

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



Defesa de Tese

**ANÁLISE DE SINAIS SISTÊMICOS INDUZIDOS POR ESTÍMULOS ABIÓTICOS
SIMPLES E COMBINADOS EM PLANTAS DE FEIJÃO**

Ádrya Vanessa Lira Costa
Pelotas, 2022

Ádrya Vanessa Lira Costa

**ANÁLISE DE SINAIS SISTÊMICOS INDUZIDOS POR ESTÍMULOS ABIÓTICOS
SIMPLES E COMBINADOS EM PLANTAS DE FEIJÃO**

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

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Maia Souza

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C837a Costa, Ádrya Vanessa Lira

Análise de sinais sistêmicos induzidos por estímulos
abióticos simples e combinados em plantas de feijão /
Ádrya Vanessa Lira Costa ; Gustavo Maia Souza,
orientador. — Pelotas, 2022.

91 f. : il.

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

1. Electroma. 2. Sinalização sistêmica. 3. Sinal
hidráulico. 4. Estímulos simples/combinados. I. Souza,
Gustavo Maia, orient. II. Título.

CDD : 633.33

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Ádrya Vanessa Lira Costa

ANÁLISE DE SINAIS SISTÊMICOS INDUZIDOS POR ESTÍMULOS ABIÓTICOS SIMPLES E COMBINADOS EM PLANTAS DE FEIJÃO

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor (a) em Fisiologia Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 21/09/2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. Gustavo Maia Souza (Orientador)
Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita (UNESP)

Profª. Drª Eugênia Jacira Bolacel Braga
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Prof. Dr. Ernane José Xavier Costa
Doutor em Engenharia Elétrica pela Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Everton Granermann Souza,
Doutor em Física pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso
Doutor em Ciências Agrárias pela Universidade Federal de Viçosa (UFV)

Dedico este trabalho primeiramente a DEUS todo poderoso, a quem eu devo o dom da minha vida e das plantas com que trabalho.

A minha família, que mesmo distante sempre me incentivou e ajudou a seguir, em especial a minha avó que sempre lembrou de mim em suas orações.

A todos os meus colegas do curso de fisiologia vegetal.

A todos os professores do PPG em Fisiologia Vegetal, em especial ao meu orientador professor Gustavo Maia Souza e demais professores que colaboraram com a realização deste trabalho (William da Silva Barros e Arlan Silva Ferreira).

Agradecimentos

Primeiramente, a minha família, pois sem ela eu não teria tido condições de dar esse grande passo de literalmente atravessar o continente, saindo de Manaus e seguir rumo à Pelotas (RS) para fazer a minha pós-graduação. Agradeço por todo o empenho em me ajudar financeiramente, pelas ligações de saudade e preocupação, pela força nos momentos difíceis, pelas orações, por comemorarem cada etapa finalizada, mesmo eu não podendo aproveitar esses momentos. Isso tudo eu devo a vocês.

Agradeço a minha namorada Fernanda Viana por ser a minha calma no meio do caos, por todo apoio, perseverança e por sempre se fazer presente mesmo a distância. Você foi fundamental para a finalização dessa etapa.

Agradeço aos meus colegas e professores da pós e do LACEV por me acolherem tão bem, vocês superaram as minhas expectativas em relação a isso. Os churrascos do grupo, as apresentações de seminários, as aulas e as troca de ideias nos laboratórios e no corredor, todos estes momentos foram importantes no meu crescimento como fisiologista vegetal. Um agradecimento especial ao meu orientador professor Gustavo Maia pelo privilégio de compartilhar comigo uma outra forma de “enxergar” as plantas.

Agradeço aos amigos que fiz durante este período. Aos meus parceiros de trabalho e amigos do coração Thiago de Carvalho e Gabriela Reissing (pais da Éris), vocês foram fundamentais nesta tese, obrigada por me acolherem sempre de forma tão carinhosa e pelos momentos de descontração quando nos reuníamos. Ao meu amigo e parceiro de eletrofisiologia vegetal Gabriel de Toledo, pelo auxílio no laboratório e brejas acompanhadas de um bom papo (você é inesquecível, man!). A minha amiga Brunna Evellin por toda parceria nos trabalhos da pós, gordices e aquele empurrãozinho para seguir no doc. A minha amiga Marisa pela força nos momentos difíceis e pelas conversas sobre o futuro. Aos amigos e vizinhos Gabriel e Yutcélia, por me ajudarem nas avaliações bioquímicas e pelas noites de sopa e “Severo”. Aos amigos Douglas e Simone pelo carinho e disponibilidade nas vezes que precisei de ajuda no laboratório. E por fim, agradeço a amiga Chrislayne Yonara por todo carinho, apoio e risadas proporcionadas nesse doutorado.

E por fim, agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa doutorado e a UFPel pela acolhida durante todos esses anos.

