácková V, Krchnák P, Nauš J, Novák O, Špundová M, Strnad M (2006). Electrical and chemical signals involved in short-term systemic photosynthetic responses of tobacco plants to local burning. *Planta* 225:235–244.
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P (2008). Simultaneous inference in general parametric models. *Biom J* 50: 346—363.
- Huber AE, Bauerle TL (2016). Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge. *J Exp Bot* 67: 2063–2079.
- Kaiser H F (1974). An index of factorial simplicity. *Psychometrika* 39: 31–36.
- Kohzuma K, Froehlich JE, Davis GA, Temple JA, Minhas D, Dhingra A, Kramer DM (2017) The role of light–dark regulation of the chloroplast ATP synthase. *Front Plant Sci* 8: 1248.
- Krausko M, Perutka Z, Šebela M, Šamajová O, Šamaj J, Novák O, Pavlovič A (2017). The role of electrical and jasmonate signalling in the recognition of captured prey in the carnivorous sundew plant *Drosera capensis*. *New Phytol* 213: 1818–1835.
- Król E, Dziubińska H, Trębacz K (2010). What do plants need action potentials for? In: DuBois ML (ed) *Action potential*. Nova Science Publisher, New York, pp 1–26.

- Kupisz K, Dziubińska H, Trębacz K (2017). Generation of action potential-type changes in response to darkening and illumination as indication of the plasma membrane proton pump status in *Marchantia polymorpha*. *Acta Physiol Plant* 39: 82.
- Macedo FCO, Dziubinska H, Trebacz K, Oliveira RF, Moral RA (2015). Action potentials in abscisic acid-deficient tomato mutant generated spontaneously and evoked by electrical stimulation. *Acta Physiol Plant* 37:207.
- Malaquias JB, Godoy WAC, Garcia AG, Ramalho FS, Omoto C (2017b). Larval dispersal of *Spodoptera frugiperda* strains on Bt cotton: A model for understanding resistance evolution and consequences for its management. *Sci Rep* 7: 16109.
- Malaquias JB, Ramalho FS, Dos S Dias CT, Brugger BP, S Lira AC, Wilcken CF, Pachú JK, Zanuncio JC (2017a). Multivariate approach to quantitative analysis of *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) and their natural enemy populations at different cotton spacings. *Sci Rep* 7: 41740 .
- Meimoun P, Vidal G, Bohrer AS (2009). Intracellular Ca^{2+} stores could participate to abscisic acid-induced depolarization and stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* 4: 830–835.
- Moral RA, Hinde J, Demétrio CGB (2017). Half-normal plots and overdispersed models in R: The hnp Package. *J Stat Softw* 10:1–23.
- Mousavi SA, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE (2013). *GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE* genes mediate leaf-to-leaf wound signaling. *Nature* 500: 422–426.
- Okumura M, Inoue S, Takahashi K, Ishizaki K, Kohchi T, Kinoshita T (2012). Characterization of the plasma membrane H^{+} -ATPase in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Physiol* 159:826–834.
- Pavlovic A, Slováková L, Pandolfi C, Mancuso S (2011). On the mechanism underlying photosynthetic limitation upon trigger hair irritation in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis). *J Exp Bot* 62: 1991–2000.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at <https://www.R-project.org/>
- Shabala S, White RG, Djordjevic MA, Ruan YL, Mathesius U (2016). Root-to-shoot signalling: integration of diverse molecules, pathways and functions. *Funct Plant Biol* 43: 87–104.
- Stahlberg R, Cleland RE, van Volkenburgh E (2006). Slow wave potentials – a propagating electrical signal unique to higher plants. In: Baluška F, Mancuso S, Volkmann D (eds) *Communication in plants. Neuronal aspects of plant life*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 291–308.

- Stolarz, M. & Dziubińska, H. *Acta Physiol Plant* (2017). Spontaneous action potentials and circumnutation in *Helianthus annuus*. 39: 234.
- Sukhov V (2016). Electrical signals as mechanism of photosynthesis regulation in plants. *Photosynth Res* 130: 373–387.
- Sukhov V, Gaspirovich V, Mysyagin S, Vodeneev V (2017). High-temperature tolerance of photosynthesis can be linked to local electrical responses in leaves of pea. *Front Physiol* 8: 763.
- Sukhov V, Vodeneev V (2009). A mathematical model of action potential in cells of vascular plants. *J Membr Biol* 232: 59–67.
- Takamura T (2006). Electrochemical potential around the plant root in relation to metabolism and growth acceleration. In Volkov AG (ed.) *Plant Electrophysiology*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp 341–374.
- Thompson AJ, Jackson AC, Symonds RC, Mulholland BJ, Dadswell AR, Blake PS, Burbidge A, Taylor IB (2000). Ectopic expression of a tomato *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase* gene causes over-production of abscisic acid. *Plant J* 23: 363–374.
- Thompson AJ, Thorne ET, Burbidge A, Jackson AC, Sharp RE, Taylor IB (2004). Complementation of *notabilis*, an abscisic acid-deficient mutant of tomato: importance of sequence context and utility of partial complementation. *Plant Cell Environ* 27: 459–471.
- Trebacz K, Dziubinska H, Krol E (2006). Electrical signals in long-distance communication in plants. In: Baluška F, Mancuso S, Volkmann D (eds) *Communication in plants. Neuronal aspects of plant life*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 277–290.
- Vodeneev V, Akinchits E, Sukhov V (2015). Variation potential in higher plants: mechanisms of generation and propagation. *Plant Signal Behav* 10: e1057365.
- Vodeneev VA, Opritov VA, Pyatygin SS (2006) Reversible changes of extracellular pH during action potential generation in a higher plant *Cucurbita pepo*. *Russ J Plant Physiol* 53: 481–487.
- Wagner E, Lehner L, Normann J, Veit J, Albrechtová J (2006). Hydro-electrochemical integration of the higher plant—basis for electrogenic flower induction. In: Baluška F, Mancuso S, Volkmann D (eds) *Communication in plants. Neuronal aspects of plant life*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 369–387.
- Yan X, Wang Z, Huang L, Wang C, Hou R, Xu Z, Qiao X (2009). Research progress on electrical signals in higher plants. *Prog Nat Sci* 19: 531–541.

Zawadzki T, Dziubinska H, Davies E (2008). Characteristics of action potentials generated spontaneously in *Helianthus annuus*. *Physiol Plant* 93: 291–297.

3. EFEITO DA PROPAGAÇÃO DE POTENCIAIS DE AÇÃO NAS TROCAS GASOSAS DE MICROTOMATEIRO MUTANTES EM ABA APÓS ESTÍMULO DE REIDRATAÇÃO

RESUMO

Durante seus ciclos de vida, as plantas são frequentemente sujeitas a períodos de flutuações entre o déficit hídrico e a reidratação. A comunicação eficiente e a sinalização rápida entre a parte aérea e o sistema radicular são fundamentais para as respostas adaptativas a estresses. O ácido abscísico e o sinal hidráulico são os principais sinais de longa distância responsivos ao estresse hídrico. No entanto, o ABA é suscetível à interação com sinais elétricos e pode não ser suficiente como um sinal de estresse em plantas. Sendo assim, o estudo objetivou investigar a relação entre sinais químicos e elétricos após o estímulo de reidratação na indução de mudanças nas trocas gasosas de plantas de microtomateiros mutantes em ABA. Três genótipos de microtomateiros cultivar Micro-Tom (MT) (*MTwt*), o mutante isogênico *MTnotabilis* (*MTnot*) e o transgênico *MTsp12::NCED* (*MTNCED*) foram expostos a sete, quatro e onze dias a condições de seca controlada, respectivamente. Em seguida, as plantas foram irrigadas novamente e avaliados simultaneamente as trocas gasosas, o potencial elétrico e a propagação de potenciais de ação. O déficit hídrico afetou o potencial hídrico das plantas e induziu uma despolarização crescente do potencial elétrico da membrana plasmática em *Mtwt* e *MTnot*. Em resposta à reidratação, os genótipos propagaram potenciais de ação acropetamente da raiz para a parte aérea. No *MTwt* o sinal elétrico induziu aumento na taxa fotossintética, condutância estomática e taxa transpiratória. Em contraste, as variáveis de trocas gasosas foram reduzidas nos mutantes em ABA. Esses resultados foram relacionados com o efeito do ABA no controle estomático e de mudanças no pH inativando a fotossíntese.

Palavras chaves: Estresse hídrico; Fotossíntese; Condutância estomática; *notabilis*; *NCED*

ABSTRACT

During their life cycles, plants are often subjected to periods of fluctuation between water deficit and rehydration events. Efficient communication and rapid signaling between the shoot and root systems are needed for adaptive stress responses. Absciscic acid (ABA) and the hydraulic signal are the main long-distance signals responsive to water deficit. Nevertheless, ABA is susceptible to interactions with electrical signals and may not be sufficient as a sign of stress in plants. Therefore, we aimed to investigate the relationship between hydraulic, chemical and electrical signals after a re-irrigation stimulus to induce changes in gas exchange of ABA mutant microtomato plants. Three genotypes of tomato, cultivar Micro-Tom (MT) (*MTwt*), the isogenic mutant *MTnotabilis* (*MTnot*) and transgenic *MTsp12::NCED* (*MTNCED*), were exposed to 7, 4 and 11 days under simulated drought conditions, respectively. Then, the plants were re-irrigated and we simultaneously evaluated gas exchange, electric potential and the propagation of action potentials. We found that water deficit affected the water potential of the plants and induced increased depolarization of the plasma membrane electric potential in *Mtwt* and *MTnot*. In response to re-irrigation, all genotypes propagated action potentials from root to shoot. In *MTwt*, the electrical signal induced increases in photosynthesis, stomatal conductance and transpiration rate. By contrast, in ABA-mutants, the gas exchange variables were reduced. These results were related to the effect of ABA on stomatal control and pH changes inactivating photosynthesis.

Keywords: Water stress; Photosynthesis; Stomata conductance; Absciscic acid; *notabilis*; *NCED*

3.1. Introdução

O estresse hídrico representa um desafio para a agricultura, principalmente por afetar o rendimento das culturas e, conseqüentemente, a produção de alimentos. Períodos mais frequentes de altas temperaturas e chuvas reduzidas tem sido observado devido às mudanças climáticas (IPCC, 2014). Ao perceber a secagem do solo através de proteínas mecanosensoras (Boisson-Dernier et al., 2011), as plantas propagam sinais hidráulicos, químicos (ondas de cálcio, espécies reativas de oxigênio e ácido abscísico) e sinais elétricos para induzir respostas específicas de tolerância ao déficit hídrico (Huber et al., 2019). O fechamento estomático é um exemplo de ajustamento induzido pelo sinal químico do ácido abscísico durante o déficit hídrico, para prevenir a perda de água por transpiração (Tombesi et al., 2015; Scoffoni et al., 2017).

Após o período de estresse, estímulos de reidratação ou uma pequena quantidade de chuva podem ter efeitos significativos nas funções fisiológicas e bioquímicas das plantas (Abdi et al., 2018). A capacidade das plantas de manter as funções metabólicas durante a seca e de se recuperar ao cessar o estresse está diretamente relacionada com transmissão de sinais rápidos e de longa distância, os quais promovem adaptações fisiológicas. Durante o estresse hídrico, o estado estacionário ou de repouso do potencial elétrico da membrana plasmática tende a despolarizar devido a maior atividade da H^+ -ATPase (Palmgren e Nissen, 2011), induzindo mudanças significativas nas relações iônicas celulares, no ajustamento osmótico e na condutância hidráulica das raízes (Gong et al., 2010). Plantas tolerantes ao déficit hídrico geralmente mostram valores de potencial de membrana intrinsecamente mais negativos (Chen et al., 2007; Smethurst et al., 2008).

A despolarização do potencial elétrico da membrana pode induzir uma rápida resposta na planta aos eventos de reidratação. Uma vez aplicado o estímulo de reidratação, por exemplo, sinais elétricos como os potenciais de ação são desencadeados a longa distância, do local de percepção do estímulo para os órgãos distais, induzindo respostas em toda a planta (Szechynska-Hebda et al., 2017). O potencial de ação é um sinal elétrico de curto prazo (Sukhova et al., 2017) evocado por estímulos não prejudiciais ao tecido como correntes elétricas (Kisnieriene et al., 2016, 2018), frio (Krol et al., 2006), irritação mecânica (Krausko et al., 2017; Pavlovič et al., 201) e a ação da luz ou sombra (Pikulencko e Bulychev, 2005). Grams et al., (2007) observaram que em plantas de milho os sinais hidráulicos e os potenciais de ação respondem rapidamente ao aumento da umidade do solo promovendo redução transitória na abertura dos estômatos e na fotossíntese.

