

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Tese

**Alterações no eletroma durante a sinalização sistêmica e no processo de
priming em plantas de cevada estimuladas por fungos patogênicos**

Aluna: Ma. Francine Zaio Sc Simmi
Orientador: Dr. Gustavo Maia Souza
Coorientador: Dr. Leandro José Dallagnol

Pelotas, 2022

Francine Zaiosc Simmi

Alterações no eletroma durante a sinalização sistêmica e no processo de *priming* em plantas de cevada estimuladas por fungos patogênicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Maia Souza

Coorientador: Prof. Dr. Leandro José Dallagnol

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S592a Simmi, Francine Zaiosc

Alterações no eletroma durante a sinalização sistêmica e no processo de *priming* em plantas de cevada estimuladas por fungos patogênicos / Francine Zaiosc Simmi ; Gustavo Maia Souza, orientador ; Leandro José Dallagnol, coorientador. — Pelotas, 2022.

69 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Eletroma. 2. Priming. 3. Interação planta-patógeno. 4. Cevada. I. Souza, Gustavo Maia, orient. II. Dallagnol, Leandro José, coorient. III. Título.

CDD : 584.93

Francine Zaiosc Simmi

Alterações no eletroma durante a sinalização sistêmica e no processo de *priming* em plantas de cevada estimuladas por fungos patogênicos

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutora em Fisiologia Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 30/09/2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. Leandro José Dallagnol (coorientador)

Doutor em Fitopatologia pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP)

Prof. Dr. Everton Granemann Souza

Doutor em Física pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dr. Rodrigo de Oliveira Almeida

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

Agradecimentos

Aos meus pais Rosangela Maria Zaiosc Simmi e Nilton Antonio Simmi, pelo apoio, incentivo, carinho, compreensão e por todas as vezes que me defenderam quando eram questionados do porquê eu “só” estudava.

A minha irmã Francieli Zaiosc Simmi por todo apoio, compreensão e pelos doces gostosos que diminuíram a minha ansiedade ao longo dos últimos anos.

Ao meu irmão Rafael Zaiosc Simmi, pelo apoio, incentivo, choques de realidade e por todas as vezes que me ajudou com as imagens usadas na tese.

Ao João Henrique Figueredo de Oliveira pelo companheirismo, por ter suportado bravamente todas as minhas crises de ansiedade quando as coisas não saiam como planejado e meu mal humor, pelo apoio, incentivo, compreensão, por viajar mais de 300 km todos os finais de semana durante dois anos para me ajudar com os experimentos da tese.

Em especial, ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo Maia Souza por ter me apresentado a eletrofisiologia vegetal (pela qual me apaixonei à primeira vista), pelos exemplos de dedicação e profissionalismo, ensinamentos, incentivo, confiança, e orientação durante essa trajetória.

Em especial, ao meu coorientador Prof. Dr. Leandro José Dallagnol por todos os ensinamentos, confiança e por me incentivar e ensinar a seguir em frente, mesmo quando há obstáculos.

Ao Dr. Rodrigo de Oliveira Almeida pela ajuda com a análise dos dados, pela paciência, incentivo e apoio.

Ao Prof. Dr. Willian Silva Barros pela ajuda com a análise dos dados.

À Prof^a. Dr^a. Danielle Ribeiro de Barros pelo incentivo, pelos exemplos de dedicação e profissionalismo, os quais aprecio com respeito e admiração.

Aos meus amigos Yutcelia Carolina Galvez Fajardo e Gabriel Bortolin por todos os momentos de descontração nos dias cansativos no laboratório e nos inúmeros finais de semanas que passamos no campus fazendo experimento, pela grande troca de conhecimentos, amizade, apoio e incentivo.

Aos meus amigos do extinto “hospício da Isa” (vulgo Hospedagem Pelotense) e agregados, Caio Maurício, Helena Matias, Edson Frozza, Vitor Wiedergrün e Carolina Follmer, que me acompanham desde o mestrado e que tornaram meus dias mais leves e divertidos e se tornaram ao longo do tempo minha família pelotense.

A minha amiga Ruth Elena Guzmán, a peruana mais gaúcha que conheço, pela amizade, carinho, conversas divertidas e todas as comidas gostosas.

Aos “guris do LIPP” em especial ao Keilor da Rosa Dorneles e ao Alfonso D. Victoria Arellano pelas inúmeras vezes que auxiliaram na “caça” ao inóculo, pelas conversas, incentivo, apoio e ajuda na realização dos experimentos.

Ao Gabriel Ricardo Aguilera de Toledo, Luiz Gustavo Schultz Senko e Rodrigo Torres Marques pelos “exorcismos eletrofisiológicos” os quais foram fundamentais para a realização da minha pesquisa.

Aos demais colegas do LACEV, Kezia Aparecida Guidorizi, André Geremia Parise, Ludmilla Bezerra de Almeida, Ádrya Vanessa Lira Costa, Gabriela Niemeyer Reissig e Thiago Francisco de Carvalho Oliveira, entre outros, que estiveram presentes durante todo esse tempo.

Aos pesquisadores Luiz Eichelberger e Vladirene Vieira da Embrapa Trigo pelo fornecimento das sementes de cevada utilizadas na realização dos experimentos da tese. Mesmo em meio a pandemia ambos não mediram esforços para que as sementes chegassem a tempo da realização dos experimentos.

As políticas públicas criadas no período de 2003 - 2010, foi graças a estas que eu pude estudar e tornar realidade alguns dos meus sonhos.

Por fim, mas não menos importante, a Universidade Federal de Pelotas e a CAPES pela concessão da bolsa.

Muito Obrigada!

Resumo

Em condições ambientais as plantas podem ser afetadas por estresse abióticos e bióticos, que podem ser espacialmente heterogêneos. Isso significa que as respostas adaptativas sistêmicas da planta em suas ações requerem sinais de estresse de longa distância, incluindo sinais elétricos. Os sinais elétricos são gerados pelo desequilíbrio transitório do potencial de membrana, causado pelo influxo/efluxo de íons e H^+ por canais iônicos, transportadores de membrana plasmática e bombas eletrogênicas. E influenciam vários processos fisiológicos. Além disso, as plantas contam com uma estratégia que melhora sua capacidade defensiva, o *priming*. O *priming* é um mecanismo de defesa que prepara o sistema imune da planta para uma ativação mais rápida e/ou mais forte das defesas celulares contra futuras exposições a diferentes tipos de estresse. Com o intuito de verificar se um estímulo local, promovido por agentes patogênicos e/ou estimulação química gera mudanças sistêmicas no eletroma de plantas de cevada, contribui para o processo de aquisição de *priming*, desenvolvemos este trabalho composto por dois experimentos. No primeiro experimento, foi avaliado se a estimulação de uma única folha por fungos patogênicos, com diferentes modos de parasitismo, transmite sinais elétricos sistêmicos para o restante da planta. No segundo experimento, foi avaliado se a elicitação local com ácido jasmônico ou, *Bipolaris. Sorokiniana*, causam mudanças fisiológicas sistêmicas, tais como mecanismos de defesa ligados ao estresse oxidativo. Nesse segundo caso, desejava-se saber se o eletroma poderia ter um papel de sinalização no processo de aquisição de *priming*. Os resultados obtidos no primeiro experimento revelaram que a inoculação com os fungos patogênicos gerou características específicas na distribuição de variação do eletroma ao longo do tempo para cada patógeno. Verificamos que a inoculação com diferentes espécies gerou uma assinatura elétrica na planta específica para cada patógeno, sendo possível identificar a presença do patógeno na planta nos primeiros minutos. Os resultados do segundo experimento mostraram que a aplicação local de ácido jasmônico (AJ) e a infecção por *B. sorokiniana* causaram alterações na expressão local e sistêmica (longe do local da aplicação) nos mecanismos de defesa ligados ao estresse oxidativo, bem como

reduziram drasticamente a infecção causada pela segunda inoculação com *B. sorokiniana*. Podemos concluir que aplicação local do fungo patogênico, assim como de AJ, induzem sinalização de longa distância com desencadeamento de efeito *priming* em tecidos sistêmicos. No entanto, novas análises do eletroma são necessárias para confirmar se, de fato, os sinais elétricos estão presentes no processo de aquisição de *priming*.

Palavras chaves: Eletroma; *priming*, interação planta-patógeno, cevada.

Abstract

Under environmental conditions plants can be affected by abiotic and biotic stresses, which can be spatially heterogeneous. This means that the plant's systemic adaptive responses to its actions require long-distance stress signals, including electrical signals. Electrical signals are generated by the transient imbalance of membrane potential, caused by the influx/efflux of ions and H^+ by ion channels, plasma membrane transporters and electrogenic pumps. And they influence various physiological processes. In addition, plants have a strategy that improves their defensive capacity, priming. Priming is a defense mechanism that prepares the plant's immune system for faster and/or stronger activation of cellular defenses against future exposure to different types of stress. To verify whether a local stimulus, promoted by pathogenic agents and/or chemical stimulation, generates systemic changes in the electrome of barley plants, contributing to the priming acquisition process, we developed this work consisting of two experiments. In the first experiment, it was evaluated whether stimulation of a single leaf by pathogenic fungi, with different modes of parasitism, transmits systemic electrical signals to the rest of the plant. In the second experiment, it was evaluated whether local elicitation with jasmonic acid or *Bipolaris. Sorokiniana*, cause systemic physiological changes, such as defense mechanisms linked to oxidative stress. In this second case, we wanted to know if the electrome could have a signaling role in the priming acquisition process. The results obtained in the first experiment revealed that inoculation with pathogenic fungi generated specific characteristics in the distribution of electrome variation over time for each pathogen. We verified that inoculation with different species generated an electrical signature in the plant specific to each pathogen, making it possible to identify the presence of the pathogen in the plant in the first minutes. The results of the second experiment showed that the local application of jasmonic acid (AJ) and the infection by *B. sorokiniana* caused alterations in the local and systemic expression (far from the application site) in the defense mechanisms linked to oxidative stress, as well as drastically reduced the infection caused by the second inoculation with *B. sorokiniana*. We can conclude that local application of the pathogenic fungus, as well as AJ, induce long-distance

signaling, triggering a priming effect in systemic tissues. However, further analysis of the electrome is needed to confirm whether, in fact, electrical signals are present in the priming acquisition process.

Keywords: Electrome; priming, plant-pathogen interaction, barley.

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Artigo 1 | 26 |
| Figura 1. Representação esquemática da montagem experimental. Plantas de cevada com 50 dias após a semeadura foram utilizadas para a realização do experimento. Foi realizado o isolamento da última folha completamente expandida da planta principal, e para isso foi colocado um saco plástico sobre a planta, deixando de fora somente a folha onde foi realizada a aplicação dos tratamentos. Em cada sessão experimental, foram coletados, simultaneamente, os dados bioelétricos de quatro plantas. A coleta dos dados foi realizada antes e após a aplicação dos tratamentos, cobrindo um total de 48 horas. A aplicação dos tratamentos e captação dos dados bioelétricos foram realizados dentro de uma Gaiola de Faraday. Para o fungo <i>B. sorokiniana</i> foi formado uma câmara úmida dentro da Gaiola de Faraday. | 30 |
| Figura 2. Representação gráfica da distribuição dos eletromas antes e após a aplicação dos tratamentos, através da densidade pela média de milivolts por minuto, e a representação visual da série temporal antes e após a aplicação dos tratamentos divididos pela linha vermelha. A) T1 inoculação simulada (toque na folha); B) T2 inoculação com <i>Blumeria graminis</i> ; C) T3 inoculação simulada (aplicação de água com Tween 20%) e D) T4 inoculação com suspensão de esporos de <i>Bipolaris sorokiniana</i> | 33 |
| Figura 3. Distribuição dos eletromas do atributo depois da aplicação dos tratamentos ao longo do tempo, gerado pela análise de cluster. Onde as alterações encontradas no eletroma (VE: variação do eletroma) foram classificadas em cluster 0 (em amarelo) e o restante dos dados (eletroma sem variação) classificados como cluster 1 (em azul). C – Controle geral; B.S – <i>Bipolaris sorokiniana</i> ; B.G - <i>Blumeria graminis</i> | 34 |
| Figura 4. Distribuição do número total de variações no eletroma (VEs) do atributo depois da aplicação dos tratamentos ao longo do tempo para os tratamentos: Controle geral, <i>B. graminis</i> e <i>B. sorokiniana</i> | 35 |
| Figura 5. Primeiros sintomas visíveis das doenças causados pelos patógenos usados no estudo. A) Primeiros sintomas visuais da mancha marrom causada por <i>Bipolaris sorokiniana</i> 24 horas após a inoculação da folha de cevada. B) Primeiros sintomas | |

visuais do oídio causada por *Blumeria graminis* 96 horas após a inoculação da folha de cevada.....36

Artigo 2.....43

Figura 1. Representação esquemática do desenho experimental. Plantas com 50 dias após a semeadura estão sendo utilizadas para a realização do experimento. Está sendo realizado o isolamento da última folha completamente expandida da planta principal, utilizando para isso um saco plástico. Em cada sessão experimental, estão sendo coletados, simultaneamente, os dados bioelétricos de oito plantas. A captação dos dados bioelétricos está sendo realizada antes da aplicação dos tratamentos, após a aplicação dos tratamentos na folha isolada e após a aplicação dos tratamentos em toda a planta. A aplicação dos tratamentos e a captação dos dados está sendo realizada dentro de uma câmara úmida.46

Figura 2. Representação esquemática da distribuição da aplicação dos tratamentos. Inicialmente será realizada a aplicação dos tratamentos na folha isolada da planta principal. Após 48 horas da aplicação dos tratamentos na folha isolada, será realizada a aplicação dos tratamentos em toda a planta.47

Figura 3. Distribuição dos eletromas antes e após a aplicação dos tratamentos ao longo do tempo, gerado pela análise de cluster. Onde as alterações encontradas no eletroma (VE: variação do eletroma) foram classificadas em cluster 0 (em azul) e o restante dos dados (eletroma sem variação) classificados como cluster 1 (em branco).52

Figura 4. Detecção histoquímica do acúmulo de radicais superóxido (O_2^-), acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxidação lipídica e perda da estabilidade da membrana, no local onde foi realizada a aplicação dos tratamentos em 2, 5, 8, 24 e 48 após a aplicação (hpa). **A, C, E, G**) Imagens representativas de seguimentos foliares coradas com os reagentes de NBT (**A**), DAB (**C**), Schiff (**E**) e Evans Blue (**G**), nos horários após a aplicação dos tratamentos (hpa) na folha isolada. **B, D, F, H**) Quantificação do acúmulo de radicais superóxido (O_2^-) (**B**), acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (**D**), peroxidação lipídica (**F**) e perda da estabilidade da membrana (**H**). Cada dado apresenta a média \pm erro padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos; letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os horários de avaliação de ($p < 0,05$).53

Figura 5. Detecção histoquímica da peroxidação lipídica, perda da estabilidade da membrana, acúmulo de radicais superóxido (O_2^-) e acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos tecidos sistêmicos em 2, 5, 8, 24 e 48 após a aplicação (hpa). **A, C, E, G**) Imagens representativas de seguimentos foliares coradas com os reagentes de NBT (**A**), DAB (**C**), Schiff (**E**) e Evans Blue (**G**), nos horários após a aplicação dos tratamentos (hpa) na folha isolada. **B, D, F, H**) Quantificação do acúmulo de radicais superóxido (O_2^-) (**B**), acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (**D**), peroxidação lipídica (**F**) e perda da estabilidade da membrana (**H**). Cada dado apresenta a média \pm erro padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos; letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os horários de avaliação de ($p < 0,05$).55

Figura 6. Severidade da mancha marrom (*B. sorokiniana*) 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a primeira aplicação dos tratamentos na folha isolada.56

Sumário

| | |
|--|----|
| Introdução Geral..... | 15 |
| Artigo 1 | 25 |
| 1 Introdução | 26 |
| 2 Material e Métodos..... | 27 |
| 2.1 Condições de crescimento de plantas e fungos, e inoculação das plantas.. | 27 |
| 2.2 Desenho experimental e tratamentos..... | 29 |
| 2.3 Aquisição dos dados bioelétricos | 30 |
| 2.4 Análise dos dados | 31 |
| 2.4.1 Pré-processamento dos dados | 31 |
| 2.4.2 Análise Bayesiana de Mudança de Pontos (BCP), Entropia Aproximada, Autocorrelação e Análise de Clusterização | 31 |
| 3 Resultados | 32 |
| 3.1 Alterações no eletroma captadas por diferentes análises | 32 |
| 3.2 Avaliação das doenças | 35 |
| 4 Discussão..... | 36 |
| 5 Conclusões | 38 |
| Referências bibliográficas | 39 |
| Artigo 2 | 42 |
| 1 Introdução | 43 |
| 2 Material e Métodos..... | 44 |
| 2.1 Condições de crescimento de plantas e fungo e inoculação das plantas | 44 |
| 2.2 Desenho experimental e tratamentos..... | 45 |
| 2.3 Aquisição dos dados bioelétricos | 48 |
| 2.5 Avaliação da doença | 50 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.6 | Análise dos dados | 50 |
| 2.6.1 | Análise dos dados bioelétricos | 50 |
| 2.6.2 | Análises de detecção histoquímica..... | 51 |
| 3 | Resultados | 51 |
| 3.1 | Alterações no eletroma captadas por diferentes análises | 51 |
| 3.2 | Detecção Histoquímicas..... | 52 |
| 3.3 | Avaliação da doença | 56 |
| 4 | Discussão..... | 56 |
| 5 | Conclusões | 57 |
| | Referências bibliográficas | 58 |
| | Considerações Finais | 61 |
| | Referências | 62 |

Introdução Geral

Mesmo possuindo um hábito de vida sésstil, as plantas são hábeis em reagir efetivamente ao seu ambiente em constante mudança. Organismos de vida sésstil tipicamente evoluíram uma organização estrutural modular e, ao mesmo tempo, foi desenvolvido um sistema de sinalização em forma de rede que permite a integração de respostas modulares ao nível da planta como um todo (LÜTTGE, 2021). Assim, as plantas conseguem reagir de forma rápida e eficaz a circunstâncias potencialmente danosas, como no caso do ataque de patógenos (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

Apesar das plantas possuírem mecanismo de transdução de sinal bem orquestrado que as tornam combatentes potentes contra uma ampla gama de agentes patogênicos (JONES; DANGL, 2006), a maioria dos microrganismos patogênicos coevoluiu com suas plantas hospedeiras, eventualmente suplantando os sistemas de defesa. Assim, uma corrida armamentista evolucionária moldou continuamente a composição genética das plantas hospedeiras e de seus patógenos cognatos (BHAR; CHAKRABORTY; ROY, 2022). Como estratégia, as plantas desenvolveram a capacidade de se adaptar a condições adversas, sensibilizando seu sistema de defesa em resposta a sinais de estresse. Esse fenômeno foi denominado de *priming* de defesa. No *priming* de defesa, a planta apresenta uma resposta de defesa mais rápida e/ou mais forte contra futuras exposições a diferentes tipos de estresse (AHMAD et al., 2010; CONRATH, 2011; CONRATH et al., 2006).