A regulação da fotossíntese tem por objetivo a proteção da maquinaria fotossintética (Zivcak et al., 2013), além de estimular os processos de reparação após o estresse

(Sukhov et al., 2019). A manutenção da fotossíntese em plantas expostas aos estresses abióticos tem sido relacionada com a atuação do ABA no controle estomático (Kuromori et al., 2018), o ajustamento osmótico através da concentração de solutos (Harsh et al., 2016) e a ativação de mecanismos enzimáticos na proteção contra espécies reativas de oxigênio (Hasanuzzaman et al., 2013). No entanto, sinais elétricos são passíveis de integrar outras vias de sinalização (Sukhov, 2016; Sukhova et al., 2017) e influenciar diretamente a fotossíntese (Sukhova et al., 2018; Vodeneev et al., 2018), a respiração (Surova et al., 2016) e a expressão de genes de defesa (Mousavi et al., 2013).

De fato, sinais elétricos podem desempenhar um papel importante na indução de respostas fisiológicas das plantas sob condições de estresse (Sukhov et al., 2019). O conhecimento de quais vias de sinalização estão envolvidas nesta regulação possibilita estabelecer estratégias para a melhoria da atividade fotossintética e melhorar o rendimento das culturas (Abid et al., 2018). Além disso, o conhecimento sobre mudanças no potencial elétrico da membrana e seus reflexos permitem o surgimento de novas ferramentas no monitoramento de estresses, como um indicativo precoce do status fisiológico das plantas. Assim, investigamos a hipótese de que os potenciais de ação propagados a longas distâncias alteram a fotossíntese e abertura dos estômatos após o estímulo de reidratação devido ao efeito do déficit hídrico no potencial elétrico da membrana. O objetivo deste estudo foi investigar a relação entre sinais hidráulicos, químicos e elétricos após o estímulo na indução de alterações nas trocas gasosas de plantas de microtomateiros selvagens e mutantes em ABA.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Material vegetal e condições experimentais

Sementes de microtomateiros, cultivar Micro-Tom (MT) tipo selvagem (MT_{wt}), e os mutantes isogênico MT_{notabilis} (MT_{not}) e transgênico MT_{sp12::NCED} (MT_{NCED}) foram obtidos a partir da coleção de Micro-Tom do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento de Plantas da Universidade de São Paulo, Brasil. As sementes foram semeadas em vasos (350 dm⁻³) contendo substrato Basaplant® (Agro Base, Artur Nogueira, SP, Brasil) e vermiculita expandida (1:1) suplementada com 1 g L⁻¹ 10:10:10 NPK e 4 g L⁻¹ calcário dolomítico (MgCO₃+ CaCO₃). Os vasos foram acondicionados em gaiolas de Faraday no Laboratório de Estudos de Plantas Sob Estresse, sob condições controladas de irradiância (350

$\mu\text{mol f\acute{otons m}^{-2} \text{s}^{-1}}$), temperatura ($\sim 28^\circ\text{C}$), umidade relativa (40 a 60%) e fotoperíodo de 12 horas (dia/noite).

As plantas foram mantidas em capacidade de campo por um período de trinta dias e após esse período foi suspensa a irrigação. O período sob estresse foi variado entre os genótipos em função das mutações, conforme apresentado na tabela 1. O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados composto por três genótipos sendo, o (MT*wt*) e os mutantes MT*not* e MT*NCED*, submetidos a dois tratamentos: déficit hídrico (DH) e após o estímulo de reidratação (RI) com 8 repetições. O estímulo de reidratação consistiu na reirrigação das plantas com água até a capacidade de campo do substrato.

Tabela 1. Mutante e linha transgênica associada à via de biossíntese de ácido abscísico na cultivar Micro-Tom.

Genótipos	Efeito/função do gene	Referências	Período sob estresse até ponto de murcha foliar ($\sim -1,5 \text{ MPa}$)
Selvagem (MT <i>wt</i>)	Alelo recessivo self-pruning (sp) que conduz a um crescimento e maturação de frutos uniforme.	Yeager (1927) Meissner et al., (1997)	Sete a oito dias
<i>notabilis</i> (MT <i>not</i>)	Mutação na 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase (<i>NCED</i>) apresenta baixos níveis do hormônio ácido abscísico	Burbidge et al., (1999)	Três a quatro dias
<i>NCED</i> (MT <i>NCED</i>)	Linha transgênica superexpressa a 9-cis-epoxycarotenoid dioxigenase (<i>NCED</i>) apresenta alta concentração de ABA. Evento transgênico gerado da cultivar Ailsa Craig, identificado como <i>sp12::NCED</i> .	Thompson et al., (2007)	Nove a treze dias

Para não comprometer as análises da atividade elétrica das plantas, um experimento foi montado em paralelo com o objetivo de verificar o potencial da água durante o período de estresse. O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados composto por três genótipo sendo, o (MT*wt*) e os mutantes MT*not* e MT*NCED*, com 7 repetições.

3.2.2. Potencial da água

O potencial hídrico foliar antemanhã (Ψ_w) foi medido em discos foliares ($\sim 0,07 \text{ cm}^2$) retirados de folhas completamente expandidas do terço médio das plantas. As amostras foram mantidas por um período de seis horas em câmaras hermeticamente fechadas, conectadas ao psicrômetro de termopar (Modelo SC10 A, Decagom Devices Inc.), para a leitura do potencial hídrico. Foram realizadas leituras diárias do Ψ_w durante o período descrito na tabela 1.

3.2.3. Atividade elétrica

Antes da imposição do déficit hídrico, quatro eletrodos de medição foram inseridos, sendo o EI1 inserido no pecíolo da folha e os EI2, EI3 e EI4 no caule das plantas (Figura 1). Os eletrodos tem em sua extremidade Ag/AgCl (fio de prata de 0,25 ou 0,5 mm de diâmetro). Cada eletrodo foi conectado a um sistema de aquisição de dados com quatro canais independentes (LAB-TRAX-4/24T, WPI LLC, Sarasota, FL, EUA), cada um com seu próprio conversor A/D de 24 bits e com impedância de entrada de 667 GigaOhm Typ./182 GigaOhm Min e conectados a um computador e controlados pelo software LabScribe (iWorx, Dover, NH, EUA). Um eletrodo de referência foi mantido no caule próximo ao solo. A resistência de entrada de cada canal foi de 100 MΩ.

As medições elétricas foram iniciadas três horas após a inserção dos eletrodos nas plantas, tempo necessário para que a tensão pudesse ser estabilizada em todos os eletrodos. Após esse período, a irrigação foi cessada. Para investigar a relação do sinal elétrico o potencial de ação nas trocas gasosas dos Micro-Tom, após o período de estresse foi aplicado o estímulo de reidratação. Foram medidas as características de amplitude do sinal (mV), duração do pico ($t_{1/2}$, s) e velocidade (cm min^{-1}) dos potenciais de ação (PAs). O potencial de repouso foi monitorado pela medição contínua da atividade elétrica durante o período de estresse e após o estímulo de reidratação.

Figura 1. Esquema demonstrando o arranjo dos eletrodos (EI) nas plantas: EI 1 inserido no pecíolo; Els 2, 3 e 4 e o eletrodo de referência (R) foi inserido ao longo do caule.

3.2.4. Trocas gasosas

Avaliações instantâneas das trocas gasosas foram realizadas nas plantas irrigadas e expostas do déficit hídrico. Posteriormente, medições contínuas, por duas horas, foram realizadas a partir da aplicação do estímulo de reidratação. As trocas gasosas das plantas foram mensuradas na folha na qual estava inserido o EI1 para avaliar o efeito do sinal elétrico nas variáveis de taxa fotossintética (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa transpiratória (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e concentração intercelular de CO_2 (C_i). As medições foram realizadas utilizando um analisador de gases por infravermelho (LI-6400XTR, Licor®, Lincoln, Nebraska, EUA), sob radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante ($1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), e concentração atmosf\u00e9rica de CO_2 (C_a) ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$), temperatura ($\sim 28^\circ\text{C}$) e umidade ($\sim 65\%$).

3.2.5. An\u00e1lise estat\u00edstica

Os resultados obtidos foram submetidos a an\u00e1lises pr\u00e9vias de testes de normalidade e homocedasticidade, e a transforma\u00e7\u00e3o dos dados pelo m\u00e9todo de Box-Cox (1964) quando necess\u00e1rio. As vari\u00e1veis fisiol\u00f3gicas dependentes, como a A , g_s , E e C_i por n\u00e3o atender \u00e0s premissas do modelo de distribui\u00e7\u00e3o gaussiana, foram analisadas utilizando um modelo n\u00e3o param\u00e9trico, sendo que os tratamentos foram comparados pelo teste de Friedman (Mendiburu, 2019). As vari\u00e1veis discretas: n\u00famero de plantas que geraram potenciais de a\u00e7\u00e3o, n\u00famero de PAs; e vari\u00e1veis cont\u00ednuas: amplitude, dura\u00e7\u00e3o e velocidade de propaga\u00e7\u00e3o dos potenciais de a\u00e7\u00e3o foram analisadas com um modelo linear generalizado do tipo quasipoisson e pelo o modelo Gaussiano (distribui\u00e7\u00e3o normal), respectivamente. A qualidade do ajuste do modelo foi confirmada com um envelope simulado meio normal, utilizando o pacote hnp (Moral et al. 2017). Os contrastes de m\u00e9dias entre os gen\u00f3tipos foram conduzidos por meio da fun\u00e7\u00e3o glht do pacote multcomp (Torsten et al. 2008). Uma an\u00e1lise de regress\u00e3o foi adotada para analisar o padr\u00e3o de resposta das vari\u00e1veis fotossint\u00e9ticas e relacionadas \u00e0s trocas gasosas ao longo de 20 minutos ap\u00f3s est\u00edmulo de reidrata\u00e7\u00e3o nas condi\u00e7\u00f5es: com e sem propaga\u00e7\u00e3o de potencial de a\u00e7\u00e3o. Dada a n\u00e3o normalidade dos dados, utilizou-se um modelo de regress\u00e3o n\u00e3o param\u00e9trica do tipo polinomial local, utilizando o m\u00e9todo loess, fun\u00e7\u00e3o `parametric= false` no programa R (R Core Team, 2019).

3.3. Resultados

3.3.1. Potencial de água das plantas

O potencial hídrico foliar antemanhã (Ψ_w) reduziu significativamente ao longo do período de avaliação. Valores de Ψ_w inferiores ou similares a -1,15 MPa foram obtidos aos 7, 4 e 9 dias após imposição dos tratamentos para o *MTwt* e os mutantes *MTnot* e *MTNCED*, respectivamente (Fig. 2A-C).

Figura 2. Potencial de água de microtomateiros Micro-Tom (MT) selvagem (*MTwt*) e mutantes *MTnotabilis* (*MTnot*) e *MTNCED* durante 11 dias de déficit hídrico.

3.3.2. Ritmo diário do potencial de repouso dos mutantes em ABA

O potencial de repouso do *MTwt* e do mutante *MTnot* foi de aproximadamente 30 mV e mostrou um ritmo diário crescente de despolarização durante o período de estresse (Fig. 3). A despolarização máxima ocorreu à noite com um aumento de tensão de 10 a 20 mV para o *MTwt* e *MTnot*, respectivamente. Nas plantas *MTNCED* foram observadas pequenas flutuações no potencial de repouso sob luz e escuridão (Fig. 3).

Figura 3. Ritmos diários do potencial de repouso medidos durante o período de estresse hídrico e início da reidratação de microtomateiros Micro-Tom (MT) selvagem (*MTwt*) e mutantes *MTnotabilis* (*MTnot*) e *MTNCED*. Presença de luz entre 6:00 e 18:00.

3.3.3. Respostas das trocas gasosas ao sinal elétrico após o estímulo de reidratação

As trocas gasosas das plantas de *MTwt* e os mutantes *MTnot* e *MTNCED* foram afetadas diferentemente de acordo com o tratamento imposto. Maior taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s) e taxa transpiratória (E) foi observada no mutante *MTnot*, quando comparado ao *MTwt* e o *MTNCED* na condição controle. Sob déficit hídrico e após reidratação, a A , g_s e E do mutante *MTNCED* foram similares às plantas controle (*MTwt*). A reidratação promoveu os maiores valores de concentração intercelular de CO_2 (C_i) no *MTwt* (Tabela 2).

Tabela 2. Taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), taxa transpiratória (E) e concentração intercelular de CO_2 (C_i) de microtomateiros Micro-Tom (MT) selvagem (*MTwt*) e mutantes *MTnotabilis* (*MTnot*) e *MTNCED*. Avaliados sobre diferentes condições hídricas: controle irrigado (C), sob déficit hídrico (DH) e após estímulo de reidratação (RI).