Ademais, é bem conhecido que a ação local de estressores pode induzir alterações sistêmicas na expressão de genes, processos respiratórios e fotossintéticos, transpiração, e produção de fitohormônios (SUKHOV; SUKHOVA; VODENEEV, 2019). A indução de respostas fisiológicas sistêmicas sob a ação local de estressores requer a geração e propagação de sinais de estresse de longa distância (SUKHOV; SUKHOVA; VODENEEV, 2019). Já é bem conhecido em plantas superiores diferentes tipos de sinais de estresse de longa distância. Tais sinais incluem numerosos tipos de sinais químicos (fitohormônios, pequenas proteínas e peptídeos, glutamato, e outros), ondas de espécies reativas de oxigênio, ondas de Ca^{2+} , ondas hidráulicas e sinais elétricos (SUKHOVA; SUKHOV, 2021).

Os sinais elétricos são mudanças transitórias no gradiente do potencial elétrico através da membrana plasmática (DE TOLEDO et al., 2019; FROMM; LAUTNER, 2007; SUKHOV; SUKHOVA; VODENEEV, 2019). Podem se propagar em segundos

ou minutos após as ações locais de estressores, uma vez que suas velocidades são tipicamente de várias centenas de $\mu\text{m s}^{-1}$ a vários cm s^{-1} (FROMM; LAUTNER, 2007; SUKHOV; SUKHOVA; VODENEEV, 2019). Considera-se também que os sinais elétricos podem interagir com outros tipos de sinais de estresse de longa distância, incluindo sinais hormonais (FARMER et al., 2020; PEÑA-CORTÉS; FISAHN; WILLMITZER, 1995), ondas EROs (FICHMAN; MITTLER, 2021; SUZUKI; MITTLER, 2012), ondas hidráulicas (MALONE, 1994) e ondas de Ca^{2+} (CHOI et al., 2016, 2014). Além disso, existem trabalhos que mostram a influência dos sinais elétricos em processos fisiológicos e na detecção de estresses em plantas (DEBONO; SOUZA, 2019; REISSIG et al., 2021; SARAIVA; FERREIRA; SOUZA, 2017; SIMMI et al., 2020; SOUZA et al., 2017).

No entanto, a indução de resistência em plantas é um processo complexo que pode incluir diferentes vias de sinalização. Embora muitas redes complexas de sinalização e interação gênica tenham sido bem descritas em diferentes plantas em resposta a vários patógenos e no *priming* de defesa (HILKER et al., 2016; SHAH et al., 2014), os estudos envolvendo a sinalização sistêmica, em ambos, são baseados principalmente em sinais químicos (MAUCH-MANI et al., 2017; HILLEARY; GILROY, 2018). Até o momento, apenas um estudo realizado recentemente por Simmi et al., 2020 aborda a sinalização elétrica sistêmica durante a interação planta-patógeno.

Interações entre plantas e fungos patogênicos

A interação entre fungos e plantas começa assim que o esporo fúngico encontra a superfície da planta. A natureza da interação entre eles é determinada pela composição química, topologia e estruturas da superfície da planta, bem como pela forma, textura e características moleculares dos esporos fúngicos (ŁAŻNIEWSKA; MACIOSZEK; KONONOWICZ, 2012). Assim, a troca de sinais entre eles é o que determina o resultado da interação.

Para estabelecer interações compatíveis com seus hospedeiros, os fungos patogênicos contam com diferentes estratégias, para adquirir nutrientes e estabelecer parasitismo em seus hospedeiros. Fungos necrotróficos sintetizam e secretam metabólitos secundários tóxicos que matam as células hospedeiras e então absorvem os nutrientes liberados do tecido morto (HORBACH et al., 2011). Em contraste, fungos biotróficos estabelecem uma estreita associação com o hospedeiro através do

desenvolvimento de hifas de infecção especializadas ou haustórios nas células vivas da planta das quais absorvem os nutrientes e toxinas não são produzidas. No entanto, também existem combinações desses estilos de vida e estratégias nutricionais, fungos hemibiotróficos, estes exibem um estilo biotrófico inicial e transitório, seguido por um estilo de vida necrotrófico (HORBACH et al., 2011; MENDGEN; HAHN, 2002)

As diferenças de estilo de vida determinam em grande parte a ampla gama de estratégias que os fungos usam para evadir, neutralizar ou sequestrar as defesas das plantas em seu esforço para completar seu ciclo de vida e garantir a sua reprodução. Independentemente de seu estilo de vida, acredita-se que todos os patógenos microbianos utilizem os chamados efetores, moléculas secretadas na planta de várias naturezas, para apoiar a colonização do hospedeiro, muitas vezes, mas não exclusivamente, através da supressão das respostas imunes do hospedeiro (ROVENICH; BOSHOVEN; THOMMA, 2014).

As plantas desenvolveram estratégias sofisticadas e mecanismos moleculares complexos que tem como intuito reconhecer, restringir o crescimento e a multiplicação do patógeno (EULGEM, 2005; JONES; DANGL, 2006). Esses mecanismos de defesa das plantas podem ser constitutivos (pré-formados), presentes na superfície da folha, entre eles a cutícula e metabólitos com atividade biocida (SERRANO et al., 2014), ou então mecanismos induzíveis que são ativados após o reconhecimento de um intruso ou, em outras instâncias, induzidos por compostos elicitores (JONES; DANGL, 2006). Isso tudo irá determinar o resultado da interação entre plantas e patógenos.

Em interações incompatíveis, as reações de defesa do hospedeiro são iniciadas após a percepção de sinais derivados do patógeno, os quais são denominados de padrões moleculares associados ao patógeno (*pathogen-associated molecular patterns* PAMPs), pelos receptores transmembranares da planta (receptores de reconhecimento de padrões, PRRs), o que desencadeia mecanismos de defesa intracelulares (JONES; DANGL, 2006; ZIPFEL, 2009). Entretanto, as plantas também são capazes de reconhecer outros tipos de compostos indutores, como padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Os DAMPs representam moléculas derivadas da planta e que são produzidas sob condições específicas de estresse como, por exemplo, ferimentos causados pelo ataque de insetos herbívoros ou então outros eventos de degradação dos tecidos do hospedeiro (NEWMAN et al., 2013).

O reconhecimento dos PAMPs pelos PRRs da planta, leva ao estabelecimento da imunidade desencadeada por padrões (PTI). A PTI se manifesta após a ligação física entre o domínio extracelular do receptor (PRR) com o antigênico do ligante (PAMP), o que acarreta uma mudança na estrutura do receptor e, conseqüentemente, a ativação de uma cascata de sinalização citoplasmática pelo domínio intracelular do receptor, ativando rapidamente o influxo de íons de cálcio (Ca^{2+}) e de hidrogênio (H^+), levando à alcalinização do meio pela modificação do pH local. Concomitantemente, ocorre o efluxo de potássio (K^+) e de ânions, em particular de nitrato, através da membrana plasmática, o que leva a despolarização da membrana, como mostrado em um estudo realizado por Mithöfer; Ebel; Felle (2005). Outras respostas que ocorrem logo após a percepção dos PAMPs são a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação de Proteína-quinases ativadas por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase* - MAPKs), mudanças na fosforilação de proteínas e a expressão de genes envolvidos na biossíntese de peptídeos e compostos antimicrobianos. Todos esses eventos iniciais podem ocorrer em um intervalo de segundos a minutos, e essa sinalização inicial é convertida em uma resposta de defesa inicial da planta ao patógeno (BOLLER; FELIX, 2009; DALIO et al., 2014; HANN; RATHJEN, 2010).

Apesar da PTI, na maioria das vezes ser suficiente para impedir o estabelecimento da infecção da maioria dos agentes patogênicos, em alguns casos, patógenos adaptados conseguem suprimir a PTI através da secreção de proteínas específicas (efetores) que alteram o reconhecimento de elicitores de defesa do hospedeiro por alguns reguladores de defesa, o que permite uma infecção bem-sucedida e leva ao desencadeamento da suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS), (interação compatível) (CEULEMANS et al., 2021; CUI; TSUDA; PARKER, 2015; JONES; DANGL, 2006). Esses efetores, agem na supressão das respostas imunes, evitando o reconhecimento do patógeno ou redirecionando as fontes de energia e nutrientes para o patógeno (CEULEMANS et al., 2021). Os efetores são geralmente específicos para patógenos individuais e geralmente não são conservados em grupos microbianos acima do nível de família (BOLLER; FELIX, 2009).

No entanto, muitas plantas desenvolveram estratégias para detectar e superar esses efetores com as chamadas proteínas R, as quais reconhecem diretamente e indiretamente a presença dos efetores patogênicos ou então examinam se os alvos dos efetores foram modificados. Se for bem sucedido, isso levará ao

desencadeamento de uma segunda camada de reações de defesa, denominada imunidade desencadeada por efector (ETI) (JONES; DANGL, 2006; PIETERSE et al., 2014).

A ativação da ETI depende do estilo de vida do patógeno. Enquanto bactérias e fungos biotróficos se alimentam de tecidos vivos e desenvolvem estratégias para explorar recursos ao tempo que mantêm o hospedeiro vivo, patógenos necrotróficos destroem seus hospedeiros através da secreção de toxinas e se alimentam dos tecidos mortos do hospedeiro. Outros patógenos, chamados de hemibiotróficos, começam com estratégias biotróficas, mas podem adotar estratégias necrotróficas mais tarde (RODRIGUEZ-MORENO et al., 2018). A ETI só é eficiente no controle contra patógenos biotróficos e na fase inicial da infecção de patógenos hemibiotróficos, mas não funciona como estratégia para controlar patógenos necrotróficos. A ETI ativa as vias de sinalização celular que desencadeiam a morte celular programada no sítio de infecção, o que conduz ao colapso do tecido e à inibição completa da proliferação do patógeno. Esta forma especializada de morte celular é conhecida como Reação de Hipersensibilidade (*Hypersensitive response* - HR) (CAPLAN; PADMANABHAN; DINESH-KUMAR, 2008). Além da morte celular programada, quando a ETI é ativada, a planta desencadeia alterações nos níveis de cálcio no citoplasma, produção de espécies reativas de oxigênio e uma cascata de sinalização via quinases (FU; DONG, 2013; ZEDADRA et al., 2019). Nesta corrida armamentista evolutiva contínua, os patógenos tentam superar as plantas produzindo proteínas efectoras mais especializadas. E com isso, causar a infecção bem sucedida (CEULEMANS et al., 2021).

Alguns sinais imunes móveis podem ser induzidos durante a ETI, como ácido metil salicílico (MeSA), ácido azelaico e glicerol-3-fosfato (G3P), que são transportados do local da infecção para tecidos sistêmicos não infectados. A percepção desses sinais em tecidos não infectados induz o acúmulo de SA e medeia a programação transcricional massiva (FU; DONG, 2013; SPOEL; DONG, 2012). Este mecanismo de defesa induzido é denominado resistência sistêmica adquirida (SAR). Em última análise, leva à produção de proteínas relacionadas à patogênese (PR) com atividade antimicrobiana, que protege as plantas de ataques subsequentes de patógenos (FU; DONG, 2013; SPOEL; DONG, 2012).

Priming de defesa em plantas

As plantas desenvolveram a capacidade de se adaptar as condições adversas em seu ambiente “lembrando” de incidentes passados e usando esse conhecimento armazenado para se adaptar a novos desafios. A esse fenômeno tem-se referido como memória de estresse ou *priming* de defesa. No *priming* de defesa, a planta apresenta uma resposta mais rápida e mais robusta a uma segunda exposição a um patógeno em comparação a primeira exposição, aumentando assim suas chances de sobrevivência (AHMAD et al., 2010; CONRATH, 2011; CONRATH et al., 2006; PASTOR et al., 2013). O *priming* é eficiente não só contra agentes patogênicos, mas também a insetos herbívoros (ENGELBERTH et al., 2004; FROST et al., 2008) e estímulos abióticos (BECKERS; CONRATH, 2007; THEOCHARIS et al., 2012).

Durante o processo de aquisição de *priming*, os organismos passam por três estados sucessivos. O estado “*naïve*” (antes da primeira exposição a um estresse ou a um evento *priming* indicativo de estresse), o estado *primed* (estado em que um organismo entra depois de experimentar um estímulo *priming*) e o estado *primed e triggered* (estado em que o organismo entra após passar por um *priming* e pelo estímulo desencadeante ‘*triggered*’). O *priming* atua no fenótipo, mantendo inalterada a informação genética fornecida pela sequência de DNA, porém causa alterações epigenéticas, celulares e hormonais. Além disso, o *priming* permite a reversão para o estado “*naïve*”. Uma vez que essa aquisição de resistência permanece latente, sua expressão ocorre somente se um novo estímulo for aplicado (HILKER et al., 2016).

O *priming* pode ser induzido de diversas formas: infecção por patógenos, colonização de raízes por microrganismos benéficos, tratamento com produtos químicos, naturais ou sintéticos, alteração do metabolismo primário e percepção de certos compostos orgânicos voláteis (VOCs) (CONRATH et al., 2006).

Diferentes estímulos de *priming* podem desencadear mudanças similares, ou alterações específicas. Um exemplo disso são as alterações transitórias nos níveis de cálcio intracelulares que ocorrem dentro de alguns segundos ou minutos após à estimulação por PAMP (BOLLER; FELIX, 2009; JEWORUTZKI et al., 2010) e predação por insetos (HILKER; MEINERS, 2006), porém isso não ocorre quando se faz a aplicação de BABA (DUBREUIL-MAURIZI et al., 2010).

Além disso, essas alterações transitórias nos níveis de cálcio intracelulares levam ao aumento do cálcio no citosol após a percepção de PAMPs, levando a uma

rápida ativação de canais iônicos, resultando em influxo transiente de Ca^{2+} e H^+ , bem como efluxo de K^+ e Cl^- . Desequilíbrios iônicos e modulações da atividade de canais resultam em mudanças rápidas do potencial de membrana plasmática (DJONOVIC et al., 2006; LUO et al., 2010). MAISCHAK et al. (2010) sugeriram que a despolarização bem como a transmissão de sinal elétrico, local e de longa distância na planta, podem desempenhar papel significativo na indução da resistência sistêmica (NAWROCKA; MAŁOLEPSZA, 2013). Durante a despolarização da membrana mudanças rápidas de espécies reativas de oxigênio (EROs) são frequentemente observadas nas células da planta. Entre as EROs, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) está envolvido em diversos mecanismos de defesa, como expansão da parede celular e lignificação. As NADPH oxidases, *respiratory burst oxidase homologue* D e F (RBOHD/F) e peroxidases são as principais fontes de EROs nas plantas (KADOTA et al., 2015; MIGNOLET-SPRUYT et al., 2016). RBOHD produz superóxido que é eficientemente convertido em H_2O_2 pela superóxido dismutase (SOD), e as concentrações de H_2O_2 são reguladas por enzimas antioxidantes, incluindo ascorbato peroxidases (APXs) e catalases (CATs) (SANDALIO; Rodríguez-SerranoMaría; Romero-Puertas, 2016).

Mudanças causadas pela indução de *priming* em plantas podem ser passadas de geração em geração, proporcionando vantagens significativas para a descendência “preparada” (LUNA et al., 2012; SLAUGHTER et al., 2012), ou até mesmo para a própria progênie da prole (LUNA et al., 2012). Evidências recentes revelaram que proteínas que afetam modificações pós-traducionais de histonas, deposição de variantes de histonas, remodelação de cromatina dependente de ATP e metilação de DNA modulam a expressão de genes de defesa dependentes de ácido salicílico (AS) ou ácido jasmônico (AJ) centrados na metilação do DNA, e dirigidos por RNAi (LUNA et al., 2012).

Várias moléculas, com estruturas diversas, têm sido propostas para atuar como sinal desencadeador da resistência sistêmica em plantas, incluindo o SA (CAMAÑES et al., 2012), derivado metilado de SA (MeSA), JA (TRUMAN et al., 2007), auxina, ácido pipecólico (derivado de aminoácido não proteico de lisina, Pip) (NÁVAROVA et al., 2012), ácido desidroabietinal (a diterpenoide, DA), ácido azelaico (C_9 ácido dicarboxílico, AzA) (JUNG et al., 2009), glicerol-3-fosfato (derivado de açúcar fosforilada, G3P), e o óxido nítrico (NO) (HILLEARY; GILROY, 2018). No entanto, apesar de muita investigação, a identidade precisa do sinal móvel transmitido durante

o desencadeamento da resistência sistêmica ainda permanece indefinido (MAUCHMANI et al., 2017; HILLEARY; GILROY, 2018).

Eletroma vegetal e o seu envolvimento na interação planta-patógeno

Em plantas, muitos mensageiros têm sido descritos como transportadores de informações entre células para gerar respostas sistêmicas, incluindo, moléculas de RNA, peptídeos e proteínas, fitohormônios, alterações iônicas, EROs e os sinais elétricos (CHOI et al., 2016; GILROY et al., 2016; HEDRICH; SALVADOR-RECATALÀ; DREYER, 2016; TILSNER et al., 2016). Enquanto os mensageiros químicos, como o JA e SA, podem levar algumas horas para atuarem (TRUMAN et al., 2007), a taxa de propagação das ondas de Ca^{2+} , EROs e de sinais elétricos é mais rápida, variando de ~ 100 a $>1000 \mu\text{m sec}^{-1}$ (CHOI et al., 2016). Estes sinais apresentam diferentes tipos de integração. Por exemplo, um estímulo local origina ondas de Ca^{2+} , e essas ondas podem estar integradas às ondas de EROs por meio da ativação de proteínas RBOHD pela ligação direta de íons Ca^{2+} . Além disso, a fosforilação das proteínas quinases dependentes de Ca^{2+} (CPK) estimulam a produção de EROs que, por sua vez, pode ser integrado a uma onda elétrica pela ativação de canais iônicos que despolarizam a membrana plasmática e regulam os sinais elétricos. As ondas de Ca^{2+} podem, adicionalmente, ser integradas nas ondas elétricas via canais de glutamato (GLRs). Finalmente, essas três ondas podem amplificar-se e regular-se mutuamente, disseminando informações diferentes através dos órgãos da planta ou até mesmo em toda a planta (DE TOLEDO et al., 2019; GILROY et al., 2016).