Genótipos/Tratamentos		A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	g_s ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Ci ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol ar}^{-1}$)
MTwt	C	12.23±0.73 b	0.28±0.01 b	5.14±0.52 c	301±12.88 b
	DH	3.02±0.97 d	0.02±0.00 d	0.55±0.12 d	230±13.50 ab
	RI	2.99±0.96 d	0.02±0.00 d	0.56±0.11 d	338±7.38 a
MTnotabilis	C	17.45±1.08 a	0.59±0.00 a	8.86±0.35 a	245±44.30 ab
	DH	8.27±0.77 c	0.42±0.10 b	5.87±0.86 c	310±36.52 ab
	RI	10.29±1.68 bc	0.49±0.15 b	6.23±0.97 bc	337±7.73 ab
MTNCED	C	13.08±0.74 b	0.30±0.03 b	7.45±1.08 ab	240±45.94 ab
	DH	2.59±1.75 d	0.03±0.00 cd	0.56±0.10 d	316±36.91 ab
	RI	2.59±1.73 d	0.03±0.00 c	0.63±0.09 d	334±8.68 ab

Dados representam médias $\pm$ erro padrão (n = 8). Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si por contrastes de médias gerados pelo teste de Friedman.

Plantas de MTwt e os mutantes MTnot e MTNCED tiveram como resposta a propagação de potenciais de ação (PAs) acropetamente ao longo do caule até o pecíolo, após o estímulo de reidratação (Figura 4). O número de PAs (NPAs), a amplitude de despolarização (AP, mV) e a velocidade de propagação do sinal (V, cm s^{-1}) não diferiram entre os mutantes em ABA. Por outro lado, a duração do PAs foi maior no MTNCED (Tabela 3).

Tabela 3. Tabela 3. Número de plantas que geraram potenciais de ação (PAs) (NPPAs), número de PAs (NPAs), amplitude (AMP, mV), duração ($t_{1/2}$, s) e velocidade (V, cm min^{-1}) de propagação dos potenciais de ação registrados após o estímulo de reidratação em microtomateiros Micro-Tom (MT) selvagem (MTwt) e mutantes MTnotabilis (MTnot) e MTNCED.

Genótipos	NPPA	NPAs	AMP (mV)	$t_{1/2}$ (s)	V (cm s^{-1})
MTwt	2	NC	NC	NC	NC
MTnot	4	1.8 $\pm$ 0.45 a	19.71 $\pm$ 3.53 a	3.00 $\pm$ 1.18 b	0.57 $\pm$ 0.10 a
MTNCED	3	1.0 $\pm$ 0.00 a	16.29 $\pm$ 1.95 a	13.52 $\pm$ 1.74 a	0.26 $\pm$ 0.03 a
p		0.3045	0.9356	0.009	0.05
χ^2				0.3	

NC - Não calculado devido ao baixo número de sinais elétricos gerados. Dados representam médias $\pm$ erro padrão (n = 8). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si por contrastes de médias gerados por modelo linear generalizado do tipo quasepoisson ($p < 0,05$).

Figure 4. Propagation of action potentials (SAPs) in Micro-Tom tomato wild-type plants (MT_{wt}) (A) and MT_{notabilis} (MT_{not}) (B) and MT_{NCED} (C) mutants after estímulo de reidratação.

As análises de regressão não paramétricas revelaram claramente diferenças no padrão das trocas gasosas ao longo do tempo entre as plantas de *MTwt*, *MTnot* e *MTNCED* que emitiram sinal elétrico e aquelas que não propagaram (Fig 4 a 6). Para o *MTwt*, observa-se comportamento altamente contrastante foram observados em todos os períodos de avaliação. Em nenhum momento houve sobreposição dos intervalos de confiança entre as curvas das condições com e sem sinalização. O padrão fotossintético do *MTwt*, quando ocorre a sinalização, foi significativamente superior à condição de ausência de sinais. Por outro lado, um comportamento inverso em relação ao genótipo *MTwt* foi observado nos mutantes *MTnot* e *MTNCED* (Fig. 5 e 6). Nesses mutantes, o padrão das trocas gasosas é significativamente maior na ausência de sinalização em relação às plantas que propagaram os potenciais de ação. No *MTnot* a taxa fotossintética (*A*) após 13 minutos foi observado sobreposições das curvas e respectivas regiões de confiança (IC 95%) das condições com e sem sinalização. Esses resultados demonstram que a sinalização pode oferecer *trade-offs* em relação à fotossíntese que podem ser influenciados pelo ABA.

Figura 4. Resposta da taxa fotossintética (A ; A) condutância estomática (g_s , B), taxa transpiratória (E , C) e concentração intercelular de CO_2 (C_i , D) de microtomateiros Micro-Tom (MT) tipo selvagem (MTwt) após estímulo de reidratação, com e sem propagação de potencial de ação.

Figura 5. Resposta da taxa fotossintética (A; A) condutância estomática (g_s , B), taxa transpiratória (E , C) e concentração intercelular de CO_2 (C_i , D) de microtomateiros Micro-Tom (MT) mutante *MTnot* após estímulo de reidratação, com e sem propagação de potencial de ação.

Figura 6. Resposta da taxa fotossintética (A; A) condutância estomática (g_s , B), taxa transpiratória (E , C) e concentração intercelular de CO_2 (C_i , D) de microtomateiros Micro-Tom (MT) mutante *MTNCED* após estímulo de reidratação, com e sem propagação de potencial de ação.

3.4. Discussão

Neste estudo, é demonstrado que a propagação de potenciais de ação (PAs) em resposta ao estímulo de reidratação induz mudanças nas trocas gasosas em plantas de *MTwt* e os mutantes em ABA, tornando-se provável que sinais elétricos, químicos e hidráulicos participam na comunicação de longa distância. Geralmente, PAs são evocados por estímulos não prejudiciais ao tecido que excedem o limiar de excitação da membrana plasmática (Demidchik et al., 2018). Provavelmente, a redução no Ψ_w (Fig. 2) desempenhou papel fundamental na redução do limiar de excitação devido seu efeito na atividade da H^+ -ATPase (Gong et al., 2010) e na despolarização da membrana durante o período de estresse (Fig. 3), principalmente no *MTwt* e no mutante *MTnot*. O aumento na atividade da H^+ -ATPase sob déficit hídrico fornece uma força motriz para o transporte de solutos importantes no ajustamento osmótico e uma diferença de potencial elétrico interior-negativo (Palmgren e Nissen, 2011), que despolariza a membrana (Gong et al., 2010). Assim, em plantas sob estresse, o estado de excitação da membrana é potencialmente maior e a aplicação do estímulo de reidratação é suficiente para deflagrar a propagação de potenciais de ação.

Nas plantas transgênicas do *MTNCED* verificou-se menor variação no potencial elétrico durante o estresse hídrico (Fig. 3). Isso pode estar relacionado ao nível aumentado de ABA e Ca^{2+} nestas plantas (Thompson et al., 2000). Foi reportado que suspensões celulares de plantas de *Arabidopsis thaliana* que superexpressam a enzima *NCED* apresentaram maiores concentrações de ABA e de Ca^{2+} citosólico, os quais atuam na despolarização da membrana plasmática e fechamento dos estômatos (Meimoun et al., 2009). Isso sugere que plantas de *MTNCED* apresentam eventos precoces na via de sinalização do ABA, incluindo o potencial elétrico mais despolarizado e estômatos mais fechados, comparado ao *MTwt* e *MTnot*.

O adequado controle estomático e a capacidade fotossintética são fatores determinantes para o restabelecimento das plantas durante o estresse hídrico e após a reidratação (Abid et al., 2018). Neste estudo, o registro simultâneo da atividade elétrica e trocas gasosas após a reidratação demonstrou que a propagação de PAs pode induzir um aumento ou redução na fotossíntese dependendo dos níveis de ABA na planta (Fig. 4, 5 e 6). Em plantas de *MTwt* sob déficit hídrico, a irrigação induziu a propagação de PAs que precedeu um aumento em A , g_s e E quando comparado as plantas de *MTwt* na ausência de sinal. O principal mecanismo destas alterações é provavelmente o efeito do sinal hidráulico na abertura lenta dos estômatos. No entanto, uma “conversa cruzada” entre o sinal hidráulico e o sinal elétrico demonstra a possibilidade de um trabalho coletivo para impulsionar as respostas estomáticas (Grams et al., 2007; Huber et al., 2019), uma vez que níveis de ABA na folha podem persistir

após recuperação transitória do status hídrico da planta (Tombesi et al., 2015). O aumento na A e g_s em resposta a sinais elétricos e hidráulicos é pouco relatado. Grans et al., (2007) observou incrementos em A e a reabertura estomática após a propagação de PAs induzidos pela reidratação em plantas de *Zea mays* previamente expostas ao déficit hídrico.

Além disso, a concentração intercelular de CO_2 foi significativamente menor no MTwt com sinal elétrico, o que pode estar relacionado com ajustes induzidos pelo PA na difusão de CO_2 para o sítio de carboxilação da Rubisco. Sugere-se que um estudo detalhado acoplando análises de sinais elétricos, fluorescência da clorofila a e da condutância mesofílica possam confirmar essas indicações. Em contraste, a C_i foi significativamente maior nas plantas de MTwt (Tabela 2), especialmente naquelas que não propagaram o PA (Fig. 4). O aumento na C_i pode ocorrer em função de uma limitação ou regulação na fixação de carbono e, ainda, devido a inibição de enzimas do Ciclo de Calvin. Genes fotossintéticos como o da Rubisco ativase, e de algumas enzimas do ciclo de Calvin, além dos genes relacionados ao fotossistema I (FSI) e fotossistema II (FSII) são inversamente regulados durante aclimação ao estresse hídrico em plantas de videiras (Cramer et al., 2007).

Nos mutantes em ABA, após a irrigação, foi observado que os sinais hidráulicos, elétricos e químicos tiveram papéis distintos na fotossíntese e no controle estomático. Na ausência de PAs, o sinal hidráulico induziu um movimento hidropassivo temporário mantendo os estômatos parcialmente fechados (Raschke 1970) e a A , E e C_i pouco inalteradas (Fig 5 e 6). Sukhov et al., (2012) observou que a ausência de propagação de sinais elétricos, ou sinais com amplitude reduzida, não promovem alterações na fotossíntese. É importante notar que o MTnot consegue manter taxas significativamente mais altas de A , g_s e E , comparado ao MTwt e MTNCED (Tabela 2) devido a menor concentração de ABA. Para corrigir essa deficiência, outras vias sinalização são compensadas, como a propagação de sinais elétricos na geração de respostas fisiológicas rápidas a estímulos ambientais. De fato, no MTnot o PAs induziu uma diminuição rápida e transitória da A , seguido por um aumento gradual para níveis similares aos das plantas sem PAs. A inativação rápida da fotossíntese induzido por PA (no intervalo de minutos) também foi observada em plantas de milho (Vuralhan-Eckert et al., 2018) e *Drosera capensis* (Krausko et al., 2017).

Assim como observado para o MTnot, o mutante MTNCED sob déficit hídrico propagou PAs após o estímulo de reidratação. A propagação do sinal promoveu declínio na A , g_s , E e C_i de forma mais intensa quando comparada às plantas que não propagaram PAs. Assim, observa-se que o principal efeito do PAs, associado ao sinal hidráulico e químico nos mutantes em ABA, é induzir mudanças na fotossíntese (Sukhov et al., 2019). Essas alterações ocorrem

pelo controle estomático e a inativação transitória da fotossíntese, a fim de proteger a maquinaria fotossintética e estimular processos de reparação após cessado o estresse (Nath et al., 2013). A inativação da fotossíntese pode ocorrer devido tanto ao efeito do sinal elétrico na inativação da H^+ -ATPase na membrana plasmática quanto ao influxo de prótons (Sukhov, 2016). O influxo alcaliniza o apoplasto e acidifica o citoplasma (Sukhov et al., 2014; Sherstneva et al., 2015, 2016), promovendo uma diminuição do pH no estroma e no lúmen dos cloroplastos (Sukhov et al., 2016; Sukhova et al., 2018), suprimindo a fixação de CO_2 (Krupenina e Bulychev, 2007). Em resposta às mudanças de pH, uma diminuição da eficiência quântica dos fotossistemas I e II e aumento da dissipação não fotoquímica podem ser observados (Sukhov et al., 2014; Sherstneva et al. al., 2016).

A redução da g_s e E observada no *MTnot* e *MTNCED* pode estar relacionada ao acúmulo de ácido jasmônico (AJ) e ABA durante o estresse hídrico e também após a propagação de PA (Pavlovič et al., 2017; Krausko et al., 2017). O AJ compartilha com o ABA uma parte da via do sinal que leva ao fechamento dos estômatos e, da mesma forma que o ABA, sua produção ou aplicação exógena levam ao fechamento dos estômatos (Acharya e Assman, 2009; Hlavinka et al., 2012). Herde et al., (1997) observaram que a aplicação individual de AJ e ABA diminuíram a A , g_s e E em tomateiro do tipo selvagem e em mutantes deficientes em ABA, com maior intensidade após o tratamento prévio com ABA. Hlaváčková et al. (2006) também reportaram que a ação coordenada da ABA e JA está envolvida na regulação da resposta fotossintética sistêmica de curto prazo (A , E e g_s) em plantas de tabaco após a queima local. Os resultados sugerem que durante o período de déficit hídrico, a redução na g_s e E podem ter ocorrido pelo acúmulo de AJ (*MTnot*) e de ABA (*MTNCED*) e que, após a reidratação, o PA reforçou esta redução. Isso demonstra que o ABA não é o único componente de sinal sistêmico que ocasiona mudanças na g_s . Adicionalmente, as células-guardas carecem de plasmodemas que mantem uma conexão elétrica entre as células adjacentes mediando uma comunicação dentro de um tecido ou órgão. Assim, os plasmodesmatas, em conjunto com um sistema de transporte do floema, podem contribuir na sinalização supracelular a longa distância (Sager e Lee, 2014) e permitir a propagação dos PAs pelo floema com amplitudes e velocidade constantes (Fromm e Lauther, 2007).

3.5. Conclusão

A propagação de potenciais de ação está relacionada com o grau de despolarização da membrana plasmática durante o estresse hídrico.

O estímulo de reidratação induziu a propagação de potenciais de ação em plantas de MTwt e nos mutantes em ABA MT*not* e MTN*CED*.

Os potenciais de ação promoveram aumentos na taxa fotossintética, condutância estomática e taxa transpiratória em Mtwt.

Reduções na taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração e C_i , em resposta ao potencial de ação, foram evidenciadas nos mutantes em ABA, provavelmente devido os efeitos do ácido abscísico e ácido jasmônico na condutância estomática.

Potenciais de ação também podem ter induzido inativação da fotossíntese mediante ajuste do pH estromal.

Referências

- Abid, M., Ali, S., Qi, L.K., Zahoor, R., Tian, Z., Jiang, D., Snider, J.L., Dai, T., 2018. Physiological and biochemical changes during drought and recovery periods at tillering and jointing stages in wheat (*Triticum aestivum* L.). Sci. Rep. 8, 1–15.
- Acharya, B.R., Assmann, S.M., 2009. Hormone interactions in stomatal function. Plant. Mol. Biol. 69: 451–462.
- Boisson-Dernier, A., Kessler, S.A., Grossniklaus, U., 2011. The walls have ears: the role of plant CrRLK1Ls in sensing and transducing extracellular signals. J. Exp. Bot. 62: 1581–1591.
- Box, G.E.P., Cox, D.R., 1964. An analysis of transformations. J. Royal Soc. 26, 211–252.
- Burbidge, A., Grieve, T.M., Jackson, A., Thompson, A., McCarty, D.R., Taylor, I.B., 1999. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize Vp14. Plant J. 17, 427–431.
- Chen, Z., Pottosin, I.I., Cuin, T.A., Fuglsang, A.T., Tester, M., Jha, D., Zepeda-Jazo, I., Zhou, M., Palmgren, M.G., Newman, I.A., Shabala, S., 2007. Root plasma membrane transporters controlling K^+/Na^+ homeostasis in salt-stressed barley. Plant Physiol. 145, 1714–1725.
- Cramer, G.R., Ergül, A., Grimplet, J., Tillett, R.L., Tattersall, E.A.R., Bohlman, M.C., Vincent, D., Sonderegger, J., Evans, J., Osborne, C., Quilici, D., Schlauch, K.A., Schooley, D.A., Cushman, J.C., 2007. Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. Funct. Integr. Genomics 7, 111–134.
- Demidchik, V., Shabala, S., Isayenkov, S., Cuin, T.A., Pottosi, I., 2018. Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions. New Phytol. 220, 49–69.

- Fromm, J., Lautner, S., 2007. Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant. Cell. Environ.* 30: 249-257.
- Gong DS, Xiong Y-C, Ma B-L, Wang T-M, Ge J-P, Quin X-L, Li P-F, Kong H-Y, Li Z-Z, Li F-M (2010) Early activation of plasma membrane H⁺-ATPase and its relation to drought adaptation in two contrasting oat (*Avena sativa* L.) genotypes. *Environ. Exp. Bot.* 69, 1–8.
- Grams, T.E., Koziolok, C., Lautner, S., Matyssek, R., Fromm, J., 2007. Distinct roles of electric and hydraulic signals on the reaction of leaf gas exchange upon re-irrigation in *Zea mays* L. *Plant Cell Environ.* 30, 79–84.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Mahabub, M.D.A., Roychowdhury, R., Fujita, M., 2013. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 9643–9684.
- Herde, O., Penã-Cortés, H., Willmitzer, L., Fisahn, J., 1997. Stomatal responses to jasmonic acid, linolenic acid and abscisic acid in wild-type and ABA-deficient tomato plants. *Plant Cell Environ.* 20, 136–141.
- Hlavácková, V., Krchnák, P., Naus, J., Novák, O., Spundová, M., Strnad, M., 2006. Electrical and chemical signals involved in short-term systemic photosynthetic responses of tobacco plants to local burning. *Planta* 225, 235–244.
- Hlavinka, J., Nožková-Hlaváčková, V., Floková, K., Novák, O., Nauš, J., 2012. Jasmonic acid accumulation and systemic photosynthetic and electrical changes in locally burned wild type tomato, ABA-deficient *sitiens* mutants and *sitiens* pre-treated by ABA. *Plant Physiol Biochem.* 54, 89–96.
- Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P., Heiberger, R.M., Schuetzenmeister, A., Scheibe, S., 2008. multcomp: Simultaneous inference in general parametric models. URL <http://CRAN.R-project.org>. R package version 1.0-0.
- Huber, A.E., Melcher, P.J., Piñeros, M.A., Setter, T.L., Bauerle, T.L., 2019. Signal coordination before, during and after stomatal closure in response to drought stress. *New Phytol.* 224, 675–688.
- IPCC, 2018. Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change,

- sustainable development, and efforts to eradicate poverty [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, H.-O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P.R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J.B.R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M.I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, and T. Waterfield (eds.)]. In Press. https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/sites/2/2019/06/SR15_Full_Report_Low_Res.pdf
- Kisnieriene, V., Lapeikaite, I., Sevriukova, O., Ruksenas, O., 2016. The effects of Ni^{2+} on electrical signaling of *Nitellopsis obtusa* cells. J. Plant Res. 129, 551–558.
- Kisnieriene, V., Lapeikaite, I., Pupkis, V., 2018. Electrical signalling in *Nitellopsis obtusa*: potential biomarkers of biologically active compounds. Funct. Plant Biol. 45, 132–142.
- Krausko, M., Perutka, Z., Šebela, M., Šamajová, O., Šamaj, J., Novák, O., Pavlovič, A. The role of electrical and jasmonate signalling in the recognition of captured prey in the carnivorous sundew plant *Drosera capensis*. New Phytol. 213, 1818–1835.
- Krol, E., Dziubinska, H., Stolarz, M., Trebacz, K. 2006. Effects of ion channel inhibitors on cold- and electrically-induced action potentials in *Dionaea muscipula*. Biol. Plant. 50, 411–416.
- Krupenina, N.A., Bulychev, A.A., 2007. Action potential in a plant cell lowers the light requirement for non-photochemical energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. Biochim. Biophys. Acta. 1767, 781–788.
- Kuromori, T., Seo, M., Shinozaki, K., 2018. Review ABA transport and plant water stress responses. Trends Plant Sci. 23, 513–522.
- Macedo, F.C.O., Dziubinska, H., Trebacz, K., Oliveira, R.F., Moral, R.A., 2015. Action potentials in abscisic acid-deficient tomato mutant generated spontaneously and evoked by electrical stimulation. Acta Physiol. Plant. 37:207.
- Meimoun, P., Vidal, G., Bohrer, A.S., Lehner, A., Tran, D., Briand, J., Bouteau, F., Rona, J.P., 2009. Intracellular Ca^{2+} stores could participate to abscisic acid-induced depolarization and stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. Plant Signal. Behav. 4, 830–835.
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y. and Levy, A., 1997. A new model system for tomato genetics. The Plant Journal, 12: 1465-1472.
- Mendiburu, F., 2010. Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version. 1. 1-8.
- Moral, R.A., Hinde, J., Demétrio, C.G.B., 2017. Half-normal plots and overdispersed models in R: The hnp package. J. Stat. Softw. 81, 1–23.
- Mousavi, S.A., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S., Farmer, E.E., 2013. GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. Nature. 500, 422–426.

- Nath, K., Jajoo, A., Poudyal, R.S., Timilsina, R., Park, Y.S., Aro, E.-M., Nam, H.G., Lee, C.-H., 2013. Towards a critical understanding of the photosystem II repair mechanism and its regulation during stress conditions. *FEBS Letters* 587, 372–3381.
- Palmgren, M., Nissen, P., 2011. P-Type ATPases. *Ann. Rev. Biophys.* 40, 243–266.
- Krausko, M., Perutka, Z., Šebela, M., Šamajová, O., Šamaj, J., Novák, O., Pavlovič, A., 2017. The role of electrical and jasmonate signalling in the recognition of captured prey in the carnivorous sundew plant *Drosera capensis*. *New Phytol.* 213: 1818-1835.
- Pikulenکو, M.M., Bulychev, A.A., 2005. Light-triggered action potentials and changes in quantum efficiency of photosystem II in *Anthoceros* cells. *Russ. J. Plant Physiol.* 52, 584–590.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Raschke, K., 1970. Stomatal responses to pressure changes and interruptions in the water supply of detached leaves of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* 45, 415–414.
- Sager, R., Lee, J.Y., 2014. Plasmodesmata in integrated cell signalling: insights from development and environmental signals and stresses. *J. Exp. Bot.* 65, 6337–6358.
- Scoffoni, C., Albuquerque, C., Brodersen, C.R., Townes, S.V., John, G.P., Bartlett, M.K., Buckley, T.N., McElrone, A.J., Sack, L., 2017. Outside-xylem vulnerability, not xylem embolism, controls leaf hydraulic decline during dehydration. *Plant Physiol.* 173, 1197–1210.
- Sherstneva, O.N., Vodeneev, V.A., Surova, L.M., Novikova, E.M., Sukhov, V.S., 2016. Application of a mathematical model of variation potential for analysis of its influence on photosynthesis in higher plants. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A.* 10: 269-277.
- Sherstneva, O.N., Vodeneev, V.A., Katicheva, L.A., Surova, L.M., Sukhov, V.S., 2015. Participation of intracellular and extracellular pH changes in photosynthetic response development induced by variation potential in pumpkin seedlings. *Biochemistry* 80, 776–7784.
- Smethurst, C.F., Rix, K., Garnett, T., Auricht, G., Bayart, A., Lane, P., Wilson, S.J., Shabala, S., 2008. Multiple traits associated with salt tolerance in lucerne: revealing the underlying cellular mechanisms. *Funct. Plant Biol.* 35, 640–650.
- Sukhov, V., Surova, L., Morozova, E., Sherstneva, O., Vodeneev, V., 2016. Changes in H⁺-ATP synthase activity, proton gradient, and pH in pea chloroplast can be connected with variation potential. *Front. Plant. Sci.* 7:1092.

- Sukhov, V., 2016. Electrical signals as mechanism of photosynthesis regulation in plants. *Photosynth. Res.* 130, 373–387.
- Sukhov, V., Orlova, L., Mysyagin, S., Sinitsina, J., Vodeneev, V., 2012. Analysis of the photosynthetic response induced by variation potential in geranium. *Planta* 235, 703–712.
- Sukhov, V., Sukhova, E., Vodeneev, V., 2019. Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 146, 63–84.
- Sukhova, E., Mudrilov, M., Vodeneev, V., Sukhov, V., 2018. Influence of the variation potential on photosynthetic flows of light energy and electrons in pea. *Photosynth. Res.* 136, 215–228.
- Sukhova, E., Akinchits, E., Sukhov, V., 2017. Mathematical models of electrical activity in plants. *J. Membr. Biol.* 250, 407–423.
- Surova, L., Sherstneva, O., Vodeneev, V., Katicheva, L., Semina, M., Sukhov, V., 2016. Variation potential-induced photosynthetic and respiratory changes increase ATP content in pea leaves. *J. Plant Physiol.* 202, 57–64.
- Szechynska-Hebda, M., Lewandowska, M., Karpinski, S., 2017. Electrical signaling, photosynthesis and systemic acquired acclimation. *Front. Physiol.* 8, 684.
- Thompson, A.J., Jackson, A.C., Parker, R.A., Morpeth, D.R., Burbidge, A., Taylor, B., 2000. Absciscic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and absciscic acid. *Plant Mol. Biol.* 42, 833–845.
- Thompson, A.J., Andrews, J., Mulholland, B.J., McKee, J.M., Hilton, H.W., Horridge, J.S., Farquhar, G.D., Smeeton, R.G., Smillie, I.R.A., Black, C.R., Taylor, I.B., 2007. Overproduction of absciscic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. *Plant Physiol.* 143: 1905-1917.
- Tombesi, S., Nardini, A., Frioni, T., Soccolini, M., Zadra, C., Farinelli, D., Poni, S., Palliotti, A., 2015. Stomatal closure is induced by hydraulic signals and maintained by ABA in drought-stressed grapevine. *Sci. Rep.* 5: 12449.
- Turner, N.C., 2018. Turgor maintenance by osmotic adjustment: 40 years of progress. *J. Exp. Bot.* 69, 3223–3233.
- Vodeneev, V., Mudrilov, M., Akinchits, E., Balalaeva, I., Sukhov, V., 2018. Parameters of electrical signals and photosynthetic responses induced by them in pea seedlings depend on the nature of stimulus. *Funct. Plant Biol.* 45, 160–170.