Em estudos realizados recentemente por Simmi et al. (2020), foi observado que após a inoculação de plantas com fungo patogênico, ocorre uma alteração na sinalização elétrica das plantas. Isso mostra o envolvimento dos sinais elétricos na interação planta-patógeno. Ademais, outros estudos também mostraram que os sinais elétricos desempenham um papel central na comunicação sistêmica em plantas (BALUŠKA; VOLKMANN; MANCUSO, 2006; SOUZA et al., 2017; VAN BEL et al., 2014; ZIMMERMANN et al., 2009). Esses sinais participam de ajustes fenotípicos de plantas sob diferentes condições ambientais (FROMM; LAUTNER, 2007; GALLÉ et al., 2015) como, por exemplo, na regulação das respostas fotossintéticas a diferentes

estímulos (SUKHOV et al., 2015a; SZECHYŃSKA-HEBDA; LEWANDOWSKA; KARPIŃSKI, 2017).

A capacidade de gerar e propagar sinais elétricos entre os diferentes módulos da planta é bem conhecida (VAN BEL et al., 2014; VOLKOV; COLLINS; MWESIGWA, 2000). Diferentes tipos de sinais elétricos em plantas já foram descritos, como potenciais de ação (APs), potenciais de variação (VPs) e potenciais elétricos locais (LEPs), os quais são atividades bioelétricas que envolvem desequilíbrio de íons (Ca^{+2} , K^+ , Cl^-) através das membranas plasmáticas, levando a uma tensão transitória com uma fase de rápida despolarização da membrana celular seguida por uma fase com taxas variáveis de repolarização, dependendo do sinal elétrico induzido (HUBER; BAUERLE, 2016; SUKHOVA; AKINCHITS; SUKHOV, 2017; SZECHYŃSKA-HEBDA; LEWANDOWSKA; KARPIŃSKI, 2017). Além disso, Zimmermann et al., (2009) relataram um sinal elétrico diferente, denominado potencial sistêmico (SPs), induzido após o ferimento da folha, caracterizado por uma hiperpolarização do apoplasto em vez de uma despolarização.

No geral, toda a dimensão elétrica das plantas, incluindo sinalização elétrica e todos os tipos de atividade bioelétrica, como a diferença no potencial de membranas e transporte de elétrons na cadeia de transporte de elétrons, participam dos processos fisiológicos fundamentais na vida das plantas (DE TOLEDO et al., 2019; DEBONO; SOUZA, 2019). Recentemente, Souza et al. (2017) propuseram o conceito de "eletroma vegetal". O termo "eletroma", proposto pela primeira vez por De Loof (2016), pode ser usado para descrever a totalidade das correntes iônicas em diferentes escalas de organização nos sistemas biológicos (de células únicas a todo o organismo). Além disso, é um termo versátil para designar a dimensão elétrica de entidades vivas com base em gradientes de íons, que geram potenciais energéticos (DE LOOF, 2016). Em resumo, o eletroma é a consequência da variação do fluxo de espécies eletricamente carregadas e dos campos elétricos gerados por essas. Nas células vegetais, os fluxos iônicos são predominantemente de íons como H^+ , K^+ , Cl^- , Na^+ e Ca^{+2} , os quais são translocados através das membranas celulares (DE TOLEDO et al., 2019; DEBONO; SOUZA, 2019).

A técnica de eletrografia (EPG), vem sendo utilizada para a captação das alterações do eletroma (PARISE et al., 2021; REISSIG et al., 2021; SARAIVA; FERREIRA; SOUZA, 2017; SIMMI et al., 2020). Estudos realizados recentemente com EPG mostraram que os estímulos ambientais alteram os níveis da complexidade da

dinâmica temporal do eletroma das plantas. Muitas vezes, em situações estressantes, a complexidade do electroma tem mostrado alterações significativas. Além disso, as frequências mais altas registradas antes da aplicação dos estímulos nas plantas desapareceram após a estimulação, permanecendo apenas as frequências mais baixas, o que poderia suportar um baixo custo energético no processo de sinalização (REISSIG et al., 2021; SARAIVA; FERREIRA; SOUZA, 2017; SIMMI et al., 2020; SOUZA et al., 2017).

Assim, estudos baseados na análise das alterações causadas no eletroma vegetal por diferentes tipos de elicitores torna-se uma alternativa atraente a ser pesquisada. Neste contexto, nossa hipótese é que após o reconhecimento de diferentes elicitores (patogênico e o composto sintético AJ) pela planta, ocorram alterações no eletroma, e que essas alterações podem transmitir informações a tecidos distantes do local onde ocorreu a elicitação. Essas alterações do eletroma poderiam ser as precursoras no processo de *priming* em plantas infectadas por fungos patogênicos, uma vez que a propagação dos sinais elétricos ocorre de forma mais rápida que a sinalização química.

Artigo 1

Análise do eletroma de plantas de cevada detecta infecção patogênica dias antes dos primeiros sintomas da doença

Francine Zaiosc Simmi¹; Leandro José Dallagnol²; Rodrigo de Oliveira Almeida³; Keilor da Rosa Dorneles²; Gustavo Maia Souza^{1*}

¹ Laboratório de Cognição e Eletrofisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

² Laboratório de Interação Planta-Patógeno, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Campus Muriaé, Muriaé, MG, Brasil.

*Autor correspondente: gumaia.gms@gmail.com

Resumo - Eletroma vegetal corresponde a atividade bioelétrica das plantas. Assim, a infecção dos tecidos de uma planta por diferentes fungos pode originar diferentes assinaturas elétricas, as quais podem ser utilizadas para identificar o potencial agente patogênico. Neste estudo, avaliamos as variações sistêmicas do eletroma de plantas de cevada desencadeadas pela inoculação na folha de *Blumeria graminis* e *Bipolaris sorokiniana*. Para isso, plantas de cevada, com aproximadamente 50 dias, foram colocadas em gaiola de Faraday sob condições controladas. Um par de eletrodo de agulha foi inserido no colmo da planta para a coleta dos dados bioelétricos. Na mesma planta foi realizada a inoculação com o patógeno na última folha completamente expandida. Cada patógeno foi inoculado em diferentes plantas. Plantas expostas aos mesmos procedimentos das inoculadas, mas sem a presença do fungo, serviram como controles. O eletroma foi monitorado continuamente 48 horas, sendo 24 horas antes e 24 horas após a aplicação dos tratamentos (patógenos e controles). Os dados bioelétricos coletados, foram analisados na forma de séries temporais e passaram pelas seguintes análises: Estatística descritiva, Análise Bayesiana de Mudança de Ponto (BCP), Entropia Aproximada (ApEn) e Autocorrelação. Os resultados dessas análises foram utilizados como atributos, formando assim o *dataset* utilizado no aprendizado de máquinas (análise de clusterização). Os resultados revelam que a inoculação com os fungos patogênicos culminou na maior variação do eletroma (VE)

em relação ao controle (inoculação simulada). A inoculação com os patógenos gerou peculiaridades na distribuição de VE ao longo do tempo para cada patógeno. Assim, a inoculação com *B. graminis* ou *B. sorokiniana* gerou uma assinatura elétrica específica do patógeno com a qual é possível identificar a presença do patógeno na planta nos primeiros minutos após o contato dele com a superfície do hospedeiro.

1 Introdução

As plantas respondem de forma rápida à maioria dos microrganismos que entram em contato com seus tecidos. No caso de potenciais patógenos, o sistema imune da planta responde ao ataque local com uma série de reações de sinalização e defesa que incluem rápido influxo/efluxo de diferentes íons (BOLLER, 1995; FELLE et al., 2004, 2008; NÜRNBERGER et al., 2004), fosforilação de proteínas, produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SHEN et al., 2017) e despolarização das membranas celulares (FELLE et al., 2004).

A geração e propagação de sinais elétricos, aparentemente, reflete uma disposição básica das células vegetais. Uma vez que são observados como uma dinâmica de variação de voltagem da membrana, são gerados pelo desequilíbrio transitório do potencial de membrana, causado pelo influxo/efluxo de íons e H^+ por canais iônicos, transportadores de membrana plasmática e bombas eletrogênicas (de TOLEDO et al., 2019; FROMM; LAUTNER, 2007; SUKHOV et al., 2015; VODENEEV; KATICHEVA; SUKHOV, 2016; ZIMMERMANN et al., 2009).

A sinalização elétrica em plantas vem sendo o objetivo de inúmeros estudos, demonstrando sua participação na indução de respostas fisiológicas sistêmicas precoces após ações locais de diferentes fatores de estresses em potencial (SUKHOV et al., 2019; FROMM et al., 2007; GALLÉ et al., 2015; VODENEEV et al., 2015; CHOI et al., 2016; SUKHOV et al., 2016; SUKHOVA et al., 2017; SUKHOVA et al., 2021). A maioria dos estudos sobre eletrofisiologia vegetal concentram-se em sinais elétricos individuais, geralmente potenciais de ação (APs) e potenciais de variação (VPs), de uma ou poucas células. No entanto, um estímulo pode desencadear mais de um tipo de sinal elétrico. Assim, o estudo de sinais específicos poderia subestimar a complexidade de sinais elétricos sobrepostos que operam simultaneamente e que geram uma rede de informações sistêmicas onde muitos sinais estão dispostos em camadas no tempo e no espaço (de LOOF, 2016; DEBONO; SOUZA, 2019; SOUZA

et al., 2017). Neste contexto, De Loof (2016) propôs o termo “eletroma”, que corresponde a totalidade das correntes iônicas de qualquer entidade viva, desde a célula até o nível de todo o organismo. Analogamente, foi proposto o termo “eletroma vegetal”, que corresponde à atividade bioelétrica das plantas medida como alterações de microtensão em tecidos estimulados ou não estimulados (DE TOLEDO et al., 2019; SARAIVA; FERREIRA; SOUZA, 2017). Estudos realizados recentemente têm mostrado que, através da análise do eletroma por técnicas de análise de séries temporais e, especialmente, por métodos de aprendizado de máquina, é possível diagnosticar diferentes tipos de estresses em plantas (tanto abióticos quanto bióticos) (PARISE et al., 2021; PEREIRA et al., 2018; REISSIG et al., 2021; SIMMI et al., 2020).

Recentemente foi demonstrado que a infecção de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) pelo fungo *Oidium neolycopersici*, um patógeno biotrófico, gerou alterações detectáveis precocemente na dinâmica do eletroma das plantas, e que essas alterações podem estar envolvidas na sinalização de longa distância durante a interação planta-patógeno (SIMMI et al., 2020). Considerando o grande número de microrganismos com os quais as plantas entram em contato durante o seu crescimento e desenvolvimento, seria esperado que a atividade elétrica das plantas mudasse dependendo do tipo da relação parasitaria, seja ele biotrófico, hemibiotrófico ou necrotrófico.

Neste sentido, no presente estudo, monitoramos as variações sistêmicas (distante do tecido estimulado) do eletroma de plantas de cevada após a inoculação de uma única folha com o fungo patogênico biotrófico *Blumeria graminis* ou com o fungo patogênico hemibiotrófico *Bipolaris sorokiniana*. Com o objetivo de avaliar se a infecção de uma única folha com estes fungos patogênicos transmite sinais elétricos sistêmicos para o restante da planta, diferentes técnicas de exploração de dados e classificação de sinais eletrofisiológicos foram utilizadas.

2 Material e Métodos

2.1 Condições de crescimento de plantas e fungos, e inoculação das plantas

Plantas de cevada (*Hordeum vulgare* L.) da cultivar BRS Cauê (Embrapa®) foram utilizadas nos experimentos. Para tal, sementes foram desinfestadas superficialmente e após semeadas em vasos plásticos contendo aproximadamente 1

kg de substrato comercial (Turfa Fértil). Em cada vaso foi cultivado uma planta. Os vasos contendo as plantas foram mantidos em casa de vegetação sob luz natural e temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, até atingirem o estágio fenológico 7 da escala de Feekes-Large (LARGE, 1954). Após, as plantas foram levadas ao Laboratório de Cognição e Eletrofisiologia Vegetal (LACEV) para aclimação antes do início das sessões experimentais. No laboratório, as plantas foram mantidas durante 8 dias a uma temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas, com irradiância de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para que todas as plantas estivessem com a mesma idade fenológica no momento da coleta dos dados bioelétricos, a semeadura foi realizada em lotes, com uma diferença de quatro dias entre cada lote.

Dois fungos foram utilizados para a realização do experimento. O agente causal do oídio da cevada, o fungo *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, o qual estabelece uma relação parasitária do tipo biotrófica, e o agente causal da mancha marrom da cevada, o fungo *Bipolaris sorokiniana*, o qual tem relação parasitária do tipo hemibiotrófica.

O inóculo de *B. graminis* foi obtido de plantas de cevada naturalmente infectadas com o patógeno, provenientes da área experimental da Universidade Federal de Pelotas, campus Capão do Leão (Rio Grande do Sul), e mantido por repicagem periódica em plantas de cevada da cultivar BRS Cauê. A inoculação foi realizada por meio do contato direto de folhas sintomáticas (coberta por micélio, conidióforos e conídios do fungo) com a superfície da folha da planta sadia. Após a inoculação, as plantas foram mantidas sob temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

O isolado (LIPP_BITA01) do fungo *B. sorokiniana* foi utilizado nos experimentos. O fungo foi isolado de sementes de cevada naturalmente infectadas, e sua patogenicidade foi comprovada em plantas de cevada da cultivar BRS Cauê. O fungo foi mantido em BOD com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 10 dias. Após, os conídios foram removidos do substrato com auxílio de um pincel de cerdas macias e 5 ml de água destilada contendo 0,05% de Tween 20 (polioxietileno sorbitan monolaurato, Sigma Chemical Co). A suspensão resultante foi filtrada por gaze e o número de conídios contados em hemocitômetro (Improved Neubauer 1/400 SQ. 1/10 mm deep ultraplane), sendo a concentração final ajustada para 2×10^4 conídios/ml. Imediatamente após o preparo da suspensão de esporos foi realizada a inoculação das plantas por meio de pulverização utilizando um borrifador manual. Toda a superfície da folha foi completamente coberta pela pulverização, mas

sem que ocorresse o escoamento superficial. As plantas foram mantidas em câmara úmida durante 24 horas antes e 48 horas após a inoculação, com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 85%.

2.2 Desenho experimental e tratamentos

Para a realização do experimento, dois dias antes do início de cada sessão experimental, quatro plantas de cevada foram transferidas da casa de vegetação para o Laboratório de Cognição e Eletrofisiologia Vegetal (LACEV) para aclimação destas às condições do ambiente.

A aplicação dos tratamentos e a coleta dos dados bioelétricos foram realizadas na mesma planta (planta principal). Para a aplicação dos tratamentos, foi realizado o isolamento da última folha completamente expandida da planta principal. Para isso, utilizou-se um saco plástico de polietileno, o qual foi colocado sobre a planta, deixando de fora apenas a folha onde realizou-se a aplicação dos tratamentos. A parte superior do saco plástico ficou aberta para permitir as trocas gasosas e para que o restante da planta ficasse exposta a umidade semelhante à da folha onde foram aplicados os tratamentos (Figura 1). A coleta dos dados bioelétricos foi realizada através de eletrodos de agulha inseridos no colmo da planta.

Neste experimento, quatro diferentes tratamentos foram aplicados: T1 - inoculação simulada (toque na folha); T2 - inoculação com *Blumeria graminis*; T3 - inoculação simulada (aplicação de água com Tween 20%), e T4 - inoculação com suspensão de esporos de *Bipolaris sorokiniana*. Para cada tratamento, foram realizadas cinco sessões experimentais, cada uma com quatro plantas simultaneamente, totalizando 20 plantas por tratamento. O desenho experimental, de forma geral, está representado na Figura 1.

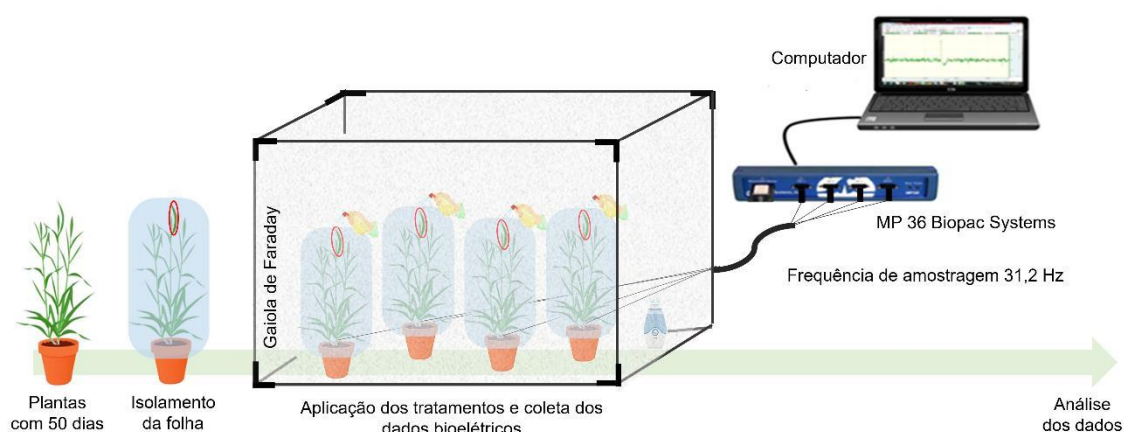


Figura 1. Representação esquemática da montagem experimental. Plantas de cevada com 50 dias após a semeadura foram utilizadas para a realização do experimento. Foi realizado o isolamento da última folha completamente expandida da planta principal, e para isso foi colocado um saco plástico sobre a planta, deixando de fora somente a folha onde foi realizada a aplicação dos tratamentos. Em cada sessão experimental, foram coletados, simultaneamente, os dados bioelétricos de quatro plantas. A coleta dos dados foi realizada antes e após a aplicação dos tratamentos, cobrindo um total de 48 horas. A aplicação dos tratamentos e captação dos dados bioelétricos foram realizados dentro de uma Gaiola de Faraday. Para o fungo *B. sorokiniana* foi formado uma câmara úmida dentro da Gaiola de Faraday.