- Vuralhan-Eckert, J., Lautner, S., Fromm, J., 2018. Effect of simultaneously induced environmental stimuli on electrical signalling and gas exchange in maize plants. *J. Plant Physiol.* 223, 32–36.
- Yeager, A.F., 1927. Determinate growth in the tomato. *J. Hered.* 18: 263-265.
- Zivcak, M., Brestic, M., Balatova, Z., Drevenakova, P., Olsovska, K., Kalaji, H.M., Yang, X., Allakhverdiev, S.I., 2013. Photosynthetic electron transport and specific photoprotective responses in wheat leaves under drought stress. *Photosynth. Res.* 117, 529–546.

4. CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO E SUA CONTRIBUIÇÃO NA EVOCAÇÃO DE SINAIS ELÉTRICOS EM MUTANTES DE ABA

RESUMO

A sinalização rápida e o ajuste metabólico em resposta ao déficit hídrico são essenciais para manter as funções fisiológicas após a reidratação. O objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio do perfil metabólico, se a alteração metabólica ocorrida durante o déficit hídrico está relacionada com a preparação de microtomateiros mutantes em ácido abscísico na geração de sinais elétricos após o estímulo de reidratação. Foram avaliados três genótipos de tomateiros cultivar Micro-Tom (MT), o genótipo selvagem (MT*wt*) e os mutantes isogênico MT*notabilis* (MT*not*) e transgênico MT*sp12::NCED* (MT*NCED*), expostos a nove, quatro e treze dias a condições de seca controlada, respectivamente. Antes e durante o déficit hídrico o material vegetal foi coletado para análise metabólica, posteriormente as plantas foram reidratadas e, imediatamente foram avaliadas a propagação de potenciais de ação e coletado material vegetal para análises de perfil metabólico. O estímulo de reidratação induziu a propagação de potenciais de ação no MT*not*, mas não em MT*wt* e MT*NCED*. Os maiores níveis de ácido glutâmico, asparagina e GABA podem ter influenciado na indução e propagação do sinal elétrico em MT*not*. A ausência de propagação de sinais no MT*wt* e no MT*NCED* pode ter decorrido do aumento nos níveis de alguns aminoácidos, como a metionina e putrescina, polióis, como o inositol e carboidratos como a manose-6-fosfato, os quais atuam na proteção de membranas e mitigação do estresse oxidativo após a reidratação das plantas.

Palavras-chaves: Potenciais de ação; Sinais elétricos; Ajuste metabólico; ABA

ABSTRACT

Rapid signaling and metabolic adjustment in response to water deficit are essential to maintain physiological functions after rehydration. The objective of the present study was to evaluate, through the metabolic profile, if the metabolic alteration occurred during the water deficit is related to the preparation of mutant microtomes in abscisic acid in the generation of electrical signals after the rehydration stimulus. Three genotypes of tomato cultivars Micro-Tom (MT), the wild genotype (MT*wt*) and the isogenic MT*notabilis* (MT*not*) and the transgenic MT*sp12::NCED* (MT*NCED*) mutants were evaluated, exposed to nine, four and thirteen days under drought conditions controlled, respectively. Before and during the water deficit the plant material was collected for metabolic analysis, afterwards the plants were rehydrated and the propagation of action potentials were immediately evaluated and plant material was collected for metabolic profile analysis. The rehydration stimulus induced the propagation of action potentials in MT*not*, but not in MT*wt* and MT*NCED*. The higher levels of glutamic acid, asparagine and GABA may have influenced the induction and propagation of the electrical signal in MT*not*. The absence of signal propagation in MT*wt* and MT*NCED* may have resulted from the increase in the levels of some amino acids, such as methionine and putrescine, polyols, such as inositol and carbohydrates such as mannose-6-phosphate, which act in the protection of membranes and mitigation of oxidative stress after rehydration of plants.

Keywords: Action potential; Electrical signals; Adjust metabolic; ABA

4.1. Introdução

O déficit hídrico é bem conhecido por afetar o crescimento, desenvolvimento e a produtividade de culturas. No entanto, períodos de estresse hídrico podem preparar as plantas para a rápida ativação de mecanismos de defesa em novos ciclos, e, ainda, responder de forma diferencial após a reidratação. Estudos tem revelado uma transferência de informações entre raízes e parte aérea durante a reidratação após déficit hídrico, na forma de sinais elétricos e hidráulicos, que poderiam provocar um controle fisiológico subsequente da captação líquida de CO₂ (Fromm e Fei, 1998; Ríos-Rojas et al., 2015; Gallé et al., 2015; Sukhov, 2016). Têm sido relatados que os sinais elétricos atuam nas respostas das plantas ao aumento da umidade do solo. Sendo o floema a principal via de transmissão destes sinais por longas distâncias (Grams et al., 2007; Fromm e Lautner, 2012).

Sabe-se que as plantas lidam com a seca através de ajustes metabólicos que induzem a manutenção do turgor celular (González-Villagra et al., 2018; Hussain et al., 2018). O ajustamento osmótico (Bai et al., 2019), o aumento na estabilidade das membranas celulares (Niu e Xiang, 2018) através de metabólitos osmoprotetores e da eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o aumento na síntese de ácido abscísico (ABA) que promovem o controle estomático (Kuromori et al., 2018), estão entre os mecanismos que reduzem a perda de água durante o déficit hídrico.

Dentre esses mecanismos, a atuação do ABA é considerada chave na tolerância ao déficit hídrico. Iuchi et al. (2001), por exemplo, demonstraram que a superexpressão da enzima *NCED* em *Arabidopsis* aumentou a concentração de ABA e a tolerância a seca devido a manutenção do turgor celular principalmente em folhas totalmente expandidas. No entanto, observou-se recentemente, que o crosstalk entre ABA e moléculas de sinalização como o Ca²⁺, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), fitohormônios como o ácido jasmônico (AJ) e sinais elétricos é fundamental na tolerância de plantas a estresses (Huber et al., 2019). O Ca²⁺ está envolvido em respostas rápidas de sinalização, e o aumento na sua concentração está relacionado com a síntese de ABA e AJ, os quais atuam como iniciadores de sinais elétricos (Hu et al., 2009). Além disso, o AJ é importante na regulação positiva de enzimas antioxidantes sob estresse (Soares et al., 2010), assim, o sinal elétrico pode influenciar na síntese de proteínas de defesa (Sukhov et al., 2019).

Adicionalmente, o aumento na concentração de solutos como açúcares, aminoácidos, açúcares álcoois, entre outros permite a tolerância ao déficit hídrico não somente pelo ajustamento osmótico, mas também por atuarem como protetores de enzimas e proteínas das membranas em situações de déficit hídrico (Abid et al., 2018; Iqbal, 2018; Suprasanna et al., 2016). Recentemente tem sido descrito que alguns aminoácidos são passíveis de interagir

com sinais elétricos. A rápida sinalização e o transporte a longa distância permitem que as plantas utilizem esses sinais para aprimorar o sistema de defesa. O aumento nos níveis do aminoácido glutamato, por exemplo, está associado à translocação de nitrogênio para as vias de produção de GABA contribuindo na liberação de energia para o ciclo tricarboxílico (Uawisetwathana et al., 2015). No entanto, esse aminoácido também está associado com a indução e propagação de sinais elétricos devido a ligação do glutamato a canais tipo GRLs que provocam o aumento de Ca^{2+} e a despolarização da membrana (Toyota et al., 2018; Mousavi et al., 2013). Outro aminoácido, como a asparagina, atua na manutenção da pressão osmótica (Lea et al., 2007), e foi relatado por modular a propagação de potenciais de ação (Lapeikaite et al., 2019).

Neste contexto, observa-se que a interação entre sinais elétricos, químicos e metabólicos podem induzir repostas importantes na adaptação das plantas a estresses abióticos. No ambiente natural, estas interações tendem a ocorrer simultaneamente, e, até o momento, são escassas às informações na literatura sobre o efeito do sinal elétrico no metabolismo de plantas e suas interações com o ABA em resposta ao déficit hídrico e após a reidratação. Neste estudo, identificamos os principais metabólitos envolvidos na resposta à seca de microtomateiros selvagem ou mutante em ABA e, após o estímulo de reidratação, associado à propagação de potenciais de ação, no mutante deficiente em ABA.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Material vegetal e condições experimentais

Foram utilizadas sementes de microtomateiros, cultivar Micro-Tom (MT). As sementes do tipo selvagem (MT*wt*) e dos mutantes isogênico MT*notabilis* (MT*not*) e transgênico MT*sp12::NCED* (MT*NCED*) (Figura 1) foram obtidas a partir da coleção de Micro-Tom do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento de Plantas da Universidade de São Paulo, Brasil. As sementes foram semeadas em vasos (350 dm⁻³) contendo substrato Basaplant[®] (Agro Base, Artur Nogueira, SP, Brasil) e vermiculita expandida (1:1) suplementada com 1 g L⁻¹ NPK (10:10:10) e 4 g L⁻¹ calcário dolomítico (MgCO₃ + CaCO₃). Os vasos foram acondicionados em gaiolas de Faraday no Laboratório de Estudos de Plantas Sob Estresse, sob condições controladas de irradiância (350 μmol fótons m⁻² s⁻¹), temperatura (~28 °C), umidade relativa (40 a 60%) e fotoperíodo de 12 horas (dia/noite).

Figura 1. Plantas de tomate cv. Micro-Tom (MT) tipo selvagem (MT_{wt}), transgênico MT_{sp12::NCED} (MT_{NCED}) que superexpressa ABA e o mutante deficiente em ABA MT_{notabilis} (MT_{not}).

As plantas foram mantidas em capacidade de campo por um período de trinta dias e, após esse período, a irrigação foi suspensa. O período sob déficit hídrico variou de 4, 9 e 13 dias. As plantas foram monitoradas quanto ao murchamento das folhas. À medida que as folhas basais demonstravam murchamento os microtomateiros eram irrigados até a capacidade de campo do substrato, previamente determinada. O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados composto por três genótipos: MT_{wt} e os mutantes MT_{not} e MT_{NCED}, submetidos a dois tratamentos: déficit hídrico (DH) e após o estímulo de reidratação (RI), com 6 repetições.

4.2.2. Atividade elétrica

Antes da aplicação do estímulo de reidratação, quatro eletrodos de medição e o de referência (R) foram inseridos nas plantas expostas ao déficit hídrico. O EI1 foi inserido no pecíolo da folha e os EI2, EI3 e EI4 no caule das plantas (Figura 2). Os eletrodos possuíam em sua extremidade Ag/AgCl (fio de prata de 0,25 ou 0,5 mm de diâmetro). Cada eletrodo foi conectado a um sistema de aquisição de dados com quatro canais independentes (LAB-TRAX-4/24T, WPI LLC, Sarasota, FL, EUA), cada um com seu próprio conversor A/D de 24 bits e com impedância de entrada de 667 GigaOhm Typ./182 GigaOhm Min, conectados a um

computador e controlados pelo software LabScribe (iWorx, Dover, NH, EUA). Um eletrodo de referência foi mantido no caule próximo ao solo. A resistência de entrada de cada canal foi de 100 M Ω .

As medições elétricas foram iniciadas três horas após a inserção dos eletrodos nas plantas, tempo necessário para que a tensão do potencial elétrico pudesse ser estabilizada em todos os eletrodos. Para investigar a relação do sinal elétrico e do potencial de ação no metabolismo dos microtomateiros foi aplicado o estímulo de reidratação. Foram analisadas as características de amplitude do sinal (mV), duração do pico ($t_{1/2}$, s) e a velocidade de propagação (cm min⁻¹). A velocidade foi calculada tomando a distância entre os eletrodos (cm) e dividindo pelo tempo necessário para o PA percorrer o segmento do caule (Macedo et al., 2015).

Figura 2. Esquema demonstrando o arranjo dos eletrodos (EI) nas plantas: EI 1 inserido no pecíolo; Els 2, 3 e 4 e o eletrodo de referência (R) foi inserido ao longo do caule.