2.3 Aquisição dos dados bioelétricos

Um dia antes do início da captação dos sinais bioelétricos, eletrodos de agulha (modelo EL452; Biopac Systems, Goleta, CA, EUA) foram inseridos no colmo das plantas a dois centímetros acima do nível do substrato para aclimação. Essa aclimação prévia às medidas é necessária, pois a inserção dos eletrodos na planta induz potenciais de ação e flutuações na variação de potencial local que, após um período de estabilização desaparecem em algumas horas (VOLKOV; HAACK, 1995). A captação dos dados foi realizada dentro de um dispositivo de blindagem eletrostática (Gaiola de Faraday) devidamente aterrada para evitar interferência da rede elétrica do laboratório. Para captação dos sinais foi utilizado o sistema eletrônico de aquisição de dados MP36 (Biopac Systems, Goleta, CA, EUA) com alta impedância de entrada (20 GHz). O protocolo escolhido para a captação dos dados foi o Eletrocardiograma (ECG-AHA). Foi usado um filtro *high-pass* de 0,5 Hz. Não usamos nenhum filtro *low-pass*. Além disso foi adotado um *band-stop* de 60 Hz em todos os canais, para evitar os ruídos dos componentes eletrônicos. A frequência de amostragem usada foi de 31,25 Hz e um ganho (amplificação) de 1000 vezes. Os dados coletados foram analisados como séries temporais com variação de microtensão (μV) $\Delta V = \{\Delta v_1,$

$\Delta v_2, \dots, \Delta v_N$, onde Δv_i é a diferença de potencial entre os eletrodos inseridos nas plantas, pontuada em cada intervalo de tempo, e N é o comprimento total da série.

A coleta dos dados foi realizada 24 horas antes da aplicação dos tratamentos e 24 horas após a aplicação dos tratamentos, cobrindo um total de 48 horas. Esse período de amostragem foi baseado em estudo realizado anteriormente por Simmi et al. (2020).

2.4 Análise dos dados

2.4.1 Pré-processamento dos dados

Através de análise visual, os dados coletados pelo MP36 foram separados em diferentes arquivos (txt), sendo selecionados apenas as séries temporais que apresentavam variações nos dados, totalizando 13 plantas (repetições) por tratamento.

Com base no menor arquivo, as séries temporais foram ajustadas de forma a terem a mesma quantidade de instâncias. Em seguida, foi realizada a conversão da leitura dos dados (24 horas) em segundos, obtendo assim 28 pontos de leitura por segundo. Após esse procedimento, as informações Tempo (Hora/Minuto/Segundo), Tratamento (T1 a T4), Planta (repetições do experimento) e *Status* (Antes/Depois) foram devidamente adicionados ao conjunto de dados. *Outliers* foram removidos dentro de cada tempo/segundo (cada segundo contendo 28 entradas) e deste conjunto de dados resultante foram selecionados somente os dados inferiores a 12h, 00m, 00s. Ao final, foi obtida uma tabela geral com 4.623.426 linhas e 7 colunas (Horas, Minutos, Segundos, Tratamento, Planta, *Status*, *M_Value*), a qual foi utilizada nas análises.

2.4.2 Análise Bayesiana de Mudança de Pontos (BCP), Entropia Aproximada, Autocorrelação e Análise de Clusterização

Após a geração da tabela geral, os dados foram alterados para trabalhar com a média das leituras/minuto, sendo o atributo 'Plantas' considerado como repetições dentro dos tratamentos. Além disso, foi criado o *status* DmA, referente a subtração dos valores de D por A (Depois e Antes da aplicação dos tratamentos,

respectivamente), de forma a complementar o atributo *Status*. De modo a verificar a integridade dos dados e gerar atributos para o processo de aprendizado de máquina, aplicou-se a estatística descritiva para obtenção de média, desvio padrão, curtose e assimetria). Em seguida, os dados foram submetidos à análise Bayesiana de Mudança de Ponto (*Bayesian Change Point* - BCP) utilizando o R package *bcp* (WANG et al., 2018), onde pode-se estimar a probabilidade de um ponto de mudança em um intervalo e dois conjuntos de dados, para quantificar a regularidade ou previsibilidade das séries temporais foi aplicada a Entropia Aproximada (*Approximate Entropy* - ApEn), utilizando o R package e Autocorrelação foi realizada para encontrar padrões de repetição no domínio do tempo, utilizando o R package.

Os resultados destas análises foram utilizados como atributos, formando assim o *dataset* a ser trabalhado no aprendizado de máquinas (análise de clusterização) para classificação automática dos tratamentos. Foram aplicados 3 algoritmos de clusterização (*kmeans*, *kmodes* e *birch*, todos em modo *default*). Com base nas métricas *Davies-Bouldin score* e *Silhouette score*, o algoritmo *Kmeans* foi selecionado devido a sua melhor performance, indicando assim a presença de dois clusters (material suplementar).

Ao final, os resultados obtidos de T1 e T3 (controles sem inoculação de patógenos) foram agrupados como um só *dataset* e, após considerar os clusters coincidentes, renomeado para tratamento T5 (controle geral).

3 Resultados

3.1 Alterações no eletroma captadas por diferentes análises

Analisando de forma visual a distribuição dos eletromas ao longo do tempo, pode-se perceber que existem diferenças qualitativas entre os dados do antes e do depois da aplicação dos tratamentos (Figura 2). Isso é mais visível nos tratamentos onde foi realizada a inoculação da folha isolada com os fungos patogênicos (Figura 2 B e D). Essas diferenças também foram captadas nas análises Bayesiana de mudança de pontos (BCP), entropia aproximada (ApEn) e Autocorrelação.

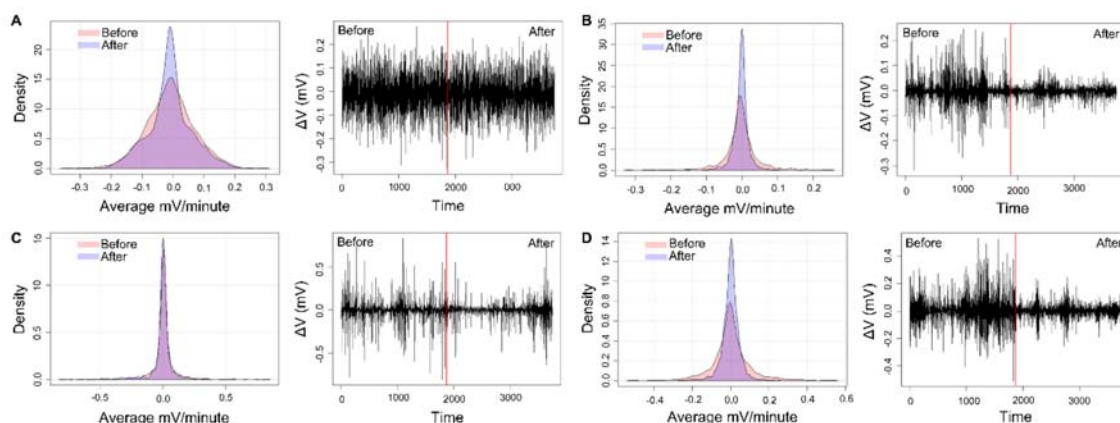


Figura 2. Representação gráfica da distribuição dos eletromas antes e após a aplicação dos tratamentos, através da densidade pela média de milivolts por minuto, e a representação visual da série temporal antes e após a aplicação dos tratamentos divididos pela linha vermelha. A) T1 inoculação simulada (toque na folha); B) T2 inoculação com *Blumeria graminis*; C) T3 inoculação simulada (aplicação de água com Tween 20%) e D) T4 inoculação com suspensão de esporos de *Bipolaris sorokiniana*.

Através da análise de BCP é possível ver variações no eletroma na ‘*posterior probability*’ (probabilidade de mudança na média) justamente na região onde as médias a posteriori (‘*posterior means*’) apresentam grandes alterações (‘picos’ e ‘vales’). Essas variações são mais visíveis nos tratamentos onde foi realizada a inoculação das plantas com fungos patogênicos. Em média, a entropia aproximada (ApEn) diminuiu após a inoculação da folha com *B. graminis*, indicando uma diminuição da complexidade (irregularidade) dos sinais e um aumento da organização (em termos de regularidade). Já a inoculação com *B. sorokiniana* promoveu um aumento na média da ApEn, indicando um aumento da complexidade e redução da organização. Após a inoculação das plantas com os fungos patogênicos é possível ver um aumento na função de Autocorrelação. Já para os tratamentos controle, pode-se observar que ambos produzem resultados similares. De fato, tal resultado seria esperado, uma vez que ambos os tratamentos utilizam apenas inoculação simulada (material suplementar).

Os resultados gerados na análise Bayesiana de mudança de pontos (BCP), entropia aproximada (ApEn) e Autocorrelação foram utilizados na análise de cluster, onde as alterações encontradas no eletroma (VE: variação de voltagem altas ou baixas do eletroma) foram classificadas em cluster 0 (em amarelo) e o restante dos dados classificados (eletroma sem variação) como cluster 1 (em azul) (Figura 3).

Ao analisar os dados clusterizados dos atributos Antes, Depois e do Depois - Antes, pode-se notar que os dados coletados Depois da aplicação dos tratamentos

detêm maior relevância em todos os tratamentos, mostrando maiores quantidades de VE. Além disso, quando se realizou a inoculação simulada das plantas (tratamentos 1 e 3) pode-se observar que ambos produziram resultados próximos, com variações muito similares entre eles, tanto no momento antes quanto no momento depois em todas as análises realizadas (material suplementar). Diante disso, criou-se o controle geral, conforme relatado no material e métodos.

Observando a formação do eletroma ao longo do tempo, nota-se a presença de VE em todos os tratamentos, com maior destaque para os tratamentos onde foram realizadas as inoculações com os fungos patogênicos (Figura 3). A inoculação com *B. graminis* ou *B. sorokiniana* culminou com a formação de 139 e 144 VEs, respectivamente, contrastando com o tratamento controle geral (inoculação simulada), no qual formou apenas 29 VEs no total. Apesar dos tratamentos onde foi realizada a inoculação com os patógenos apresentarem comportamentos similares ao longo do tempo, pode-se perceber peculiaridades na distribuição de VEs dentro de cada tratamento (Figura 3 e 4).

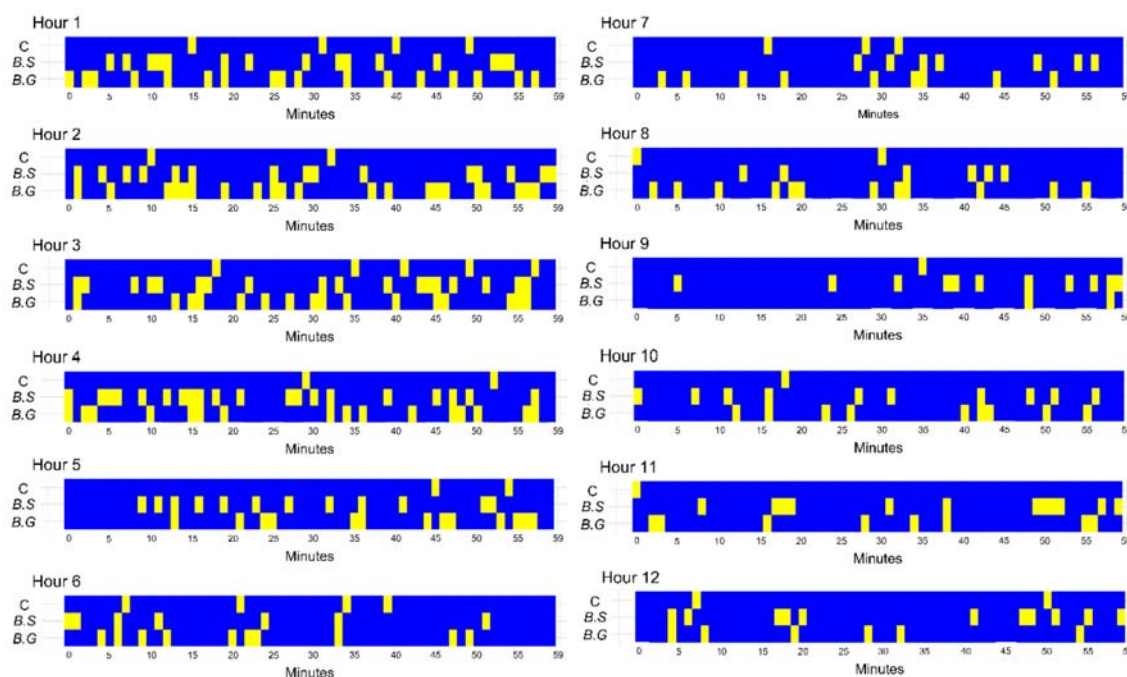


Figura 3. Distribuição dos eletromas do atributo depois da aplicação dos tratamentos ao longo do tempo, gerado pela análise de cluster. Onde as alterações encontradas no eletroma (VE: variação do eletroma) foram classificadas em cluster 0 (em amarelo) e o restante dos dados (eletroma sem variação) classificados como cluster 1 (em azul). C – Controle geral; B.S – *Bipolaris sorokiniana*; B.G – *Blumeria graminis*.

É possível notar que a inoculação com *B. graminis* promoveu o surgimento de VEs no instante logo após a inoculação da folha isolada com o patógeno. Ademais,

percebe-se que a quantidade de VEs é mais intensa nas primeiras 5 horas após a inoculação, com destaque na hora 2, onde encontra-se a maior quantidade de VEs (21). A partir deste horário, há um decréscimo no total de VEs, oscilando em torno de 10 unidades/hora (Figuras 3 e 4). Além disso, pode-se notar que 8-9 horas após a inoculação, ocorre um pequeno aumento no número de VEs, mas que logo decai novamente (Figura 6).

Já na inoculação com a *B. sorokiniana* (T4), notamos o surgimento de VEs 5 minutos após a inoculação da folha com o patógeno. Assim como na inoculação com *B. graminis*, a maior quantidade de VEs ocorre nas primeiras 5 horas após a inoculação, com maior destaque na hora 4 (contendo 20 VEs). A partir deste horário ocorreu uma queda na quantidade de VEs, oscilando em torno de 10 unidades/hora (Figuras 3 e 4). Apesar disso, pode-se notar que 9 horas após a inoculação, tem-se um leve aumento no número de VEs, os quais se mantêm até o final da leitura.

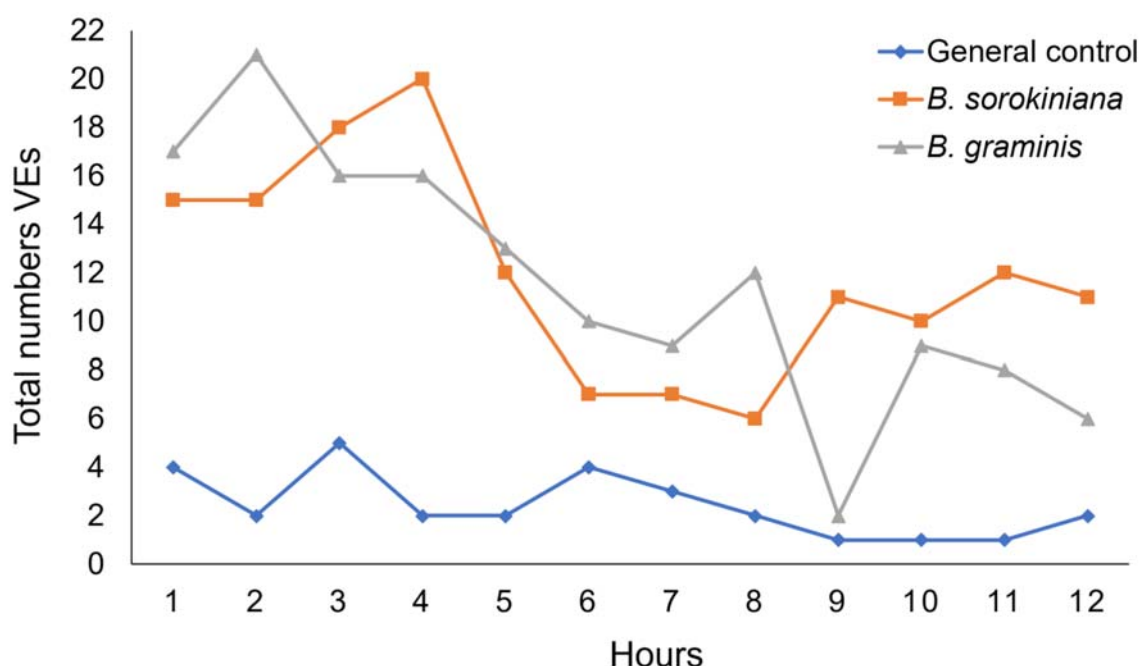


Figura 4. Distribuição do número total de variações no eletrograma (VEs) do atributo depois da aplicação dos tratamentos ao longo do tempo para os tratamentos: Controle geral, *B. graminis* e *B. sorokiniana*.

3.2 Avaliação das doenças

Os sintomas do oídio, doença causada por *B. graminis*, foram verificados a partir de 96 horas após a inoculação, como um crescimento pulverulento esbranquiçado indicando a presença de micélio e início da formação das estruturas reprodutivas do fungo na superfície da folha inoculada. Nas plantas inoculadas com

B. sorokiniana foi observado pequenas lesões de coloração marrom circundadas por um halo clorótico às 24 horas após a inoculação (Figura 5). Os sintomas descritos são os típicos para as doenças causadas pelos patógenos utilizados indicando o sucesso na infecção do patógeno e a suscetibilidade da cultivar utilizada.



Figura 5. Primeiros sintomas visíveis das doenças causados pelos patógenos usados no estudo. A) Primeiros sintomas visuais da mancha marrom causada por *Bipolaris sorokiniana* 24 horas após a inoculação da folha de cevada. B) Primeiros sintomas visuais do oídio causada por *Blumeria graminis* 96 horas após a inoculação da folha de cevada.

4 Discussão

A interação entre plantas e patógenos passa por diferentes estágios, começando com o primeiro contato do agente patogênico com a superfície do hospedeiro. No caso de fungos, desde o primeiro momento do contato, pode ocorrer a sinalização interativa com a planta (FELLE et al., 2008; ŁAŻNIEWSKA; MACIOSZEK; KONONOWICZ, 2012). Os resultados do nosso estudo indicam que isso foi captado pelas análises realizadas no eletroma. Uma vez que no minuto inicial após a inoculação da folha de cevada com *B. graminis* e no minuto 5 após a inoculação com *B. sorokiniana*, consideráveis mudanças no eletroma são detectadas em tecidos distantes de onde ocorreu a inoculação. Isso indica que o primeiro contato

entre fungos e hospedeiro geram sinais sistêmicos e que através da análise do eletroma é possível detectar a presença do patógeno na planta bem antes do surgimento dos primeiros sintomas visuais das doenças, os quais se tornaram visíveis apenas 24 horas após a inoculação com *B. sorokiniana* e 96 horas após a inoculação com *B. graminis*. Além disso, a inoculação com *B. graminis* ou *B. sorokiniana* geram uma assinatura elétrica específica para cada patógeno como evidenciado nas análises de entropia aproximada, BCP e comprovado na análise de cluster.

Nossas medidas contínuas do eletroma revelam que a inoculação com *B. graminis* ou *B. sorokiniana* promoveram peculiaridades na quantidade e na distribuição de VE dentro de cada tratamento (Figuras 4 e 5), que podem estar relacionadas ao estilo de vida dos patógenos utilizados em nosso modelo de estudo. Enquanto, o *B. graminis* é um patógeno biotrófico, cujo estilo de vida depende de células vivas, desenvolve um apressório para auxiliar na penetração direta na cutícula e na parede celular epidérmica e, finalmente, forma um haustório para se alimentar da célula viva do hospedeiro (PHAM et al., 2019). Já o *B. sorokiniana* é um patógeno hemibiotrófico. Nas interações compatíveis cevada - *B. sorokiniana*, precocemente o fungo desenvolve uma fase biotrófica distinta localizada na epiderme, a qual é seguida de uma fase necrotrófica localizada no mesofilo, que pode ser suportada pela produção de compostos tóxicos à célula vegetal (SCHÄFER; HÜCKELHOVEN; KOGEL, 2004).

O maior número de VEs registrados 2 horas após a inoculação da folha de cevada com *B. graminis* corresponde ao momento da formação do tubo germinativo primário (AHMED; PEDERSEN; THORDAL-CHRISTENSEN, 2016) e esse aumento no número de VEs, pode estar relacionado ao primeiro contato da planta com efetores do patógeno (SCHMIDT et al., 2014). Assim como o maior número de VEs registrados 4 horas após a inoculação da folha de cevada com *B. sorokiniana* coincide como a germinação dos conídios na superfície da folha (ACHARYA; DUTTA; PRADHAN, 2011), podem ser resultado da ação de toxinas liberadas pelo fungo no local de infecção (HAN et al., 2010; JANSSON; ÅKESSON, 2002). Além disso, Felle et al., (2008) registrou, em um estudo utilizando microssondas íon-seletivas, às 2 e 4 horas após a inoculação com *B. graminis* ou *B. sorokiniana*, um rápido e transitório aumento do pH e do Ca^{2+} apoplástico e a diminuição do pH e do Ca^{2+} citoplasmático. Como se sabe, a ativação do influxo de Ca^{2+} é o primeiro evento mensurável que leva a ativação de canais iônicos ou desativação da H^+ ATPase da membrana plasmática que, em

ambos os casos, leva a despolarização da membrana (FELLE et al., 2004). Ademais, os pequenos aumentos nos números de VEs registrados 8-10 horas após a inoculação com *B. graminis*, e 9 horas após a inoculação com *B. sorokiniana*, podem estar relacionados com o avanço dos patógenos no tecido vegetal, uma vez que se sabe que neste momento ocorre a formação do peg de penetração em *B. graminis* (AHMED; PEDERSEN; THORDAL-CHRISTENSEN, 2016; HANSJAKOB; RIEDERER; HILDEBRANDT, 2012). O peg de penetração é a estrutura envolvida na penetração na cutícula e na parede celular do hospedeiro, o que interfere na membrana plasmática e com isso tem-se alterações no número de VEs. Já para o fungo *B. sorokiniana*, o evento de aumento de VEs às 9 horas após a inoculação pode estar ligado à mudança da fase biotrófica para a fase de colonização necrotrófica. Essa mudança de fase foi registrada 8 horas após a formação do apressório na junção da parede celular epidérmica, e a partir daí hifas do fungo partindo das células inicialmente infectadas entram nas células adjacentes, resultando na morte celular epidérmica e mesofílica (ACHARYA; DUTTA; PRADHAN, 2011). O colapso das células hospedeiras é causado pela secreção de toxinas que provocam resposta necrótica indistinguível nas folhas do hospedeiro (KUMAR et al., 2001).

Assim, podemos inferir que todos esses eventos registrados no eletroma das plantas de cevada após a inoculação da folha com os patógenos geraram alterações no eletroma, e que essas alterações foram transmitidas a tecidos distantes de onde ocorreu o contato inicial com os patógenos, uma vez que a inoculação foi realizada na folha e os sinais elétricos foram coletados no colmo das plantas. Esses resultados sugerem que o eletroma possui um envolvimento na transmissão de forma rápida de informações sistêmicas sobre a presença de um patógeno, conforme detectado pela primeira vez em Simmi et al (2020). Além disso, destacamos que a inoculação com *B. graminis* ou *B. sorokiniana* gerou uma assinatura elétrica específica para cada patógeno e que através da análise dessa assinatura é possível identificar diferentes tipos de patógeno na planta.

5 Conclusões

A inoculação de uma folha de cevada com *B. graminis* ou *B. sorokiniana*, transmitiu sinais elétricos sistêmicos. Isso mostra que os sinais elétricos estão presentes na transmissão de informações durante a interação planta-patógeno. Além

disso, os sinais elétricos podem ser um dos sinais precursores transmitidos a tecidos sistêmicos como forma de alerta sobre a presença de um possível ataque patogênico, uma vez que o maior número de VEs foi registrado logo após a inoculação das plantas. Também percebemos que o comportamento do eletroma foi diferente para cada tratamento, mostrando assim, que a planta responde bioeletricamente de forma diferente a diferentes tipos de estímulo.

Material suplementar:

<https://drive.google.com/drive/folders/1MZNtnv1Y0kHp8hCx2hvhCNvFqF4ug7lc?usp=sharing>

Referências bibliográficas

- ACHARYA, K.; DUTTA, A. K.; PRADHAN, P. Bipolaris sorokiana (Sacc .) Shoem .: The most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas warmer areas. **Australian Journal of Crop Science**, n. January, p. 1064–1071, 2011.
- AHMED, A. A.; PEDERSEN, C.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. The barley powdery mildew effector candidates CSEP0081 and CSEP0254 promote fungal infection success. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–12, 2016.
- BOLLER, T. Chemoperception of microbial signals in plant cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 46, p. 189–214, 1995.
- DE LOOF, A. The cell's self-generated “electrome”: The biophysical essence of the immaterial dimension of Life? **Communicative & Integrative Biology**, v. 9, n. 5, p. e1197446, 2016.
- DE TOLEDO, G. R. A. et al. Plant electrome: the electrical dimension of plant life. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 31, n. 1, p. 21–46, 2019.
- DEBONO, M. W.; SOUZA, G. M. Plants as electronic plastic interfaces: A mesological approach. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 146, p. 123–133, 2019.
- FELLE, H. H. et al. Apoplastic pH signaling in barley leaves attacked by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 1, p. 118–123, 2004.
- FELLE, H. H. et al. Interactive signal transfer between host and pathogen during successful infection of barley leaves by *Blumeria graminis* and *Bipolaris sorokiniana*.

- Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 52–59, 2008.
- FROMM, J.; LAUTNER, S. Electrical signals and their physiological significance in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, n. 3, p. 249–257, 2007.
- HAN, Q. et al. Cytological study of wheat spike infection by *bipolaris sorokiniana*. **Journal of Phytopathology**, v. 158, n. 1, p. 22–29, 2010.
- HANSJAKOB, A.; RIEDERER, M.; HILDEBRANDT, U. Appressorium morphogenesis and cell cycle progression are linked in the grass powdery mildew fungus *Blumeria graminis*. **Fungal Biology**, v. 116, n. 8, p. 890–901, 2012.
- JANSSON, H.-B.; ÅKESSON, H. Costs of secondary parasitism in the facultative hyperparasitoid *Pachycrepoideus dubius*: Does host size matter? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 103, n. 3, p. 239–248, 2002.
- KUMAR, J. et al. A compromised Mlo pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. **Phytopathology**, v. 91, n. 2, p. 127–133, 2001.
- LARGE, E. C. Illustration of the Feekes Scale. **Plant Pathology**, v. 3, n. 4, p. 128–129, 1954.
- ŁAŻNIEWSKA, J.; MACIOSZEK, V. K.; KONONOWICZ, A. K. Plant-fungus interface: The role of surface structures in plant resistance and susceptibility to pathogenic fungi. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 24–30, 2012.
- NÜRNBERGER, T. et al. Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 249–266, 2004.
- PARISE, A. G. et al. Detection of Different Hosts From a Distance Alters the Behaviour and Bioelectrical Activity of *Cuscuta racemosa*. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. March, p. 1–21, 2021.
- PEREIRA, D. R. et al. Automatic classification of plant electrophysiological responses to environmental stimuli using machine learning and interval arithmetic. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 145, n. August 2017, p. 35–42, 2018.
- PHAM, T. A. T. et al. Analysis of cell wall synthesis and metabolism during early germination of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* conidial cells induced in vitro. **Cell Surface**, v. 5, n. February, p. 100030, 2019.
- REISSIG, G. N. et al. Fruit Herbivory Alters Plant Electrome: Evidence for Fruit-Shoot Long-Distance Electrical Signaling in Tomato Plants. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, n. July, p. 1–14, 2021.
- SARAIVA, G. F. R.; FERREIRA, A. S.; SOUZA, G. M. Osmotic stress decreases

- complexity underlying the electrophysiological dynamic in soybean. **Plant Biology**, v. 19, n. 5, p. 702–708, 2017.
- SCHÄFER, P.; HÜCKELHOVEN, R.; KOGEL, K. H. The white barley mutant Albostrans shows a supersusceptible but symptomless interaction phenotype with the hemibiotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 4, p. 366–373, 2004.
- SCHMIDT, S. M. et al. Interaction of a *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* effector candidate with a barley ARF-GAP suggests that host vesicle trafficking is a fungal pathogenicity target. **Molecular Plant Pathology**, v. 15, n. 6, p. 535–549, 2014.
- SHEN, Y. et al. The early response during the interaction of fungal phytopathogen and host plant. **Open Biology**, v. 7, n. 5, 2017.
- SIMMI, F. Z. et al. Electrome alterations in a plant-pathogen system: Toward early diagnosis. **Bioelectrochemistry**, v. 133, p. 107493, 2020.
- SOUZA, G. M. et al. Plant “electrome” can be pushed toward a self-organized critical state by external cues: Evidences from a study with soybean seedlings subject to different environmental conditions. **Plant signaling & behavior**, v. 12, n. 3, p. e1290040, 2017.
- SUKHOV, V. et al. Variation potential induces decreased PSI damage and increased PSII damage under high external temperatures in pea. **Functional Plant Biology**, v. 42, n. 8, p. 727–736, 2015.
- VODENEEV, V. A.; KATICHEVA, L. A.; SUKHOV, V. S. Electrical signals in higher plants: Mechanisms of generation and propagation. **Biophysics**, v. 61, n. 3, p. 505–512, 2016.
- VOLKOV, A. G.; HAACK, R. A. Insect-induced bioelectrochemical signals in potato plants. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 37, n. 1, p. 55–60, 1995.
- ZIMMERMANN, M. R. et al. System Potentials, a Novel Electrical Long-Distance Apoplastic Signal in Plants, Induced by Wounding. **Plant Physiology**, v. 149, n. 3, p. 1593–1600, 2009.

Artigo 2

Elicitação local e possíveis alterações sistêmicas durante o processo de aquisição de *priming* em plantas de cevada

Francine Zaiosc Simmi¹; Leandro José Dallagnol²; Rodrigo de Oliveira Almeida³;
Gustavo Maia Souza^{1*}

¹ Laboratório de Cognição e Eletrofisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: francinezsimm@gmail.com.

² Laboratório de Interação Planta-Patógeno, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Campus Muriaé, Muriaé, MG, Brasil.

*Autor correspondente: gumaia.gms@gmail.com

Resumo – O *priming* de defesa é um processo que permite que as plantas respondam de forma mais rápida e intensa a estresses subsequentes. Esse processo envolve diferentes mecanismos moleculares de percepção e transdução de sinais. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar se a eliciação local com ácido jasmônico ou *Bipolaris sorokiniana* causam mudanças no eletroma em tecidos distantes, auxiliando no processo de aquisição de *priming*. Além disso, foram analisados os efeitos fisiológicos sistêmicos causados pela eliciação local, nos mecanismos de defesa ligados ao estresse oxidativo. Para isso, plantas de cevada com aproximadamente 50 dias foram colocadas sob condições controladas. Um par de eletrodos de agulha foi colocado no colmo da planta principal para a coleta dos dados bioelétricos. Na mesma planta, foi realizado a primeira aplicação dos tratamentos na última folha completamente expandida. 48 horas após a primeira aplicação foi realizada a segunda aplicação dos tratamentos em toda a planta (planta principal e perfilhos). O eletroma foi monitorado continuamente por 24 horas antes da primeira aplicação dos tratamentos, 48 horas após a primeira aplicação e 24 horas após a segunda aplicação dos tratamentos. A coleta dos seguimentos foliares para a realização das análises histoquímicas foram realizadas 2, 5, 8, 24 e 48 horas após a primeira aplicação dos tratamentos. Os dados bioelétricos coletados, foram analisados na forma de séries temporais e passaram pelas seguintes análises: Estatística descritiva, Análise

Bayesiana de Mudança de Ponto (BCP), Entropia Aproximada (ApEn) e Autocorrelação. Os resultados dessas análises foram utilizados como atributos, formando assim o *dataset* utilizado no aprendizado de máquinas (análise de clusterização). Os dados das análises histoquímicas foram avaliados pela ANOVA. O resultado das diferentes análises realizadas no eletroma foram inconclusivas. Os resultados das análises histoquímicas revelaram que aplicação local de AJ e *B. sorokiniana* causam alterações na expressão local e sistêmica (longe do local da aplicação) nos mecanismos de defesa ligados ao estresse oxidativo, bem como reduziram drasticamente a infecção causada pela segunda inoculação com *B. sorokiniana*. Assim, podemos concluir que aplicação local de AJ e *B. sorokiniana* induz sinalização sistêmica que desencadeia o *priming* em tecidos sistêmicos. No entanto, novas análises do eletroma são necessárias para revelar se os sinais elétricos estão presentes neste processo.

1 Introdução

As plantas possuem mecanismos intrínsecos de defesa contra patógenos e, como parte da evolução, adquiriram a capacidade de responder de forma mais rápida e intensa a estresse subsequentes quando expostas previamente a um estímulo. Esse estado de condicionamento da planta é conhecido como *priming* (CONRATH et al., 2006). O *priming* é um processo fisiológico sofisticado que envolve vários mecanismos moleculares de percepção e transdução de sinais e pode ser desencadeado por uma variedade de estímulos (CONRATH et al., 2006; MAUCH-MANI et al., 2017).

Estudos têm revelado que mecanismos de controle epigenéticos como a metilação do DNA e modificações nas histonas, as quais estão intimamente associadas à reconfiguração da cromatina, são de grande importância na adaptação das plantas a diferentes estresses bióticos contribuindo ativamente para o *priming* (LUNA et al., 2012; MAUCH-MANI et al., 2017; PASTOR et al., 2013). Ademais, estes mesmos estudos, ilustram que o início do *priming* de defesa é mediado por uma variedade de sinais metabólicos, como ácidos salicílico (CAMAÑES et al., 2012), jasmonatos (TRUMAN et al., 2007) e compostos derivados de indol (TRUMAN et al., 2010) que podem variar de acordo com as condições ambientais, o que deixa elusiva a natureza exata do sinal sistêmico do *priming* de defesa.

Um estudo realizado recentemente por Simmi et al. (2020), demonstrou que a inoculação de plantas de tomate com o fungo biotrófico *Oidium neolycopersici* causou alterações na sinalização elétrica de longa distância (eletroma) das plantas. Isso sugere que as variações do eletroma podem desempenhar um importante papel na sinalização que leva ao desencadeamento do *priming* de defesa, uma vez que os sinais elétricos podem se propagar em segundos ou minutos após as ações locais de agentes estressores com velocidades tipicamente entre centenas de $\mu\text{m s}^{-1}$ a vários cm s^{-1} (FROMM; LAUTNER, 2007; SUKHOV; SUKHOVA; VODENEEV, 2019). Além disso, os sinais elétricos podem interagir com outros tipos de sinais de estresse de longa distância, incluindo sinais hormonais (FARMER et al., 2020; PEÑA-CORTÉS; FISAHN; WILLMITZER, 1995), ondas EROs (FICHMAN; MITTLER, 2021; SUZUKI; MITTLER, 2012), ondas hidráulicas (MALONE, 1994) e ondas de Ca^{2+} (CHOI et al., 2016, 2014). Ademais, existem trabalhos que mostram a influência dos sinais elétricos em processos fisiológicos e na detecção de estresses em plantas (tanto biótico como abiótico) (REISSIG et al., 2021; SARAIVA; FERREIRA; SOUZA, 2017).

Diante disso, o objetivo deste estudo é avaliar se a elicitação local com ácido jasmônico ou *B. sorokiniana* causam mudanças fisiológicas sistêmicas pela elicitação local, como mecanismos de defesa ligados ao estresse oxidativo, e se o eletroma poderia ter um papel de sinalização no processo de aquisição de *priming*.

2 Material e Métodos

2.1 Condições de crescimento de plantas e fungo e inoculação das plantas

Plantas de cevadas (*Hordeum vulgare* L.) da cultivar BRS Cauê (Embrapa®) foram cultivadas a partir de sementes semeadas em vasos plásticos contendo aproximadamente 1 kg de substrato comercial (Turfa Fértil), e mantidos em casa de vegetação sob luz natural e temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, até atingirem o estágio fenológico 7 da escala de Feekes-Large (LARGE, 1954). Após, as plantas foram levadas ao Laboratório de Cognição e Eletrofisiologia Vegetal (LACEV) para dar início a realização das sessões experimentais. No laboratório, as plantas foram mantidas a uma temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas e irradiância de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A semeadura foi realizada em lotes, com uma planta por vaso e com uma diferença

de seis dias entre cada lote. Isso foi realizado para que todas as plantas estivessem com a mesma idade fenológica no momento da coleta dos dados.

O fungo hemibiotrófico *Bipolaris sorokiniana*, responsável por causar a doença conhecida como mancha marrom ou helmintosporiose na cevada, foi isolado de sementes de cevada naturalmente infectadas e cultivado em placa de Petri contendo meio BDA (ágar, batata dextrose).

Para a inoculação das plantas, os conídios de *B. sorokiniana* foram removidos do substrato (BDA) com auxílio de 5 ml de água destilada contendo 0,05% de Tween 20 (poli-oxietileno sorbitan monolaurato, Sigma Chemical Co), filtrados por gaze e contados no hemocitômetro (Improved Neubauer 1/400 SQ. 1/10 mm deep ultraplane), e a concentração final foi ajustada para 2×10^4 conídios/ml. Imediatamente após o preparo da suspensão de esporos foi realizada a inoculação das plantas. A inoculação foi realizada através do método de pulverização de suspensão de esporos, utilizando um borrifador manual. Toda a superfície da folha foi completamente coberta pela pulverização, mas sem que ocorresse o escoamento superficial. As plantas foram mantidas em câmara úmida durante 24 horas antes e 72 horas após a inoculação, com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 85%.