4.2.3. Análises metabólicas

4.2.3.1. Extração de metabólitos e derivatização das amostras

Aproximadamente 100 mg de material vegetal, previamente macerados em nitrogênio líquido, foram adicionados a tubos de ensaio contendo 1 mL de solução de metanol (60%, v/v), clorofórmio (20%, v/v) e água (20%, v/v) e padrões internos. Os tubos foram agitados por três minutos no Vidration Mill (marca, país), em frequência máxima (30 Hz s⁻¹) com esferas magnéticas de tungstênio (beads). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 16000 g por 10 min a 4°C. Cem microlitros do sobrenadante foram transferidos para vial, evaporados em SpeedVac (Concentrator 5301, Eppendorf) e armazenados a -80°C.

Para a etapa de derivatização, 30 μ L de metoxiamina (15 mg mL⁻¹ em piridina) foram adicionados às amostras, as quais foram agitadas por 10 min e mantidas em repouso no escuro,

por 16 horas, em temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados 30 μL de MSTFA (N-metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida) com TMCS (trimetilclorosilano; 1%) e as amostras foram mantidas em repouso por 1 hora. Posteriormente, foram adicionados 30 μL de Heptano, com metil-esterato (15 ng g^{-1}) e as amostras mantidas em repouso por 30 min. As amostras foram centrifugadas para análise em GC-MS.

4.2.3.2. GC/TOFMS

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/TOFMS; marca, país), de acordo com Gullberg et al. (2004). Para a obtenção dos índices de retenção, foram utilizadas amostras controle (brancos) e uma série de alcanos (C12-C40), conforme descrito por Schauer et al. (2005).

As amostras foram automaticamente injetadas (1 μL), pelo modo splitless, em um cromatógrafo a gás (GC; 7890A, Agilent, país) com duas colunas de sílica fundida (20 m comprimento x 0,18 mm diâmetro interno x 0,18 μm de filme e 0,69 m x 0,10 mm diâmetro interno x 0,10 μm de filme), com gás transportador hélio a 1 mL min^{-1} . O programa de temperatura possui um conjunto inicial de temperatura da primeira coluna de 80°C durante 2 minutos, aumentando para 305°C a 15°C min^{-1} por 10 minutos e a segunda coluna a inicial foi de 85°C por 2 min e aumentada 15°C min^{-1} até atingir 310°C por 10 minutos. O efluente da coluna foi introduzido na fonte de íons (impacto de elétrons) do equipamento GC-TOFMS (Pegasus 4D, Leco).

A concentração dos metabólitos foi determinada por uma curva padrão (0,5 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada analito. Os dados foram expressos $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca.

4.2.3.3. Identificação dos metabólitos

Os cromatogramas gerados foram inicialmente avaliados pelo programa ChromaTOF (versão 4.32, país), no qual foi realizada a correção da linha de base e a conversão dos dados para arquivos net CDF. Posteriormente, com o auxílio do pacote TargetSearch (Cuadros-inostroza et al., 2009) no ambiente R (<http://www.R-project.org>) foi realizado a deconvolução, obtenção do índice de retenção (IR), correção do tempo de retenção (RT), identificação e alinhamento de picos e identificação dos metabólitos. Para a identificação, foi utilizada, ainda, a biblioteca de GMD (The Golm Metabolome Database, (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>)). A

validação dos metabólitos foi confirmada pela presença de três ou mais massas características (mass count) e a associação aos padrões de fragmentação específica (score ≥ 6). A intensidade de cada metabólito foi normalizada pela contagem iônica total de cada amostra e expressa pelo peso fresco (mg).

4.2.4. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa MetaboAnalyst (Xia et al., 2015), incluindo ajustes como a transformação logarítmica, pareto scaling e normalização dos dados pela mediana. A concentração de metabólitos foi avaliada pela análise de componentes principais (PCA e biplot) e por heatmap.

4.3. Resultados

4.3.1. O estímulo de reidratação induz a propagação de potencial de ação em mutante deficiente em ABA

O mutante *MTnot* exposto ao déficit hídrico e seguido pela reidratação teve como resposta a propagação de potenciais de ação (PAs) acropetalmente ao longo do caule até o pecíolo (Fig. 3). O número de PAs (NPAs), a amplitude de despolarização (AP, mV) e a velocidade de propagação do sinal (V , cm s^{-1}) do *MTnot* são mostrados na tabela 1. Por outro lado, nas plantas de *MTwt* e *MTNCED* não houve a propagação de sinais elétricos após a aplicação do estímulo de reidratação (Tabela 1).

Tabela 1. Número de plantas que geraram potenciais de ação (PAs) (NPPAs), número de PAs (NPAs), amplitude (AP, mV), duração ($t_{1/2}$, s) e velocidade (V, cm min^{-1}) de propagação dos potenciais de ação registrados após o estímulo de reidratação em microtomateiros Micro-Tom (MT) selvagem (MTwt) e mutantes MT*notabilis* (MT*not*) e MT*NCED*.

Genótipos	NPPA	NPAs	AP (mV)	$t_{1/2}$ (s)	V (cm s^{-1})
MTwt	0	NC	NC	NC	NC
MT <i>notabilis</i>	6	6	22,99	3,46	0,50
MT <i>NCED</i>	0	NC	NC	NC	NC

NC - Não calculado devido ausência de sinais elétricos gerados.

Figure 3. Propagação de potencial de ação em MT*notabilis* (MT*not*) após estímulo de reidratação.

4.3.2. Análise comparativa entre os mutantes em ABA e o tipo selvagem: alterações metabólicas que contribuíram para a separação dos tratamentos

Os dados de metabolômica do MTwt e os mutantes em ABA MT*not* e MT*NCED* foram comparados por análise de componentes principais (PCA e biplot) e por heatmap para verificar quais os metabólitos que mais contribuíram para a separação dos tratamentos (Figs. 4, 5). A análise dos componentes principais explica 55% da variação total observada, sendo 38,2% e 17,1% desta variação explicados pelo PC1 e PC2, respectivamente (Fig. 4A- B). A maior participação no primeiro componente é observada para o genótipo MT*not* na condição déficit

hídrico (DH) e déficit hídrico seguido de reidratação (RI), enquanto que no segundo componente o *MTnot* e o *MTwt* apresentaram maior participação na condição controle. O score plot também revela, no componente 1 uma alta correlação envolvendo os tratamentos por DH e RI no *MTwt* e no *MTNCED*, no entanto, com um alto grau de sobreposição demonstrando que a resposta metabólica é muito semelhante nestas condições (Fig. 4B).

Figura 4. Análise de componentes principais (PCA) com os valores médios dos metabólitos em *MTwt* e o mutantes em ABA *MTnot* e *MTNCED* sob condições controle, déficit hídrico e após estímulo de reidratação.

O perfil metabólito revelou que a exposição das plantas ao DH e RI resultou em alterações nos níveis do ácido glutâmico, ácido salicílico, sorbitol, glicose, triptofano e GABA no *MTnot*, como observado pela alta correlação no PC1 (Fig 5A). De forma similar, esses metabólitos também foram aumentados em *MTnot* quando comparado ao *MTwt* e *MTNCED*, em condição controle (Fig 5B). O *MTnot* apresentou os maiores níveis do aminoácido asparagina, serina e triptofano sob DH e RI, quando comparado ao *MTwt* e *MTNCED* nas mesmas condições (Figs. 5B).

Por outro lado, foi possível observar pelo PC1, que os níveis de metionina e ABA tiveram alta correlação com o *MTNCED* sob DH e RI (Fig. 5A), níveis similares destes metabólitos também foram observados no *MTwt* sob DH e RI (Fig. 5B). O DH induziu ainda incremento nos níveis de beta-alanina, allo-inositol, putrescina e manose-6-fosfato no *MTwt* e *MTNCED* (Fig. 5 B)

Figura 5. Metabólitos diferencialmente abundantes entre as amostras controle [C], déficit hídrico [D] e reidratação [R] (A) e o heatmap ilustrando a alteração dos metabólitos em *Mtwt*, *MTnot* e *MTNCED* sob condições controle, déficit hídrico e após estímulo de reidratação. A escala de cor do heatmap indica a abundância relativa do metabólito correspondente em cada tratamento que foi estudado. A cor azul claro indica baixa concentração, laranja média concentração e vermelho escuro alta concentração.

4.4. Discussão

4.4.1. O déficit hídrico altera o metabolismo de plantas de *MTwt* e *MTNCED* mas não evoca sinais elétricos após o estímulo de reidratação

Nas plantas de *MTwt* e *MTNCED* observamos que o estímulo de reidratação não induziu a propagação de PAs. O limiar de excitação do PA é um dos parâmetros fisiológicos primários que determinam a excitabilidade celular, ou seja, a capacidade elétrica de reagir aos estímulos (Stolarz et al. 2010). Somente quando o potencial de membrana é despolarizado o suficiente para exceder o limiar de excitação é que um potencial de ação será gerado e, conseqüentemente, uma reação fisiológica será iniciada. A ausência de PAs nestas plantas suscita algumas hipóteses que precisam ser investigadas. Uma das hipóteses seria que, devido aos níveis de ABA em *MTwt* e superexpressos em *MTNCED*, durante o déficit hídrico, essas plantas não apresentaram nível de despolarização da membrana celular suficiente para evocar um PA após a reidratação. Apesar do *MTNCED* apresentar maiores concentrações de Ca^{+2} citosólico por superexpressar ABA, o que resulta na menor atividade de canais iônicos necessários para deflagrar o sinal elétrico, esse mutante, assim como o *MTwt* podem ter desempenhado papel essencial na sinalização das células-guardas induzindo o fechamento estomático para reduzir a perda de água (Ver capítulo 2).

Uma resposta metabólica similar entre o *MTwt* e o *MTNCED* também foi verificada pelo alto grau de sobreposição entre os metabólitos nas condições de DH e RI (Fig. 2). Os níveis aumentados dos metabólitos inositol, manose-6-fosfato, putrescina, tirosina e metionina induzidos no *MTwt* e no *MTNCED* em condições de DH, também sugerem que a resposta metabólica pode estar relacionada com os níveis de ABA. Polióis, como o inositol, e carboidratos como a manose, podem atuar como armazenamento de carbono em diversas espécies de plantas, além de apresentar características antioxidantes e osmoprotetoras sob condições de estresse (Zhifang e Loescher, 2003). Chan et al. (2011) observaram que transgênicos de *Arabidopsis* transformados no gene manose-6-fosfato redutase apresentaram maior concentração de manitol. Além da sua função como osmoprotetor, o transgene ativou a expressão dos genes receptores de ABA, o que permitiu aos autores sugerir um *crosstalk* entre ABA e manitol.

Aminoácidos aromáticos desempenham papéis essenciais nas repostas das plantas a mudanças ambientais. A tirosina foi descrita por atuar na produção de metabólitos secundários e componentes de parede celular (Maeda e Dudareva, 2012) em resposta a condições de déficit hídrico, como observado em plantas de soja (Das et al., 2017). Assim como os níveis de metionina atuam como substrato para síntese de poliaminas (putrescina, espermidina e

espermina) importantes na tolerância a seca (Alcázar et al., 2010; Zagorchev et al., 2013). Essa via biossintética envolve a intermediária S-adenosilmetionina como um doador primário de metila, que produz ainda mais S-adenosil-L-homocisteína que é metabolizada para eventualmente regenerar a metionina (Van de Poel et al., 2012). Michaletti et al. (2018), por exemplo, observaram aumento nos níveis de metionina, S-adenosilmetionina, mas especialmente 5-metil-tetra-hidrofolato em cultivares de trigo sob déficit hídrico. Dentre esses aminoácidos, o acúmulo de SAM nas plantas é de particular relevância por sua atuação na biossíntese de poliaminas (Zagorchev et al., 2013), principalmente em condições hídricas limitantes. O aumento significativo nos níveis de putrescina no *MTwt* e *MTNCED* pode ter contribuído para fechamento estomático induzido pelo ABA. Associado ao aumento da putrescina, o aumento de Ca^{2+} e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) induzidos pelo ABA também atuam como mecanismo de tolerância à seca (An et al., 2008; Wimalasekera et al., 2011).

4.4.2. Déficit hídrico prepara as plantas de *MTnot* na evocação de potenciais de ação após a aplicação do estímulo de reidratação

Nós observamos que nas plantas de *MTnot* os potenciais de ação (PAs) são propagados das raízes para a parte aérea após aplicação do estímulo de reidratação. Geralmente, a evocação de PAs após a reidratação está associado ao nível de despolarização da membrana celular durante o déficit hídrico (Zhang et al., 2018), o que contribui para exceder o limiar de excitação e desencadear o PA. Considerando o estresse por seca, é importante distinguir os sinais de estresse primários dos sinais secundários. Inicialmente ocorre o estresse osmótico e posteriormente há uma complexidade de eventos que incluem o estresse oxidativo, danos aos componentes celulares e disfunção metabólica (Zhu, 2016). Assim, os PAs, ao serem iniciados e propagados por tecidos excitáveis, podem controlar uma infinidade de respostas importantes para defesa contra estresses abióticos (Król et al 2010).

Sabe-se que o ABA atua como um sinal de estresse para ajustar o crescimento das plantas em resposta a seca (Yoshida et al., 2019) e, portanto, alterações na sua concentração podem estimular o ajuste metabólico para mitigar as mudanças no status hídrico. No entanto, considerando que o *MTnot* tem uma menor concentração de ABA, com apenas 42% do nível total de ABA do tipo selvagem (Burbidge et al., 1999), o nível geral dos demais metabólitos pode ter resultado na ativação de outras vias de sinalização induzindo a propagação de sinais elétricos, como o PA. Os maiores níveis de ácido salicílico, GABA, ácido glutâmico e asparagina (Fig. 2), nas plantas de *MTnot* sob déficit hídrico e após o estímulo de reidratação,

sugerem uma resposta metabólica rápida de defesa antioxidante (Vásquez-Herrera et al., 2015; Sheteiwy et al., 2019). No entanto, metabólitos como o glutamato, ácido salicílico e asparagina também podem estar associados à indução e/ou propagação de sinais elétricos e em respostas induzidas pelo sinal elétrico. Mousavi et al. (2013) demonstraram que a rápida propagação de sinais elétricos em folhas de *Arabidopsis thaliana* expostas a danos mecânicos é dependente de canais de íons do tipo receptor de glutamato (GRL). O glutamato ao se ligar aos GRLs provoca despolarização rápida da membrana e um aumento transitório de Ca^{2+} no citosol (Zimmermann et al., 1999; Dennison e Spalding, 2000; Ni et al., 2016). O Ca^{2+} pode se propagar através da vasculatura do floema para órgãos distantes induzindo a expressão de genes de defesa como o ZAT12 (Toyota et al., 2018) o qual ativa a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase cobre/zinco em resposta ao estresse oxidativo (Davletova et al., 2005). De forma similar, a geração de PAs, conectada à despolarização do potencial elétrico da membrana, também se propaga pelo floema (Trebacz et al., 2006; Król et al., 2010; Sukhov et al., 2011) e é afetada pelo aumento da concentração de Ca^{2+} (Trebacz et al., 2006).

A despolarização da membrana e o influxo de Ca^{2+} também foram associados anteriormente aos incrementos nos níveis de ácido salicílico em raízes de *Mimosa pudica* (Saeedi et al., 2013) e ao aminoácido asparagina em raízes de *Arabidopsis* (Qi et al. 2006). Lapeikaite et al., (2019) observaram, ainda, que a concentração de asparagina em célula única de *Nitellopsis obtusa* pode alterar a amplitude de despolarização do sinal e a duração do pico do PA. A ativação de canais de Ca^{+2} , inativação e reativação da H^{+} -ATPase (Vodeneev et al. 2006, Sukhov e Vodeneev 2009) e efluxo de K^{+} (Sukhov e Vodeneev 2009) participam desse processo. No entanto, para que ocorra a propagação de sinais elétricos de forma eficaz é necessário que exista integridade da membrana plasmática principalmente sob condições de seca (Szechynska-Hebda et al., 2017). Observamos que o incremento nos níveis de sorbitol e glicose, em resposta ao déficit hídrico e ao estímulo de reidratação no MT*not*, podem estar relacionados com a proteção das membranas celulares aos danos causados pela desidratação (Keunen et al., 2013). Adicionalmente, o *crosstalk* entre sinais de EROs, Ca^{2+} , elétricos e hidráulicos que se propagam a taxas rápidas e a longas distâncias é um requisito importante na translocação de metabólitos através de diferentes tecidos (Choudhury et al., 2018) e na indução de respostas de defesa (Szechynska-Hebda et al., 2017). O sorbitol, por exemplo, pode ser transportado ao longo do floema para vários tecidos mediando respostas de osmoproteção (Loescher et al., 1990; Noiraud et al., 2001).

A redução nos níveis de prolina e aumento de ácido glutâmico corroboram com o aumento nos níveis de GABA no *MTnot*, uma vez que a síntese de GABA compete pelo mesmo substrato utilizado no metabolismo de prolina. O GABA é um aminoácido não proteico e foi sugerido como um possível sinalizador na resposta de defesa em plantas, pela regulação do movimento estomático através da modulação da proteína ALMT6 (De Angeli et al., 2013) e da atividade H^+ -ATPase via proteínas 14-3-3 (Mekonnen et al., 2016), além de atuar na eliminação de EROs (Roberts, 2007) e na prevenção de morte celular (Seifi et al., 2013). Xu et al. (2019) observaram que plantas de *Arabidopsis* sob condições de seca tiveram maior acúmulo de GABA (35%) e menor condutância estomática em comparação à linhagem deficiente em GABA (*gad2*) e ao tipo selvagem irrigados. Os autores ainda observaram que o GABA regula negativamente a proteína ALMT9, envolvida na captação de ânions nos vacúolos das células guarda durante a abertura estomática (Xu et al., 2019). Considerando que o *MTnot* mantém os estômatos mais abertos, o aumento na concentração de GABA sob DH e após a reidratação, pode ter contribuído no controle estomático como observado no Capítulo 2.

Neste estudo, os níveis mais elevados de AJ no *MTnot* sob DH e após a RI indicam que esse fitohormônio e o ABA podem compartilhar alvos comuns nas vias de sinalização (De Ollas e Gómez-Cadenas, 2015). De Ollas et al (2013) verificou que o acúmulo precoce de AJ foi necessário para o aumento subsequente de ABA nas raízes de citrumelo expostas ao déficit hídrico severo. É importante ressaltar que mesmo com a concentração de ABA prejudicada no *MTnot*, seu aumento torna-se necessário para o controle estomático sob déficit hídrico (Kuromori et al., 2018). Dessa forma, é provável o aumento de AJ e de GABA em resposta à desidratação esteja compensando os menores níveis de ABA (Arbona et al., 2010) observados no *MTnot*, em relação ao *MTwt* e *MTNCED*. No entanto, o envolvimento do AJ em respostas fisiológicas como o ajuste estomático, em conjunto com a ABA ou agindo de forma independente, ainda não está totalmente elucidado. Suhita et al. (2004) observaram que a aplicação exógena de ABA ou metil jasmonato (MeJA) em folhas destacadas provocou o fechamento estomático, todavia, o MeJA precisa de um pool de ABA para ser eficaz no fechamento de estômatos. Sabe-se que o aumento na concentração de Ca^{2+} é necessário na ativação da biossíntese de ABA (Xiong e Zhu, 2003; Christmann et al., 2013) e AJ (Hu et al., 2009) sob condições de estresse. Assim, acreditamos que a presença de uma quantidade mínima de ABA também é essencial para geração de PAs e a produção de AJ é necessária para as respostas induzidas por sinais elétricos como o PA e o potencial de variação (PV) (Herde et al., 1996; 1999). A relação entre o PA e o aumento nos níveis de AJ foram observados após a aplicação do estímulo elétrico em *Arabidopsis* (Mousavi et al. 2013).

De fato, os aminoácidos, açúcares, polóis e carboidratos, são importantes metabólitos envolvidos na ativação de mecanismo de defesa ao estresse hídrico e no preparo de respostas após a recuperação do estresse. O envolvimento desses compostos na evocação de sinais elétricos ainda é pouco estudado, no entanto, pode estar associado a regulação mediada pelo ABA ou ativação de outras vias de estresse (asparagina, ácido glutâmico- GABA) que induzem um balanceamento de cargas na membrana plasmática. Sugere-se que um estudo detalhado utilizando inibidores de ABA, GABA, glutamato e canais de cálcio no *MTwt* e *MTNCED* com objetivo de verificar se a membrana mantém despolarizada ou não pode mostrar pistas sobre seu significado fisiológico.

4.5. Conclusão

Avaliando o perfil metabólico de plantas de microtomateiro selvagens e mutantes em ABA foi possível verificar que o genótipo selvagem (*MTwt*) e superexpresso em ABA (*MTNCED*) não propagaram sinal elétrico nas plantas previamente submetidas ao déficit hídrico e induzidas pela reidratação. Isso pode ser explicado pelo acúmulo de metabólitos protetores de membrana e do estresse oxidativo, o que evitou a despolarização da membrana de forma a evocar potencial de ação após o estímulo de reidratação. Por outro lado, apesar do incremento no nível de metabólitos relacionados ao ajustamento osmótico durante o déficit hídrico, ocorreu despolarização da membrana suficiente para evocar potenciais de ação após exposição das plantas ao estímulo por reidratação. Observamos assim a uma relação entre a produção de metabólitos e a disponibilidade do ABA, assim como a atuação de metabólitos em vias similares à propagação de sinais elétricos em plantas de microtomateiros mutantes em ABA.

Referências

- Abid, M., Ali, S., Qi, L. K., Zahoor, R., Tian, Z., Jiang, D., ... & Dai, T. (2018). Physiological and biochemical changes during drought and recovery periods at tillering and jointing stages in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Scientific reports*, 8(1), 1-15.
- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., ... & Tiburcio, A. F. (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 231(6), 1237-1249.

- An, Z., Jing, W., Liu, Y., & Zhang, W. (2008). Hydrogen peroxide generated by copper amine oxidase is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Journal of experimental botany*, 59(4), 815-825.
- Arbona, V., Argamasilla, R., & Gómez-Cadenas, A. (2010). Common and divergent physiological, hormonal and metabolic responses of *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila* to water and salt stress. *Journal of plant physiology*, 167(16), 1342-1350.
- Bai, X., Dai, L., Sun, H., Chen, M., & Sun, Y. (2019). Effects of moderate soil salinity on osmotic adjustment and energy strategy in soybean under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139, 307-313.
- Burbidge A, Grieve TM, Jackson A, Thompson A, McCarty DR, Taylor IB (1999) Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize Vp14. *Plant J* 17: 427–431.
- Chan, Z., Grumet, R., & Loescher, W. (2011). Global gene expression analysis of transgenic, mannitol-producing, and salt-tolerant *Arabidopsis thaliana* indicates widespread changes in abiotic and biotic stress-related genes. *Journal of experimental botany*, 62(14), 4787-4803.
- Choudhury, F. K., Devireddy, A. R., Azad, R. K., Shulaev, V., & Mittler, R. (2018). Local and systemic metabolic responses during light-induced rapid systemic signaling. *Plant physiology*, 178(4), 1461-1472.
- Christmann, A., Grill, E., & Huang, J. (2013). Hydraulic signals in long-distance signaling. *Current opinion in plant biology*, 16(3), 293-300.
- Cuadros-Inostroza, A., Caldana, C., Redestig, H., Kusano, M., Lisec, J., Peña-Cortés, H., ... & Hannah, M. A. (2009). TargetSearch-a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. *BMC bioinformatics*, 10(1), 428.
- Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J., & Mittler, R. (2005). The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 139(2), 847-856.
- De Angeli, A., Zhang, J., Meyer, S., & Martinoia, E. (2013). AtALMT9 is a malate-activated vacuolar chloride channel required for stomatal opening in *Arabidopsis*. *Nature communications*, 4(1), 1-10.
- De Ollas, C., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2015). Jasmonic acid interacts with abscisic acid to regulate plant responses to water stress conditions. *Plant signaling & behavior*, 10(12), e1078953.

- De Ollas, C., Hernando, B., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2013). Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Physiologia plantarum*, 147(3), 296-306.
- Dennison, K. L., & Spalding, E. P. (2000). Glutamate-gated calcium fluxes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124(4), 1511-1514.
- Fromm J, Fei H. Electrical signaling and gas exchange in maize plants of drying soil. *Plant Sci* 1998; 132:203-13
- Fromm J, Hajirezaei M, Becker V, Lautner S. Electrical signaling along the phloem and its physiological responses in the maize leaf. *Front Plant Sci* 2013; 4:239; PMID:23847642;
- Fromm J, Lautner S. Generation, Transmission, and Physiological Effects of Electrical Signals in Plants. In: Volkov A. *Plant Electrophysiology*. Berlin Heidelberg: Springer; – Verlag; 2012; 207-32.
- Gallé, A., Lautner, S., Flexas, J., & Fromm, J. (2015). Environmental stimuli and physiological responses: the current view on electrical signalling. *Environmental and Experimental Botany*, 114, 15-21.
- González-Villagra, J., Rodrigues-Salvador, A., Nunes-Nesi, A., Cohen, J. D., & Reyes-Díaz, M. M. (2018). Age-related mechanism and its relationship with secondary metabolism and abscisic acid in *Aristotelia chilensis* plants subjected to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 124, 136-145.
- Grams T, Koziol C, Lautner S, Matyssek R, Fromm J. Distinct roles of electric and hydraulic signals on the reaction of leaf gas exchange upon re-irrigation in *Zea mays* L. *Plant Cell Environ* 2007; 30:79-84.
- Grams, T. E., Koziol, C., Lautner, S., Matyssek, R., & Fromm, J. (2007). Distinct roles of electric and hydraulic signals on the reaction of leaf gas exchange upon re-irrigation in *Zea mays* L. *Plant, Cell & Environment*, 30(1), 79-84.
- Gullberg J, Jonsson P, Nordstrom A, Sjostrom M, Moritz T. 2004. Design of experiments: An efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem* 331: 283– 295.
- Herde O, Atzorn R, Fisahn J, Wasternack C, Willmitzer L, Peña-Cortés H (1996) Localized wounding by heat initiates the accumulation of proteinase inhibitor II in abscisic acid deficient plants by triggering jasmonic acid biosynthesis. *Plant Physiol* 112: 853–860.