2.2 Desenho experimental e tratamentos

Dois dias antes de cada sessão experimental, oito plantas de cevada foram transferidas da casa de vegetação para o Laboratório de Cognição e Eletrofisiologia Vegetal (LACEV) para aclimação destas as condições do ambiente. A aplicação dos tratamentos e a coleta dos dados bioelétricos foram realizados no colmo principal.

Para a aplicação dos tratamentos, inicialmente, foi realizado o isolamento da última folha completamente expandida do colmo principal. Para isso, utilizou-se de um saco plástico de polietileno, o qual foi colocado sobre a planta, deixando de fora apenas a folha onde foram aplicados os tratamentos. A parte superior do saco plástico ficou aberta para permitir a troca gasosa e para que o restante da planta ficasse exposta a umidade semelhante à da folha. Após 48 horas da aplicação dos tratamentos na folha isolada, o saco plástico foi retirado da planta e realizou-se a aplicação dos tratamentos em toda a planta. A representação do desenho experimental utilizado, está esquematizado na Figura 1.

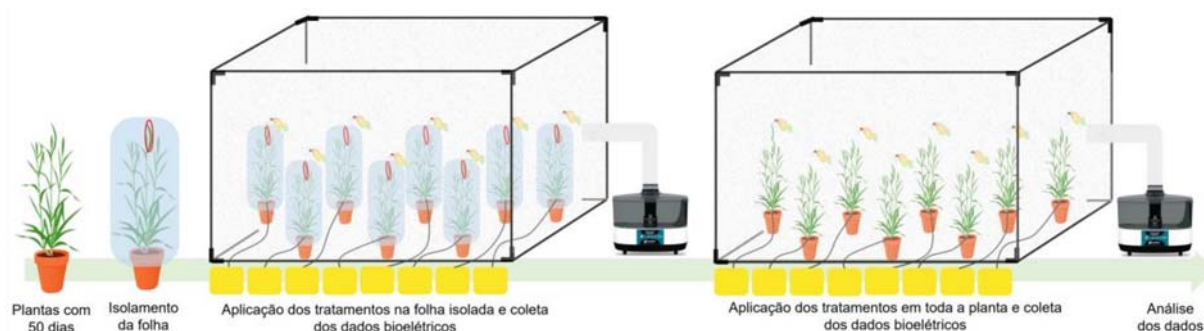


Figura 1. Representação esquemática do desenho experimental. Plantas com 50 dias após a semeadura estão sendo utilizadas para a realização do experimento. Está sendo realizado o isolamento da última folha completamente expandida da planta principal, utilizando para isso um saco plástico. Em cada sessão experimental, estão sendo coletados, simultaneamente, os dados bioelétricos de oito plantas. A captação dos dados bioelétricos está sendo realizada antes da aplicação dos tratamentos, após a aplicação dos tratamentos na folha isolada e após a aplicação dos tratamentos em toda a planta. A aplicação dos tratamentos e a captação dos dados está sendo realizada dentro de uma câmara úmida.

Para a realização do experimento, foram usados seis tratamentos: T1 *B. sorokiniana* + *B. sorokiniana*; T2 *B. sorokiniana* + água; T3 AJ + *B. sorokiniana*; T4 AJ + água; T5 Água + *B. sorokiniana*; T6 Água + água. Para cada tratamento, foram realizadas três sessões experimentais, duas com oito plantas e uma com quatro plantas simultaneamente. Totalizando 20 plantas por tratamento. A distribuição dos tratamentos, bem como a aplicação destes, podem ser observados na Figura 2.

O preparo da solução estoque do ácido jasmônico (AJ) foi realizada de acordo com Sigma-Aldrich, onde o AJ foi primeiro dissolvido em etanol para uma concentração de estoque de 100 mM, em seguida, diluído em água para a concentração final de 100 μ M. A concentração de 100 μ M foi escolhida com base na literatura (JAYARAJ et al., 2004; LU et al., 2006). A solução final, foi pulverizada sobre a folha isolada, utilizando um borrifador manual, até a formação de gotas, sem que ocorresse o escoamento superficial.

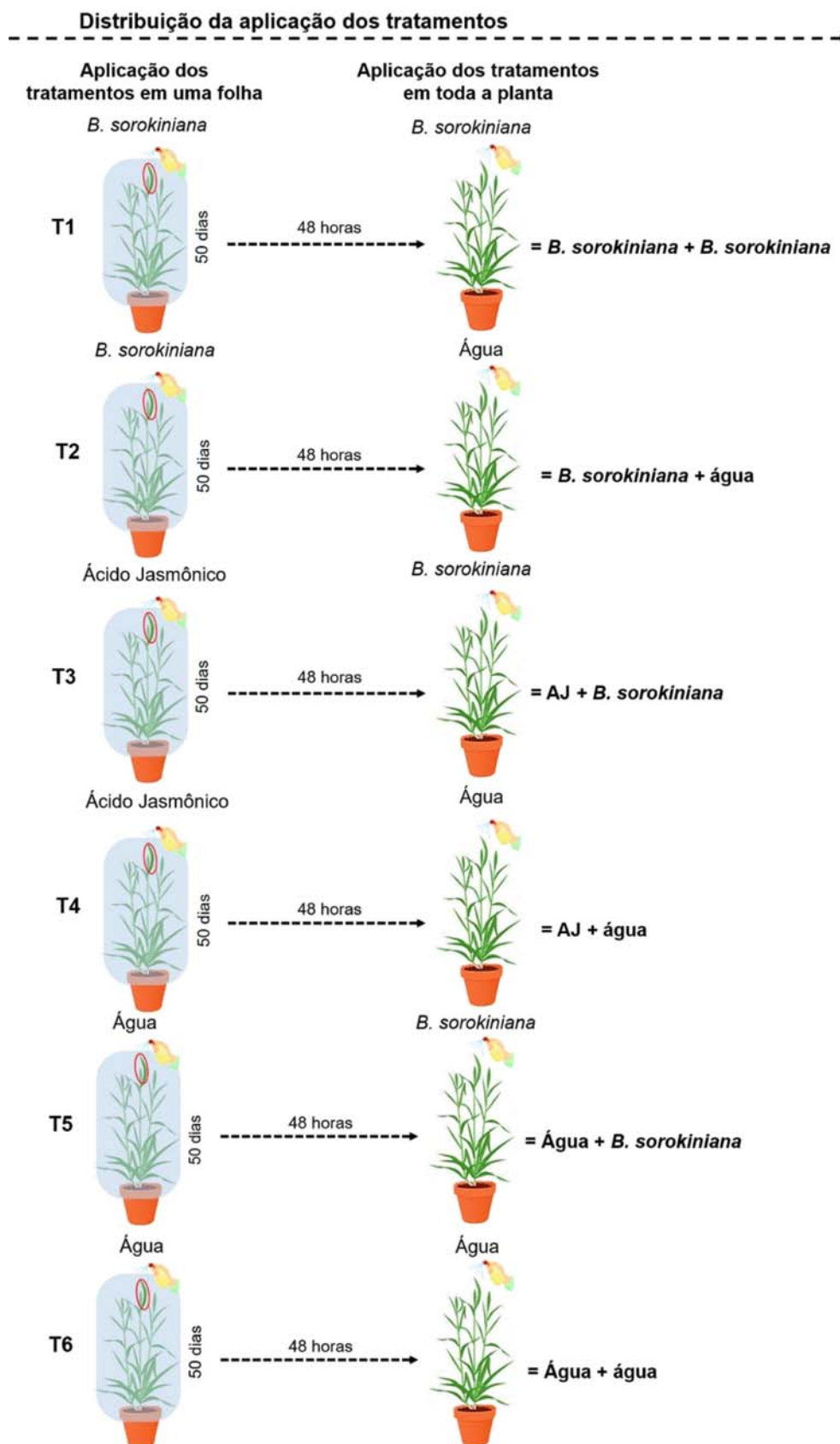


Figura 2. Representação esquemática da distribuição da aplicação dos tratamentos. Inicialmente foi realizada a aplicação dos tratamentos na folha isolada da planta principal. Após 48 horas da aplicação dos tratamentos na folha isolada, foi realizada a aplicação dos tratamentos em toda a planta.

2.3 Aquisição dos dados bioelétricos

A captação dos dados bioelétricos foi realizada através de um dispositivo de amplificação de sinais desenvolvido no Laboratório de Cognição e Eletrofisiologia Vegetal (LACEV). De forma análogo ao equipamento comercial MP36, o sistema capta os sinais da variação de voltagem entre dois eletrodos filtrando o sinal que é comum a ambos amplificando a diferença entre eles. Os eletrodos do tipo de “injeção” são fabricados com agulhas de aço inox cirúrgico e conectados a cabos de 3 vias de 3 mm de diâmetro com um condutor interno de cobre estanhado e revestidos pelo mesmo material, todo cabo é envolto em PVC (material à prova d’água). Vale ressaltar a importância do aterramento em todo sistema, a fim de eliminar sinais ruidosos. O eletrodo é conectado a um amplificador acoplado a uma fonte CC (fonte interna do microcontrolador ESP32-Wroom-32) que, por sua vez, está conectado a uma fonte com filtragem própria, seguido de um conversor analógico-digital de 16 bits de amostragem.

Os eletrodos foram inseridos um dia antes do início da captação dos sinais bioelétricos, para a aclimação das plantas. A taxa de captação utilizada para a coleta dos dados é de 50 Hz. A captação foi realizada dentro de uma câmara úmida, uma vez que a umidade é necessária para o desenvolvimento do patógeno. A coleta dos dados foi realizada antes da aplicação dos tratamentos e após a aplicação dos tratamentos (plantas tratadas), cobrindo um total de 96 horas de medidas, sendo 24 horas antes da aplicação, 48 horas após a primeira aplicação dos tratamentos (aplicação na folha isolada) e 24 horas após a segunda aplicação dos tratamentos (aplicação em toda a planta).

2.4 Localização histoquímica da peroxidação lipídica, perda da estabilidade da membrana, acúmulo de radicais superóxido (O_2^-) e acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Para avaliar os efeitos da elicitación local na expressão sistêmica de mecanismos de defesa ligados ao estresse oxidativo, foram realizadas coletas de amostras foliares, aproximadamente 2 centímetros, da folha onde foi realizada a inoculação e no restante da planta às 2, 5, 8, 24 e 48 horas após a aplicação dos tratamentos na folha isolada. Para cada tempo de coleta foram utilizadas quatro

repetições, representadas por uma planta. Assim, para cada tratamento foram amostradas quatro plantas em cada momento de coleta.

A detecção histoquímica da peroxidação lipídica foi realizada seguindo a metodologia de Pompella et al., (1987). As amostras foram coradas com reagente de Schiff durante 60 minutos para detectar aldeídos provenientes da peroxidação lipídica. Depois da reação com o reagente de Schiff, as amostras foram lavadas com uma solução de sulfito (0,5% $K_2S_2O_5$ em HCl 0,05 M) e mantida nessa solução para manter a coloração.

A localização histoquímica da perda de estabilidade de membrana foi realizada seguindo o método de Romero-Puertas et al., (2004). Os seguimentos foliares, foram imergidos em uma solução 0,25% de Evans Blue e mantidos imersos nesta solução por cinco horas em temperatura ambiente. Após, os seguimentos foram fervidos em etanol absoluto para retirar a clorofila das folhas, e assim poder visualizar as regiões demarcadas pelo Evans Blue. Após a fervura, os seguimentos foliares foram retirados e mantidos em etanol 70% até a obtenção das imagens para registro.

A localização histoquímica *in situ* do acúmulo de radical superóxido (O_2^-), foi realizada seguindo o método de Shi et al., (2010). Inicialmente foi preparado o Tampão Fosfato de Potássio (K_2HPO_4), 10 mM, pH 7.8. Posteriormente, foi preparada uma solução com o Tampão + NBT (*Nitro blue tetrazolium*) (1 mg NBT/mL de Tampão). Após os seguimentos foliares foram emergidos nessa solução e mantidos nesta solução por três horas sob iluminação forte e constante. Após, as folhas foram retiradas da solução, fervidas em etanol absoluto até descolorirem por completo, ficando esbranquiçadas, e conservadas em etanol 70%, até a obtenção das imagens para a análise dos pontos escuros (azuis) demarcados pelo NBT que mostram a reação com o O_2^- .

A localização histoquímica *in situ* do acúmulo de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) foi realizada seguindo o método de Shi et al., (2010). Inicialmente foi realizada o preparo do Tampão Fosfato de Potássio (K_2HPO_4), 10 mM, pH 7.8. Em seguida, uma solução Tampão + DAB (*Diaminobenzidine*) (1 mg DAB/mL de Tampão, pH 3.8) foi preparada. Após a coleta os seguimentos foliares foram inseridos na solução Tampão + DAB e mantidas a 8 horas sob iluminação forte e constante. Após os seguimentos foram retirados na solução, fervidos em etanol absoluto até descolorirem por completo, ficando esbranquiçadas, e conservadas em etanol 70% até a obtenção das

imagens para a análise dos pontos escuros (marrons) demarcados pelo DAB que mostram a reação com o H_2O_2 .

2.5 Avaliação da doença

A severidade da mancha parda foi estimada com base na proporção da área foliar afetada pela doença em relação à área foliar total de acordo com a escala diagramática descrita por Azevedo, 1997.

2.6 Análise dos dados

2.6.1 Análise dos dados bioelétricos

2.6.1.1 Pré-processamento dos dados

Através de análise visual, os dados coletados pelo sensor foram separados em diferentes arquivos (txt), sendo selecionados apenas as séries temporais que apresentavam variações nos dados, totalizando 7 plantas (repetições) por tratamento.

Com base no menor arquivo, as séries temporais foram ajustadas de forma a terem a mesma quantidade de instâncias. Em seguida, foi realizada a conversão da leitura dos dados (24 horas e 48 horas) em segundos. Após esse procedimento, as informações Tempo (Hora/Minuto/Segundo), Tratamento (T1 a T6), Planta (repetições do experimento) e *Status* (Antes/Depois) foram devidamente adicionados ao conjunto de dados. *Outliers* foram removidos dentro de cada tempo/segundo. Ao final, foi obtida uma tabela geral com: horas, minutos, segundos, tratamento, planta, *Status*, *M_Value*, a qual foi utilizada nas análises.

2.6.1.2 Análise Bayesiana de Mudança de Pontos (BCP), Entropia Aproximada, Autocorrelação e Análise de Clusterização

Após a geração da tabela geral, os dados foram alterados para trabalhar com a média das leituras/minuto, sendo o atributo 'Plantas' considerado como repetições dentro dos tratamentos. De modo a verificar a integridade dos dados e gerar atributos

para o processo de aprendizado de máquina, aplicou-se a estatística descritiva para obtenção de média, desvio padrão, curtose, coeficiente de variação e assimetria. Em seguida, os dados foram submetidos à análise Bayesiana de Mudança de Ponto (*Bayesian Change Point* - BCP), utilizando o R package *bcp* (WANG et al., 2018), onde pode-se estimar a probabilidade de um ponto de mudança em um intervalo e dois conjuntos de dados, para quantificar a regularidade ou previsibilidade das séries temporal foi aplicada a Entropia Aproximada (*Approximate Entropy* - ApEn), utilizando o R package e Autocorrelação foi realizada para encontrar padrões de repetição no domínio do tempo, utilizando o R package .

Os resultados destas análises foram utilizados como atributos, formando assim o *dataset* a ser trabalhado no aprendizado de máquinas (análise de clusterização) para classificação automática dos tratamentos. Foram aplicados 3 algoritmos de clusterização (*kmeans*, *kmodes* e *birch*, todos em modo *default*). Com base nas métricas *Davies-Bouldin score* e *Silhouette score*, o algoritmo *Kmeans* foi selecionado devido a sua melhor performance, indicando assim a presença de dois clusters.

2.6.2 Análises de detecção histoquímica

As imagens utilizadas para detecção histoquímica de peroxidação lipídica, perda da estabilidade da membrana, (O_2^-) e (H_2O_2), foram obtidas com um scanner fotográfico HP Deskjet F2050 e as imagens foram digitalizadas a 600 dpi. A quantificação foi realizada usando o software ImageJ, seguindo o protocolo descrito por Juszczak; Baier, 2014. Resumidamente, com o auxílio do software Photoshop removeu-se o fundo, melhorou-se o contraste e a correção de cor das imagens. Após, no software ImageJ, a escala de cores da foto foi alterada para a escala de cinza (32 - bit), se fez o ajuste para a intensidade de cor cinza e após se fez a mensuração da área foliar e determinou-se a porcentagem da área foliar manchada.

3 Resultados

3.1 Alterações no eletroma captadas por diferentes análises

O resultado das diferentes análises realizadas no eletroma foram inconclusivas (Figura 3). Assim, novas análises precisam ser realizadas nos dados bioelétricos coletados.

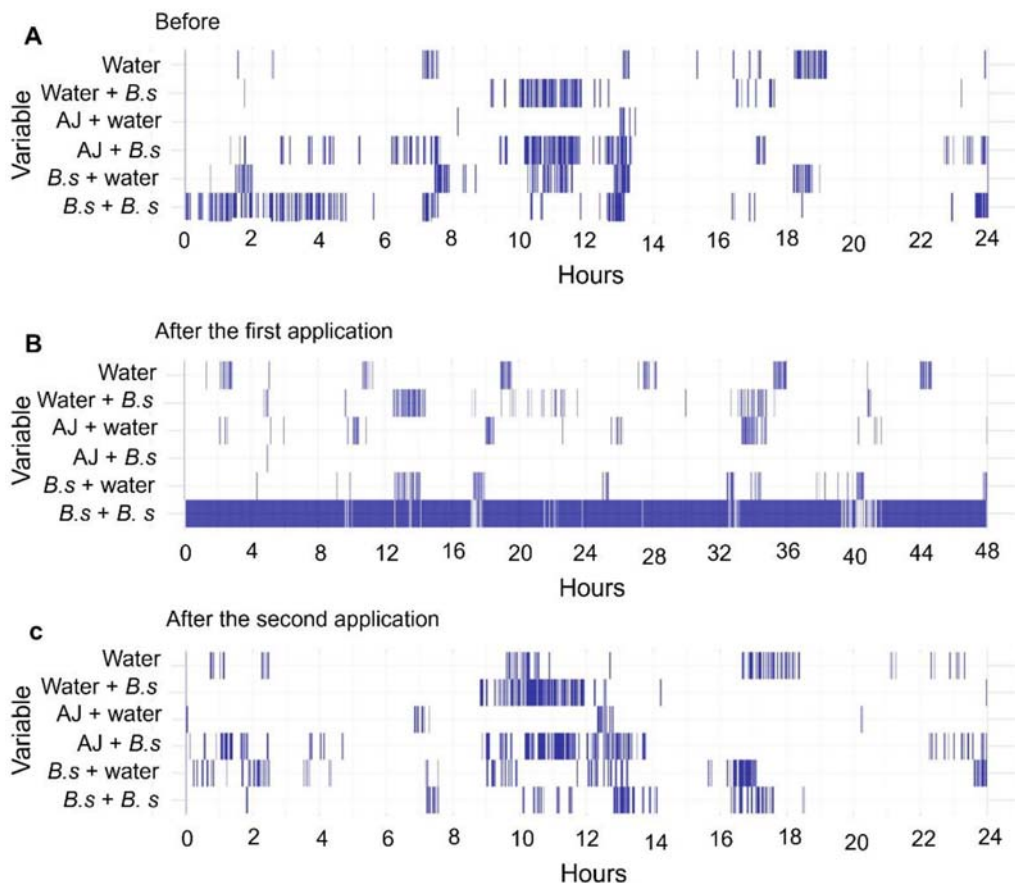


Figura 3. Distribuição dos eletromas antes e após a aplicação dos tratamentos ao longo do tempo, gerado pela análise de cluster. Onde as alterações encontradas no eletroma (VE: variação do eletroma) foram classificadas em cluster 0 (em azul) e o restante dos dados (eletroma sem variação) classificados como cluster 1 (em branco).