- Herrera-Vásquez, A., Salinas, P., & Holuigue, L. (2015). Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Frontiers in plant science*, 6, 171.
- Hu, X., Wansha, L., Chen, Q., & Yang, Y. (2009). Early signals transduction linking the synthesis of jasmonic acid in plant. *Plant signaling & behavior*, 4(8), 696-697.
- Huber, A.E., Melcher, P.J., Piñeros, M.A., Setter, T.L., Bauerle, T.L., 2019. Signal coordination before, during and after stomatal closure in response to drought stress. *New Phytol.* 224, 675–688.
- Hussain, H. A., Hussain, S., Khaliq, A., Ashraf, U., Anjum, S. A., Men, S., & Wang, L. (2018). Chilling and drought stresses in crop plants: implications, cross talk, and potential management opportunities. *Frontiers in plant science*, 9, 393.
- Iqbal, M. J. (2018). Role of osmolytes and antioxidant enzymes for drought tolerance in wheat. *Global Wheat Production*, 51.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., ... & Shinozaki, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase*, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 27(4), 325-333.
- Keunen, E. L. S., Peshev, D., Vangronsveld, J., Van Den Ende, W. I. M., & Cuypers, A. N. N. (2013). Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant, cell & environment*, 36(7), 1242-1255.
- Król E, Dziubińska H, Trębacz K (2010) What do plants need action potentials for? In: DuBois ML (ed) Action potential. Nova Science Publisher, New York, pp 1–26
- Kuromori, T., Seo, M., & Shinozaki, K. (2018). ABA transport and plant water stress responses. *Trends in plant science*, 23(6), 513-522.
- Lapeikaite, I., Dragunaite, U., Pupkis, V., Ruksenas, O., & Kisnieriene, V. (2019). Asparagine alters action potential parameters in single plant cell. *Protoplasma*, 256(2), 511-519.
- Lea, P. J., Sodek, L., Parry, M. A., Shewry, P. R., & Halford, N. G. (2007). Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology*, 150(1), 1-26.
- Loescher, W. H., McCamant, T., & Keller, J. D. (1990). Carbohydrate reserves, translocation, and storage in woody plant roots. *HortScience*, 25(3), 274-281.
- Maeda, H., & Dudareva, N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology*, 63, 73-105.

- Mekonnen, D. W., Flügge, U. I., & Ludewig, F. (2016). Gamma-aminobutyric acid depletion affects stomata closure and drought tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 245, 25-34.
- Michaletti, A., Naghavi, M. R., Toorchi, M., Zolla, L., & Rinalducci, S. (2018). Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. *Scientific reports*, 8(1), 1-18.
- Mousavi SA, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE (2013) GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signaling. *Nature* 500: 422–426.
- Ni, J., Yu, Z., Du, G., Zhang, Y., Taylor, J. L., Shen, C., ... & Wu, Y. (2016). Heterologous expression and functional analysis of rice GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE family indicates its role in glutamate triggered calcium flux in rice roots. *Rice*, 9(1), 9.
- Niu, Y., & Xiang, Y. (2018). An overview of biomembrane functions in plant responses to high-temperature stress. *Frontiers in plant science*, 9, 915.
- Noiraud, N., Maurousset, L., & Lemoine, R. (2001). Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem. *The plant cell*, 13(3), 695-705.
- Qi, Z., Stephens, N. R., & Spalding, E. P. (2006). Calcium entry mediated by GLR3. 3, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant physiology*, 142(3), 963-971.
- Ríos-Rojas, L., Morales-Moraga, D., Alcalde, J. A., & Gurovich, L. A. (2015). Use of plant woody species electrical potential for irrigation scheduling. *Plant signaling & behavior*, 10(2), e976487.
- Roberts M. R. (2007). Does GABA Act as a Signal in Plants?: Hints from Molecular Studies. *Plant signaling & behavior*, 2(5), 408–409.
- Saeedi, S., Rocher, F., Bonmort, J., Fleurat-Lessard, P., & Roblin, G. (2013). Early membrane events induced by salicylic acid in motor cells of the *Mimosa pudica* pulvinus. *Journal of experimental botany*, 64(7), 1829-1836.
- Schauer, N., Steinhauser, D., Strelkov, S., Schomburg, D., Allison, G., Moritz, T., ... & Fernie, A. R. (2005). GC–MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS letters*, 579(6), 1332-1337.
- Seifi, H. S., Curvers, K., De Vleeschauwer, D., Delaere, I., Aziz, A., & Höfte, M. (2013). Concurrent overactivation of the cytosolic glutamine synthetase and the GABA shunt in the

- ABA-deficient *sitiens* mutant of tomato leads to resistance against *B otrytis cinerea*. *New Phytologist*, 199(2), 490-504.
- Sheteiwy, M. S., Shao, H., Qi, W., Hamoud, Y. A., Shaghaleh, H., Khan, N. U., ... & Tang, B. (2019). GABA-Alleviated Oxidative Injury Induced by Salinity, Osmotic Stress and their Combination by Regulating Cellular and Molecular Signals in Rice. *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5709.
- Soares, A. M. D. S., Souza, T. F. D., Jacinto, T., & Machado, O. L. T. (2010). Effect of methyl jasmonate on antioxidative enzyme activities and on the contents of ROS and H₂O₂ in *Ricinus communis* leaves. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22(3), 151-158.
- Stolarz, M., & Dziubinska, H. (2017). Osmotic and salt stresses modulate spontaneous and glutamate-induced action potentials and distinguish between growth and circumnutation in *Helianthus annuus* seedlings. *Frontiers in plant science*, 8, 1766.
- Stolarz, M., Król, E., Dziubińska, H., & Kurenda, A. (2010). Glutamate induces series of action potentials and a decrease in circumnutation rate in *Helianthus annuus*. *Physiologia plantarum*, 138(3), 329-338.
- Suhita, D., Raghavendra, A. S., Kwak, J. M., & Vavasseur, A. (2004). Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate-and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant physiology*, 134(4), 1536-1545.
- Sukhov V, Vodeneev V (2009) A mathematical model of action potential in cells of vascular plants. *J Membr Biol* 232: 59–67.
- Sukhov, V., 2016. Electrical signals as mechanism of photosynthesis regulation in plants. *Photosynth. Res.* 130, 373–387.
- Sukhov, V., Sukhova, E., Vodeneev, V., 2019. Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 146, 63–84.
- Sukhov, V., Nerush, V., Orlova, L., & Vodeneev, V. (2011). Simulation of action potential propagation in plants. *Journal of theoretical biology*, 291, 47-55.
- Suprasanna, P., Nikalje, G. C., & Rai, A. N. (2016). Osmolyte accumulation and implications in plant abiotic stress tolerance. In *Osmolytes and plants acclimation to changing environment: Emerging omics technologies* (pp. 1-12). Springer, New Delhi.
- Szechynska-Hebda, M., Lewandowska, M., Karpinski, S., 2017. Electrical signaling, photosynthesis and systemic acquired acclimation. *Front. Physiol.* 8, 684.

- Toyota, M., Spencer, D., Sawai-Toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., Koo, A. J., ... & Gilroy, S. (2018). Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science*, 361(6407), 1112-1115.
- Trebacz K, Dziubinska H, Krol E (2006) Electrical signals in long-distance communication in plants. In: Baluška F, Mancuso S, Volkmann D (eds) *Communication in plants. Neuronal aspects of plant life*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 277–290.
- Uawisetwathana, U., Graham, S. F., Kamolsukyunyong, W., Sukhaket, W., Klanchui, A., Toojinda, T., ... & Elliott, C. T. (2015). Quantitative ¹H NMR metabolome profiling of Thai Jasmine rice (*Oryza sativa*) reveals primary metabolic response during brown planthopper infestation. *Metabolomics*, 11(6), 1640-1655.
- Van de Poel, B., Bulens, I., Oppermann, Y., Hertog, M. L., Nicolai, B. M., Sauter, M., & Geeraerd, A. H. (2013). S-adenosyl-l-methionine usage during climacteric ripening of tomato in relation to ethylene and polyamine biosynthesis and transmethylation capacity. *Physiologia plantarum*, 148(2), 176-188.
- Vodeneev VA, Opritov VA, Pyatygin SS (2006) Reversible changes of extracellular pH during action potential generation in a higher plant *Cucurbita pepo*. *Russ J Plant Physiol* 53: 481–487.
- Wimalasekera, R., Villar, C., Begum, T., & Scherer, G. F. (2011). COPPER AMINE OXIDASE1 (CuAO1) of *Arabidopsis thaliana* contributes to abscisic acid-and polyamine-induced nitric oxide biosynthesis and abscisic acid signal transduction. *Molecular Plant*, 4(4), 663-678.
- Xiong, L., & Zhu, J. K. (2003). Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant physiology*, 133(1), 29-36.
- Xu, B., Long, Y., Feng, X., Zhu, X., Sai, N., Chirkova, L., ... & Gilliam, M. (2019). GABA signalling in guard cells acts as a 'stress memory' to optimise plant water loss. *bioRxiv*.
- Yoshida, T., Obata, T., Feil, R., Lunn, J. E., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Fernie, A. R. (2019). The role of abscisic acid signaling in maintaining the metabolic balance required for *Arabidopsis* growth under nonstress conditions. *The Plant Cell*, 31(1), 84-105.
- Zagorchev, L., Seal, C. E., Kranner, I., & Odjakova, M. (2013). A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. *International journal of molecular sciences*, 14(4), 7405-7432.
- Zhang, X., Wu, H., Chen, L., Liu, L., & Wan, X. (2018). Maintenance of mesophyll potassium and regulation of plasma membrane H⁺-ATPase are associated with physiological responses of tea plants to drought and subsequent rehydration. *The Crop Journal*, 6(6), 611-620.

- Zhifang, G., & Loescher, W. H. (2003). Expression of a celery mannose 6-phosphate reductase in *Arabidopsis thaliana* enhances salt tolerance and induces biosynthesis of both mannitol and a glucosyl-mannitol dimer. *Plant, Cell & Environment*, 26(2), 275-283.
- Zhu, J. K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167(2), 313-324.
- Zimmermann, S., Ehrhardt, T., Plesch, G., & Müller-Röber, B. (1999). Ion channels in plant signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55(2), 183-203.

6 CONCLUSÃO GERAL

Neste estudo, nos propusemos a investigar como os sinais elétricos atuam na sinalização a longa distância ao induzir respostas fisiológicas e metabólicas em tomateiro mutante em ABA após o déficit hídrico e durante o período de reidratação. Nós verificamos que as transições claro/escuro foram responsáveis por causar a evocação de potenciais elétricos como SAPs e SVPs, enquanto que a aplicação de estímulos de tensão elétrica e a reidratação ocasionaram a evocação de PAs. O nível de despolarização da membrana plasmática demonstrou ser o principal fator associado com a evocação de potenciais de ação após um período de seca, sendo o mutante deficiente em ABA o mais responsivo eletricamente. A propagação de potenciais de ação foi um componente importante na sinalização entre a raiz e a parte-aérea, tendo um efeito direto na manutenção das trocas gasosas dos tomates após o estímulo de reidratação. Ao contrário do observado no *MTnot* e *MTNCED*, os potenciais de ação aumentaram os parâmetros de trocas gasosas no *MTwt*.

O estudo do perfil metabólico do *MTwt* e dos mutantes em ABA *MTnot* e *MTNCED* demonstraram que o nível de ABA das plantas pode influenciar nos ajustes metabólicos, bem como na indução e/ou preparação das plantas na propagação de potenciais de ação. Nas plantas *MTwt* e *MTNCED* o ajuste metabólico foi essencial na mitigação dos efeitos do déficit hídrico, sem a participação de sinais elétricos. No *MTnot*, por outro lado, os metabólitos produzidos em condição de déficit hídrico têm possível relação com indução na propagação de potenciais de ação após a aplicação do estímulo de reidratação. Verificamos ainda, que o *MTnot* utiliza o sinal elétrico como meio de comunicação em comparação ao *MTwt* e *MTNCED*.

Este trabalho fez importantes contribuições para a compreensão da sinalização elétrica em plantas, assim como permitiu uma maior compreensão do *feedback* entre os sinais hidráulico, químico (mediado pelo ABA) e elétrico. Os resultados nos permitiram elaborar as próximas questões a serem respondidas: porque as plantas em condições desfavoráveis fazem uso desse sinal? E ainda, porque algumas plantas usam o sinal elétrico com mais frequência que outras?