3.2 Detecção Histoquímicas

A elicitação local com AJ e *B. sorokiniana* causaram alterações na expressão local e sistêmica (longe do local da aplicação) nos mecanismos de defesa ligados ao estresse oxidativo, como pode ser observado nas Figuras 4 e 5. No local onde foi realizado a aplicação dos tratamentos, registrou-se os maiores acúmulos de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio 48 horas após a aplicação de *B. sorokiniana* (Figura 4 B e D). No entanto, a aplicação de AJ também promoveu alterações no acúmulo de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio em comparação ao controle (Figura 4 B e D). Na peroxidação lipídica foram registrados aumentos 8 e 24 horas após a aplicação de AJ (Figura 4 F), e 48 horas após a aplicação de *B. sorokiniana*

(Figura 4 F). A maior perda da estabilidade da membrana ocorreu 24 horas após a aplicação de AJ e 48 horas após a aplicação de *B. sorokiniana* (Figura 4 H).

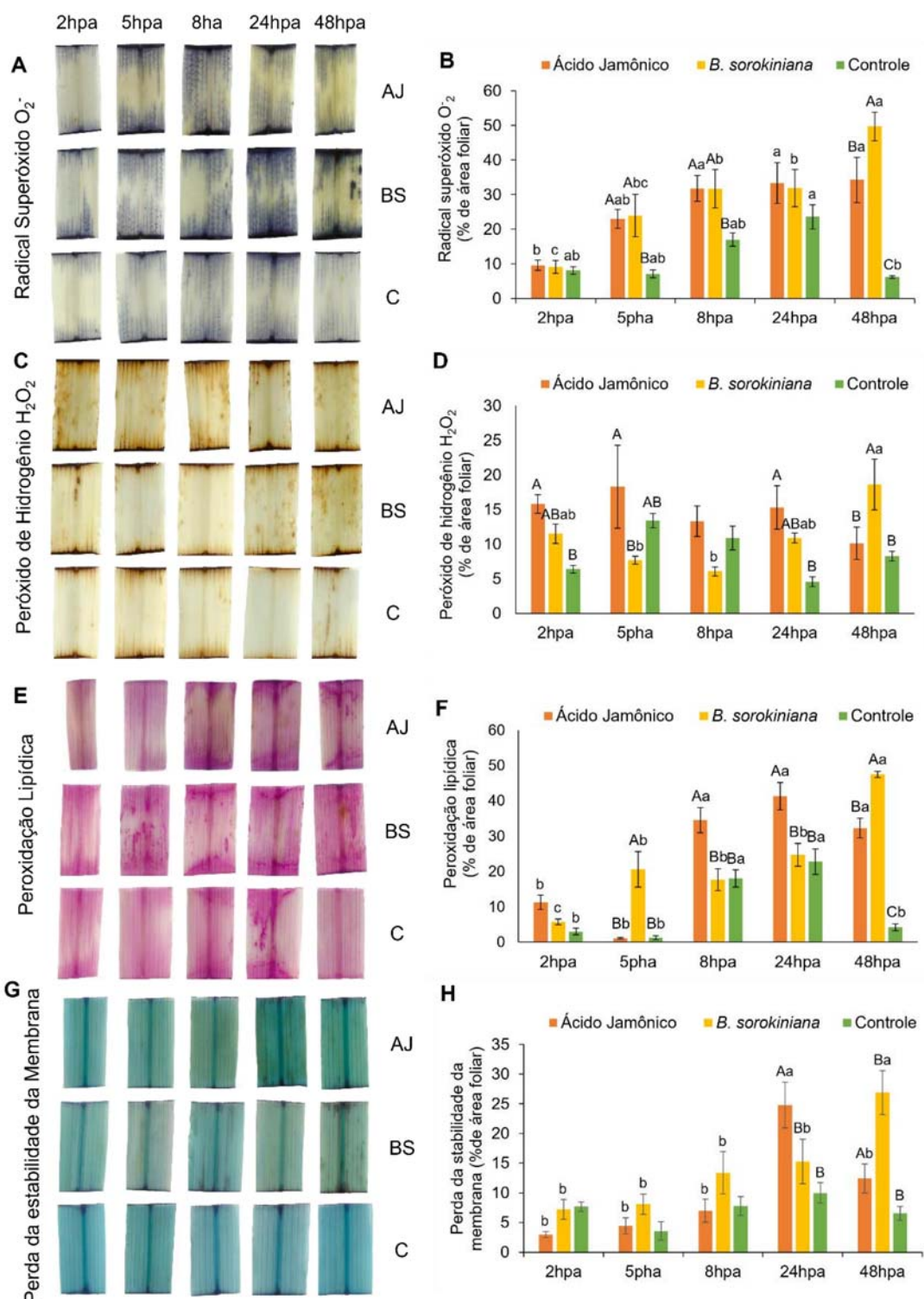


Figura 4. Detecção histoquímica do acúmulo de radicais superóxido (O_2^-), acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxidação lipídica e perda da estabilidade da membrana, no local onde foi realizada a aplicação dos tratamentos em 2, 5, 8, 24 e 48 após a aplicação (hpa). **A, C, E, G**) Imagens representativas de seguimentos foliares coradas com os reagentes de NBT (**A**), DAB (**C**), Schiff (**E**) e Evans Blue (**G**), nos horários após a aplicação dos tratamentos (hpa) na folha isolada. **B, D, F, H**) Quantificação do acúmulo de radicais superóxido (O_2^-) (**B**), acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (**D**), peroxidação lipídica (**F**) e perda da estabilidade da membrana (**H**). Cada dado apresenta a média

± erro padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos; letras minúsculas diferentes no mesmo tratamento indicam diferenças estatísticas significativas entre os horários de avaliação de ($p < 0,05$).

Nos tecidos sistêmicos o maior acúmulo de radicais superóxido foi registrado 24 horas após a aplicação de AJ e 48 horas após a aplicação de *B. sorokiniana* (Figura 5 B). Os maiores acúmulos de peróxido de hidrogênio foram registrados 5 horas após a aplicação do tratamento controle e 48 horas após a aplicação de *B. sorokiniana* (Figura 5 D). A maior peroxidação lipídica foi registrada 48 horas após a aplicação de *B. sorokiniana* (Figura 5 F). As maiores perdas da estabilidade da membrana foram registradas 24 horas após a aplicação de AJ e *B. sorokiniana* (Figura 5 H).

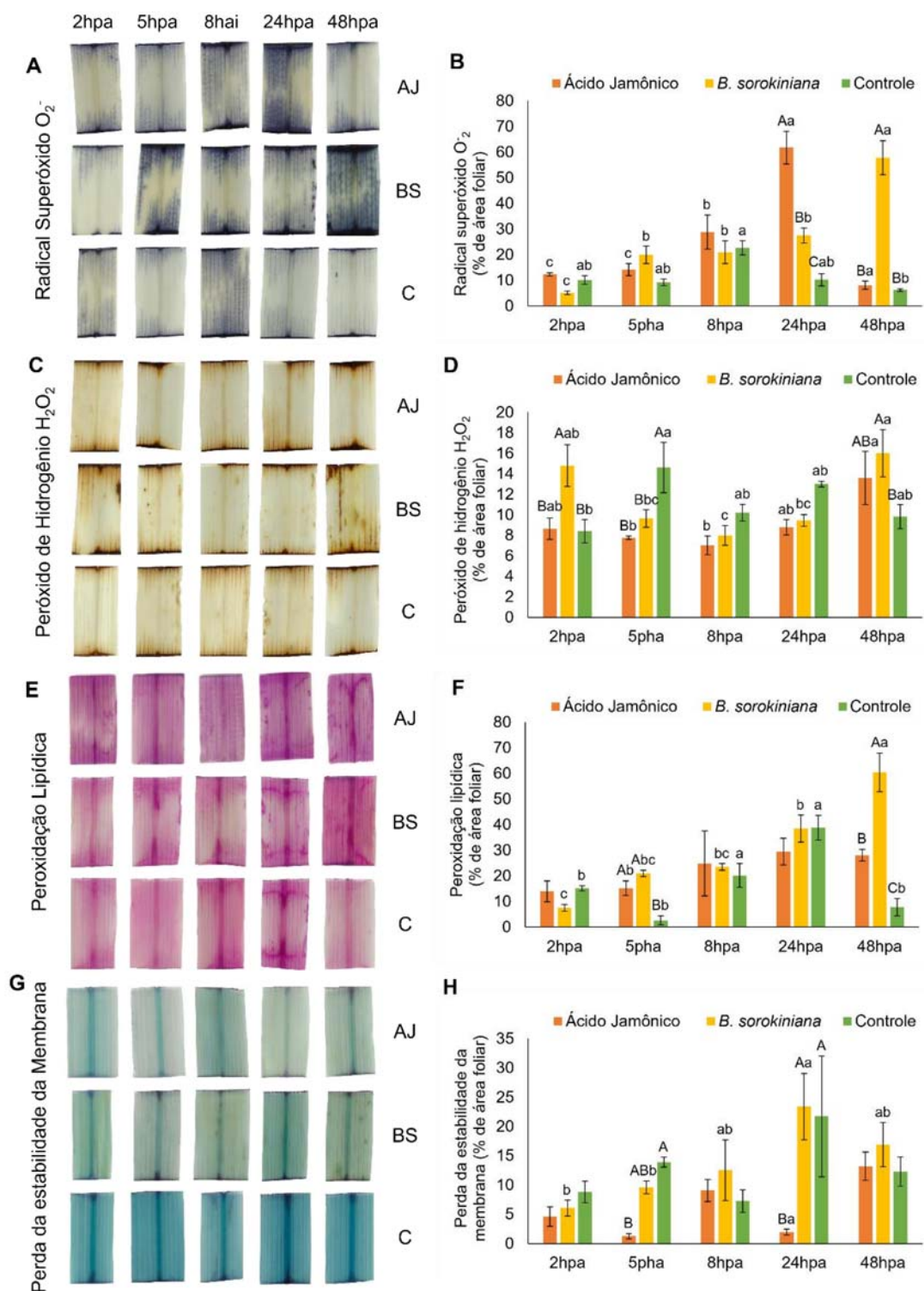


Figura 5. Detecção histoquímica da peroxidação lipídica, perda da estabilidade da membrana, acúmulo de radicais superóxido (O_2^-) e acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos tecidos sistêmicos em 2, 5, 8, 24 e 48 após a aplicação (hpa). **A, C, E, G**) Imagens representativas de seguimentos foliares coradas com os reagentes de NBT (**A**), DAB (**C**), Schiff (**E**) e Evans Blue (**G**), nos horários após a aplicação dos tratamentos (hpa) na folha isolada. **B, D, F, H**) Quantificação do acúmulo de radicais superóxido (O_2^-) (**B**), acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (**D**), peroxidação lipídica (**F**) e perda da estabilidade da membrana (**H**). Cada dado apresenta a média \pm erro padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos; letras minúsculas diferentes no mesmo tratamento indicam diferenças estatísticas significativas entre os horários de avaliação de ($p < 0,05$).

3.3 Avaliação da doença

Ao avaliar os sintomas da doença causados após a inoculação com *B. sorokiniana* na folha isolada, pode-se perceber que 24 horas após a inoculação era possível observar pequenas lesões de coloração marrom circundadas por um halo clorótico, sintomas típicos para a doença causada pelo patógeno. Com o passar do tempo, essas lesões evoluíram de tamanho e quantidade, indicando o sucesso na infecção do patógeno e a suscetibilidade da cultivar utilizada.

A análise visual da severidade da doença no restante da planta, onde não foi realizada a primeira aplicação dos tratamentos, mostram que a aplicação de AJ e *B. sorokiniana* na folha isolada reduziram significativamente os sintomas da doença no restante da planta quando comparada com o tratamento controle, onde foi realizado apenas a aplicação de água mais Tween 20% (Figura 6).

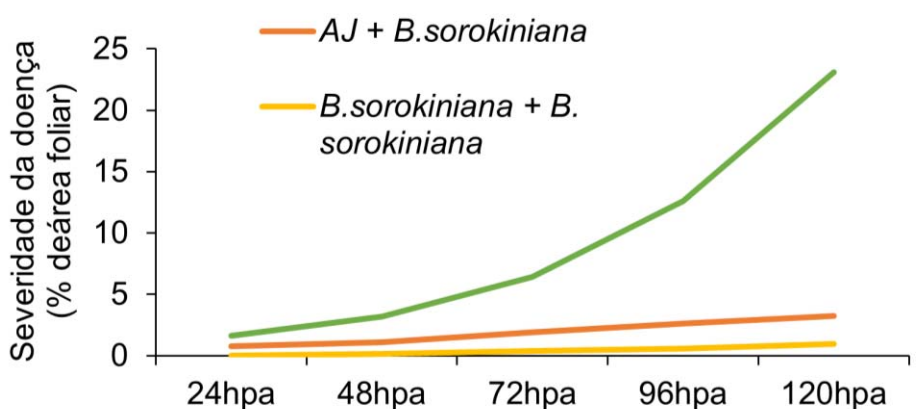


Figura 6. Severidade da mancha marrom (*B. sorokiniana*) 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a primeira aplicação dos tratamentos na folha isolada.

4 Discussão

Quando as plantas são expostas a condições de estresse, ocorre a geração de espécies reativas de oxigênio, incluindo radicais hidroxila (OH^\cdot), radicais superóxido (O_2^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, quando em excesso, causam danos oxidativos (PANDA; CHAUDHURY; KHAN, 2003). Um aumento no nível EROs causa oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (GILLE; SIGLER, 1995). Os resultados obtidos nas análises histoquímicas (Figuras 4 e 5) mostram que a aplicação local de AJ e *B. sorokiniana* ativou os mecanismos de defesa ligados ao estresse oxidativo e com isso ocorreu a redução da severidade da mancha parda nos tecidos

sistêmicos. O que permite inferir que a aplicação local de AJ e *B. sorokiniana* ativou mecanismos de resistência nos tecidos sistêmicos, reduzindo a incidência da doença. Além disso, a aplicação local de AJ ou *B. sorokiniana* promoveu um maior acúmulo de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio o que levou à peroxidação lipídica e perda da estabilidade da membrana, tanto no local da aplicação dos tratamentos como nos tecidos sistêmicos, em comparação com as plantas do tratamento controle. Esses resultados são notáveis, pois mostra a transmissão sistêmica de sinais de defesa do local da aplicação para o restante da planta. Todavia, não foi possível verificar se houve um envolvimento consistente da sinalização elétrica nesse processo de comunicação sistêmica, uma vez que as análises realizadas do eletroma não foram conclusivas.

Durante os diferentes estágios de interação entre planta e patógenos, EROs podem ser translouçadas extensivamente, e a aplicação exógena de AJ também interfere nas EROs (GHOLI-TOLOUIE et al., 2018). Portanto, a sinalização redox sistêmica desempenha um papel importante na regulação dos mecanismos de aclimação sistêmicos sob condições de estresse (FERNANDEZ-GÖBEL et al., 2019). Consequentemente, as redes de sinalização de EROs controlam uma ampla gama de processos biológicos, incluindo respostas a estímulos bióticos, e podem funcionar como um sinal de *priming* em plantas (BAXTER; MITTLER; SUZUKI, 2014). Além disso, os hormônios de defesa modulam o status de EROs nas plantas (SEWELAM et al., 2013), o que sugere que a aplicação de AJ e *B. sorokiniana* na folha isolada sensibilizou as partes distais da planta para aumentar a defesa contra o patógeno quando aplicado no restante da planta, levando ao desencadeamento do *priming*.

Apesar da redução drástica da severidade da doença causada pela inoculação de *B. sorokiniana* na folha isolada, é importante destacar que isso não possui uma aplicação prática. Uma vez que a aplicação do patógeno em campo pode gerar uma epidemia da doença.

5 Conclusões

A aplicação de ácido jasmônico e *B. sorokiniana* na folha isolada estimulou a sinalização redox local e sistêmica e possibilitou que as plantas respondessem de forma mais rápida e intensa contra a inoculação de *B. sorokiniana*. No entanto, novas

análises devem ser realizadas nos dados eletrofisiológicos, para verificar se a aplicação de ácido jasmônico e *B. sorokiniana* causam alterações sistêmicas no eletroma das plantas, como sugerido pelos resultados anteriormente obtidos por Simmi et al. (2020).

Referências bibliográficas

- AZEVEDO, L.A.S. Manual de quantificação de doenças de plantas **Novartis.**, São Paulo, p.114, 1997.
- BAXTER, A.; MITTLER, R.; SUZUKI, N. ROS as key players in plant stress signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 5, p. 1229–1240, 2014.
- CAMAÑES, G. et al. A deletion in the nitrate high affinity transporter responses to *Pseudomonas syringae*. **Plant signaling & behavior**, n. June, p. 619–622, 2012.
- CHOI, W.-G. et al. Rapid, Long-Distance Electrical and Calcium Signaling in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 67, n. 1, p. 287–307, 2016.
- CHOI, W. G. et al. Salt stress-induced Ca²⁺ waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 17, p. 6497–6502, 2014.
- CONRATH, U. et al. Priming: Getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 10, p. 1062–1071, 2006.
- FARMER, E. E. et al. Wound- and mechanostimulated electrical signals control hormone responses. **New Phytologist**, v. 227, n. 4, p. 1037–1050, 2020.
- FERNANDEZ-GÖBEL, T. F. et al. Redox systemic signaling and induced tolerance responses during soybean–*Bradyrhizobium japonicum* interaction: Involvement of nod factor receptor and autoregulation of nodulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. February, p. 1–15, 2019.
- FICHMAN, Y.; MITTLER, R. Main Manuscript for Integration of electric, calcium, reactive oxygen species and hydraulic signals during rapid systemic signaling in plants. **bioRxiv**, p. 2021.02.12.430927, 2021.
- FROMM, J.; LAUTNER, S. Electrical signals and their physiological significance in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, n. 3, p. 249–257, 2007.
- GHOLI-TOLOUIE, S. et al. Influence of salicylic and jasmonic acids on the antioxidant systems of tomato (*Solanum lycopersicum* cv . Superchief) plants under biotic stresses. **Journal of Plant Physiology**, v. 8, p. 2345–2351, 2018.

- GILLE, G.; SIGLER, K. Oxidative stress and living cells. **Folia Microbiologica**, v. 40, n. 2, p. 131–152, 1995.
- JAYARAJ, J. et al. Jasmonic acid and salicylic acid induce accumulation of β -1,3-glucanase and thaumatin-like proteins in wheat and enhance resistance against *Stagonospora nodorum*. **Biologia Plantarum**, v. 48, n. 3, p. 425–430, 2004.
- JUSZCZAK, I.; BAIER, M. Plant Cold Acclimation. **Springer**, v. 1166, p. 255–277, 2014.
- LU, Z. X. et al. Inducers of resistance reduce common bunt infection in wheat seedlings while differentially regulating defence-gene expression. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 67, n. 3–5, p. 138–148, 2006.
- LUNA, E. et al. Next-generation systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, v. 158, n. 2, p. 844–853, 2012.
- MALONE, M. Wound-induced hydraulic signals and stimulus transmission in *Mimosa pudica* L. **New Phytologist**, v. 128, n. 1, p. 49–56, 1994.
- MAUCH-MANI, B. et al. Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 68, p. 485–512, 2017.
- PANDA, S. K.; CHAUDHURY, I.; KHAN, M. H. **Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves** *Biologia Plantarum*, 2003.
- PASTOR, V. et al. Primed plants do not forget. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 46–56, 2013.
- PEÑA-CORTÉS, H.; FISAHN, J.; WILLMITZER, L. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 10, p. 4106–4113, 1995.
- POMPELLA, A. et al. Histochemical Detection of Lipid Peroxidation in the Liver of Bromobenzene-Poisoned Mice. **American Journal of Pathology**, v. 129, n. 2, 1987.
- REISSIG, G. N. et al. Fruit Herbivory Alters Plant Electrome: Evidence for Fruit-Shoot Long-Distance Electrical Signaling in Tomato Plants. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, n. July, p. 1–14, 2021.
- ROMERO-PUERTAS, M. C. et al. Cadmium-induced subcellular accumulation of $O_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 . **Plant**, p. 1122–1134, 2004.
- SARAIVA, G. F. R.; FERREIRA, A. S.; SOUZA, G. M. Osmotic stress decreases complexity underlying the electrophysiological dynamic in soybean. **Plant Biology**, v. 19, n. 5, p. 702–708, 2017.

SEWELAM, N. et al. Ethylene Response Factor 6 Is a Regulator of Reactive Oxygen Species Signaling in Arabidopsis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

SHI, J. I. E. et al. Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus in vitro plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. **Tree Physiology**, v. 30, p. 914–922, 2010.

SUKHOV, V.; SUKHOVA, E.; VODENEEV, V. Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 146, p. 63–84, 2019.

SUZUKI, N.; MITTLER, R. Reactive oxygen species-dependent wound responses in animals and plants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 12, p. 2269–2276, 2012.

TRUMAN, W. et al. Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 3, p. 1075–1080, 2007.

TRUMAN, W. M. et al. Arabidopsis auxin mutants are compromised in systemic acquired resistance and exhibit aberrant accumulation of various indolic compounds. **Plant Physiology**, v. 152, n. 3, p. 1562–1573, 2010.

Considerações Finais

Os resultados obtidos neste estudo, permitiu responder parte da nossa hipótese inicial de que após o reconhecimento de diferentes elicitores (patogênico e o composto sintético AJ) pela planta, ocorram alterações no eletroma, e que essas alterações podem transmitir informações a tecidos distantes do local onde ocorreu a elicitação. Essas alterações do eletroma poderiam ser as precursoras no processo de *priming* em plantas infectadas por fungos patogênicos, uma vez que a propagação dos sinais elétricos ocorre de forma mais rápida que a sinalização química. No entanto, precisamos realizar novas análises nos dados do eletroma para verificar se as alterações do eletroma poderiam ser as precursoras no processo de aquisição de *priming*.

Ademais, nossos resultados apontam que através da análise do eletroma é possível identificar assinaturas elétricas específicas do patógeno com a qual é possível identificar a presença do patógeno na planta nos primeiros minutos após o contato dele com a superfície do hospedeiro. Esses resultados vão de encontro aos resultados publicados em Simmi et al., 2020. O que mostra uma possível aplicação da combinação de nossos métodos de captação, análise, e identificação de padrões no eletroma das plantas para o diagnóstico precoce de diferentes doenças em plantas antes mesmo dos primeiros sintomas visuais da doença. Isso poderia ser útil para a pesquisa básica, mas também extremamente relevante para o desenvolvimento de um sistema agrícola mais sustentável.

Além disso, as análises histoquímicas e a severidade da doença, mostraram que aplicação local de AJ e *B. sorokiniana* causam alterações na expressão local e sistêmica (longe do local da aplicação) dos mecanismos de defesa ligados ao estresse oxidativo, e que ocorreu a redução drástica a infecção causada pela segunda inoculação com *B. sorokiniana*. Isso nos permite inferir que ocorreu sinalização sistêmica o que desencadeou o *priming* nos tecidos sistêmicos. No entanto, é de fundamental importância a realização de novas análises dos dados do eletroma para revelar se os sinais elétricos estão presentes neste processo. Uma vez que, os sinais elétricos foram coletados com o sensor desenvolvido no LACEV, a análise desses dados pode auxiliar no desenvolvimento de novas pesquisas tanto em laboratório como no campo, além de permitir o desenvolvimento de um equipamento que possa ser utilizado por produtores rurais.

Referências

- ACHARYA, K.; DUTTA, A. K.; PRADHAN, P. *Bipolaris sorokiana* (Sacc .) Shoem .: The most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas warmer areas. **Australian Journal of Crop Science**, n. January, p. 1064–1071, 2011.
- AHMAD, S. et al. Natural variation in priming of basal resistance: From evolutionary origin to agricultural exploitation. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 6, p. 817–827, 2010.
- AHMED, A. A.; PEDERSEN, C.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. The barley powdery mildew effector candidates CSEP0081 and CSEP0254 promote fungal infection success. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–12, 2016.
- BALUŠKA, F.; VOLKMANN, D.; MANCUSO, S. Communication in plants: Neuronal aspects of plant life. **Communication in Plants: Neuronal Aspects of Plant Life**, p. 1–438, 2006.
- BHAR, A.; CHAKRABORTY, A.; ROY, A. Plant responses to biotic stress: Old memories matter. **Plants**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2022.
- BOLLER, T. Chemoperception of microbial signals in plant cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 46, p. 189–214, 1995.
- BOLLER, T.; FELIX, G. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, n. 1, p. 379–406, 2009.
- CAPLAN, J.; PADMANABHAN, M.; DINESH-KUMAR, S. P. Review Plant NB-LRR Immune Receptors : From Recognition to Transcriptional Reprogramming. **Cell Host and Microbe**, 2008.
- CEULEMANS, E. et al. Pathogen Effectors: Exploiting the Promiscuity of Plant Signaling Hubs. **Trends in Plant Science**, v. 26, n. 8, p. 780–795, 2021.
- CHOI, W.-G. et al. Rapid, Long-Distance Electrical and Calcium Signaling in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 67, n. 1, p. 287–307, 2016.
- CHOI, W. G. et al. Salt stress-induced Ca²⁺ waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 17, p. 6497–6502, 2014.
- CONRATH, U. et al. Priming: Getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 10, p. 1062–1071, 2006.
- CONRATH, U. Molecular aspects of defence priming. **Trends in Plant Science**, v. 16,

n. 10, p. 524–531, 2011.

CUI, H.; TSUDA, K.; PARKER, J. E. Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, n. 1, p. 487–511, 2015.

DALIO, R. J. D. et al. Efetores Nas Interações Planta-Patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 22, p. 22–68, 2014.

DE LOOF, A. The cell's self-generated “electrome”: The biophysical essence of the immaterial dimension of Life? **Communicative & Integrative Biology**, v. 9, n. 5, p. e1197446, 2016.

DE TOLEDO, G. R. A. et al. Plant electrome: the electrical dimension of plant life. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 31, n. 1, p. 21–46, 2019.

DEBONO, M. W.; SOUZA, G. M. Plants as electromic plastic interfaces: A mesological approach. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 146, p. 123–133, 2019.

EULGEM, T. Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 2, p. 71–78, 2005.

FARMER, E. E. et al. Wound- and mechanostimulated electrical signals control hormone responses. **New Phytologist**, v. 227, n. 4, p. 1037–1050, 2020.

FELLE, H. H. et al. Apoplastic pH signaling in barley leaves attacked by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 1, p. 118–123, 2004.

FELLE, H. H. et al. Interactive signal transfer between host and pathogen during successful infection of barley leaves by *Blumeria graminis* and *Bipolaris sorokiniana*. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 52–59, 2008.

FICHMAN, Y.; MITTLER, R. Main Manuscript for Integration of electric, calcium, reactive oxygen species and hydraulic signals during rapid systemic signaling in plants. **bioRxiv**, p. 2021.02.12.430927, 2021.

FROMM, J.; LAUTNER, S. Electrical signals and their physiological significance in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, n. 3, p. 249–257, 2007.

FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance : Turning Local Infection into Global Defense. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 7, p. 1–43, 2013.

GALLÉ, A. et al. Environmental stimuli and physiological responses: The current view on electrical signalling. **Environmental and Experimental Botany**, v. 114, p. 15–21, 2015.

- GILROY, S. et al. ROS, Calcium, and Electric Signals: Key Mediators of Rapid Systemic Signaling in Plants. **Plant Physiology**, v. 171, n. 3, p. 1606–1615, 2016.
- HAN, Q. et al. Cytological study of wheat spike infection by *bipolaris sorokiniana*. **Journal of Phytopathology**, v. 158, n. 1, p. 22–29, 2010.
- HANN, D. R.; RATHJEN, J. P. The long and winding road: Virulence effector proteins of plant pathogenic bacteria. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 20, p. 3425–3434, 2010.
- HANSJAKOB, A.; RIEDERER, M.; HILDEBRANDT, U. Appressorium morphogenesis and cell cycle progression are linked in the grass powdery mildew fungus *Blumeria graminis*. **Fungal Biology**, v. 116, n. 8, p. 890–901, 2012.
- HEDRICH, R.; SALVADOR-RECATALÀ, V.; DREYER, I. Electrical Wiring and Long-Distance Plant Communication. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 5, p. 376–387, 2016.
- HILKER, M. et al. Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. **Biological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1118–1133, 2016.
- HORBACH, R. et al. When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 1, p. 51–62, 2011.
- HUBER, A. E.; BAUERLE, T. L. Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: The gap in knowledge. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 7, p. 2063–2079, 2016.
- JANSSON, H.-B.; ÅKESSON, H. Costs of secondary parasitism in the facultative hyperparasitoid *Pachycrepoideus dubius*: Does host size matter? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 103, n. 3, p. 239–248, 2002.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006.
- KUMAR, J. et al. A compromised Mlo pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. **Phytopathology**, v. 91, n. 2, p. 127–133, 2001.
- LARGE, E. C. Illustration of the Feekes Scale. **Plant Pathology**, v. 3, n. 4, p. 128–129, 1954.
- ŁAŻNIEWSKA, J.; MACIOSZEK, V. K.; KONONOWICZ, A. K. Plant-fungus interface: The role of surface structures in plant resistance and susceptibility to pathogenic fungi. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 24–30, 2012.
- LÜTTGE, U. Integrative emergence in contrast to separating modularity in plant

biology: views on systems biology with information, signals and memory at scalar levels from molecules to the biosphere. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 33, n. 1, p. 1–13, 2021.

MALONE, M. Wound-induced hydraulic signals and stimulus transmission in *Mimosa pudica* L. **New Phytologist**, v. 128, n. 1, p. 49–56, 1994.

MENDGEN, K.; HAHN, M. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends in Plant Science**, v. 1385, n. 02, p. 1–5, 2002.

MITHÖFER, A.; EBEL, J.; FELLE, H. H. Cation fluxes cause plasma membrane depolarization involved in beta-glucan elicitor-signaling in soybean roots. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 18, n. 9, p. 983–990, 2005.

NEWMAN, M. A. et al. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. MAY, p. 1–14, 2013.

NÜRNBERGER, T. et al. Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 249–266, 2004.

PARISE, A. G. et al. Detection of Different Hosts From a Distance Alters the Behaviour and Bioelectrical Activity of *Cuscuta racemosa*. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. March, p. 1–21, 2021.

PASTOR, V. et al. Primed plants do not forget. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 46–56, 2013.

PEÑA-CORTÉS, H.; FISAHN, J.; WILLMITZER, L. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 10, p. 4106–4113, 1995.

PEREIRA, D. R. et al. Automatic classification of plant electrophysiological responses to environmental stimuli using machine learning and interval arithmetic. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 145, n. August 2017, p. 35–42, 2018.

PHAM, T. A. T. et al. Analysis of cell wall synthesis and metabolism during early germination of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* conidial cells induced in vitro. **Cell Surface**, v. 5, n. February, p. 100030, 2019.

PIETERSE, C. M. J. et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, p. 347–375, 2014.

REISSIG, G. N. et al. Fruit Herbivory Alters Plant Electrome: Evidence for Fruit-Shoot Long-Distance Electrical Signaling in Tomato Plants. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, n. July, p. 1–14, 2021.

- RODRIGUEZ-MORENO, L. et al. Tools of the crook- infection strategies of fungal plant pathogens. **Plant Journal**, v. 93, n. 4, p. 664–674, 2018.
- ROVENICH, H.; BOSHOVEN, J. C.; THOMMA, B. P. H. J. Filamentous pathogen effector functions: Of pathogens, hosts and microbiomes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 20, p. 96–103, 2014.
- SARAIVA, G. F. R.; FERREIRA, A. S.; SOUZA, G. M. Osmotic stress decreases complexity underlying the electrophysiological dynamic in soybean. **Plant Biology**, v. 19, n. 5, p. 702–708, 2017.
- SCHÄFER, P.; HÜCKELHOVEN, R.; KOGEL, K. H. The white barley mutant Albostrians shows a supersusceptible but symptomless interaction phenotype with the hemibiotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 4, p. 366–373, 2004.
- SCHMIDT, S. M. et al. Interaction of a *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* effector candidate with a barley ARF-GAP suggests that host vesicle trafficking is a fungal pathogenicity target. **Molecular Plant Pathology**, v. 15, n. 6, p. 535–549, 2014.
- SERRANO, M. et al. The cuticle and plant defense to pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. JUN, p. 1–8, 2014.
- SHAH, J. et al. Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. **Plant Journal**, v. 79, n. 4, p. 645–658, 2014.
- SHEN, Y. et al. The early response during the interaction of fungal phytopathogen and host plant. **Open Biology**, v. 7, n. 5, 2017.
- SIMMI, F. Z. et al. Electrome alterations in a plant-pathogen system: Toward early diagnosis. **Bioelectrochemistry**, v. 133, p. 107493, 2020.
- SOUZA, G. M. et al. Plant “electrome” can be pushed toward a self-organized critical state by external cues: Evidences from a study with soybean seedlings subject to different environmental conditions. **Plant signaling & behavior**, v. 12, n. 3, p. e1290040, 2017.
- SPOEL, S. H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 2, p. 89–100, 2012.
- SUKHOV, V. et al. Variation potential influence on photosynthetic cyclic electron flow in pea. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. JAN, p. 1–13, 2015a.
- SUKHOV, V. et al. Variation potential induces decreased PSI damage and increased PSII damage under high external temperatures in pea. **Functional Plant Biology**, v. 42, n. 8, p. 727–736, 2015b.

- SUKHOV, V.; SUKHOVA, E.; VODENEEV, V. Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 146, p. 63–84, 2019.
- SUKHOVA, E.; AKINCHITS, E.; SUKHOV, V. Mathematical Models of Electrical Activity in Plants. **The Journal of Membrane Biology**, v. 250, n. 5, p. 407–423, 2017.
- SUKHOVA, E.; SUKHOV, V. Electrical signals, plant tolerance to actions of stressors, and programmed cell death: Is interaction possible? **Plants**, v. 10, n. 8, p. 29–36, 2021.
- SUZUKI, N.; MITTLER, R. Reactive oxygen species-dependent wound responses in animals and plants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 12, p. 2269–2276, 2012.
- SZECHYŃSKA-HEBDA, M.; LEWANDOWSKA, M.; KARPIŃSKI, S. Electrical signaling, photosynthesis and systemic acquired acclimation. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–14, 2017.
- TILSNER, J. et al. Staying Tight: Plasmodesmal Membrane Contact Sites and the Control of Cell-to-Cell Connectivity in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 67, p. 337–364, 2016.
- TRUMAN, W. et al. Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 3, p. 1075–1080, 2007.
- VAN BEL, A. J. E. et al. Spread the news: Systemic dissemination and local impact of Ca^{2+} signals along the phloem pathway. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 7, p. 1761–1787, 2014.
- VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, n. 2, p. 85–97, 1999.
- VODENEEV, V. A.; KATICHEVA, L. A.; SUKHOV, V. S. Electrical signals in higher plants: Mechanisms of generation and propagation. **Biophysics**, v. 61, n. 3, p. 505–512, 2016.
- VOLKOV, A. G.; COLLINS, D. J.; MWESIGWA, J. Plant electrophysiology: Pentachlorophenol induces fast action potentials in soybean. **Plant Science**, v. 153, n. 2, p. 185–190, 2000.
- VOLKOV, A. G.; HAACK, R. A. Insect-induced bioelectrochemical signals in potato plants. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 37, n. 1, p. 55–60, 1995.

- ZEDADRA, O. et al. No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における 健康関連指標に関する共分散構造分析Title. **Sustainability (Switzerland)**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2019.
- ZIMMERMANN, M. R. et al. System Potentials, a Novel Electrical Long-Distance Apoplastic Signal in Plants, Induced by Wounding. **Plant Physiology**, v. 149, n. 3, p. 1593–1600, 2009.
- ZIPFEL, C. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. **Current Opinioi Plant Biology**, v. 12, n. 4, p. 414–420, 2009.