“Não se espante com a altura do vôo. Quanto mais alto, mais longe do perigo. Quanto mais você se eleva, mais tempo há de reconhecer uma pane. É quando se está próximo do solo que se deve desconfiar”

Santos Dumont

RESUMO

COSTA, Ádrya Vanessa Lira. **Análise de sinais sistêmicos induzidos por estímulos abióticos simples e combinados em plantas de feijão.** 2022. 85f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

Para sobreviver num ambiente dinâmico estando fixas ao solo, as plantas desenvolveram mecanismos de monitoramento e percepção do ambiente. Uma vez que o estímulo é percebido, uma série de sinais são induzidos podendo ser propagados para longe do local estimulado (sinalização sistêmica). A literatura aborda principalmente três tipos distintos de sinais sistêmicos: (i) elétrico; (ii) hidráulico; e (iii) químico, que diferem não apenas em sua natureza, mas também em sua velocidade de propagação. Embora, boa parte dos estudos avaliem os sinais sistêmicos após a aplicação de estímulos simples, na natureza, as plantas encontram-se sob influência de dois ou mais estímulos (biótico ou abiótico). A combinação de estímulos pode promover a ativação de novos genes e mecanismos de sinalização que são explicitamente ativados, bem como, o surgimento de uma nova resposta. Neste sentido, este estudo teve o objetivo avaliar o comportamento dos sinais elétricos (electroma) e hidráulicos, após a aplicação de estímulos simples e combinados em plantas de feijão. Para análises foram aplicados estímulos simples e combinados, no intuito de identificar respostas bioquímicas e extração de informações de padrões da dinâmica elétrica e hidráulica. As alterações no perfil dos sinais bioelétricos (electroma) e hidráulicos (variação de pressão de turgor) foram avaliadas por meio de análises de séries temporais e classificação por aprendizado de máquinas (Machine learning), comparando as condições antes e após a aplicação dos estímulos, e as respostas oxidativas em nível local e sistêmico. Nossos resultados mostraram que as alterações no electroctroma são diferentes entre os tipos de estímulos, incluindo a combinação destes, e que estes sinais elétricos são acompanhados por mudanças sistêmicas na dinâmica hidráulica e oxidativa.

Palavras-chave: electroma, sinal hidráulico, estímulos simples/combinados, sinalização sistêmica.

ABSTRACT

COSTA, Ádrya Vanessa Lira. **Analysis of systemic signals induced by single and combined abiotic stimuli in bean plants.** 2022. 85f. Thesis (PhD in Plant Physiology) - Postgraduate Program in Plant Physiology, Department of Botany, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2022.

To survive in a dynamic environment being fixed to the ground, plants have developed mechanisms for monitoring and perceiving the environment. Once the stimulus is perceived, a series of signals are induced and can be propagated away from the stimulated site (systemic signaling). The literature mainly addresses three distinct types of systemic signals: (i) electrical; (ii) hydraulic; and (iii) chemical, which differ not only in their nature, but also in their propagation speed. Although most studies assess systemic signs after the application of simple stimuli, in nature, plants are under the influence of two or more stimuli (biotic or abiotic). The combination of stimuli can promote the activation of new genes and signaling mechanisms that are explicitly activated, as well as the emergence of a new response. In this sense, this study aimed to evaluate the behavior of electrical (electroctroma) and hydraulic signals, after the application of simple and combined stimuli in bean plants. For analysis, simple and combined stimuli were applied, in order to identify biochemical responses and extract information from patterns of electrical and hydraulic dynamics. Changes in the profile of bioelectrical (electroctroma) and hydraulic signals (turgor pressure variation) were evaluated by means of time series analysis and classification by machine learning, comparing the conditions before and after the application of the stimuli, and oxidative responses at the local and systemic levels. Our results showed that changes in electroctroma are different between types of stimuli, including the combination of these, and that these electrical signals are accompanied by systemic changes in hydraulic and oxidative dynamics.

Key-words: electroctroma, hydraulic signal, single/combined stimuli, systemic signaling.

Lista de figuras

Figura 1 - Esquema dos sinais de longa distância (elétrico, hidráulico e químico) presente nas plantas. As caixas representam subcategorias de tipos de sinalização. As setas indicam que todas as vias estão interligadas (Fonte da figura: HUBER e BAULER, 2016). _____ 20

Figura 2 - Representação da disposição das plantas dentro da gaiola de Faraday durante as medidas bioelétricas. As folhas local e sistêmica da planta controle e estimulada, estão delimitadas pelas bordas quadradas; os eletrodos (traços escuros pareados) estão delimitadas pelas bordas quadradas; os eletrodos (traços escuros pareados) estão dispostos no pecíolo das folhas. O raio representa o estímulo sendo aplicado na folha local. _____ 38

Figura 3 - Representação da sonda magnética de pressão de turgor foliar com seus componentes principais (Fonte da figura: ZIMMERMAN et al., 2013). _____ 39

Figura 4 - Representação da configuração experimental indicando o local de aplicação dos estímulos e onde a avaliação sistêmica dos sinais foram realizadas. A borda retangular em preto indica o local (tecido local) onde os diferentes estímulos foram aplicados. A ampulheta amarela representa a sonda de pressão de turgor que será instalada na folha sistêmica. Os dois traços cinzas sob o pecíolo das folhas, indicam a região de inserção dos eletrodos. _____ 42

Figura 5 - Disposição dos sistemas de iluminação usados nos experimentos. A esquerda o sistema de iluminação adaptado para o crescimento das plantas e a direita, o sistema de iluminação da gaiola de Faraday para aferição das medidas elétricas. _____ 43

Figura 6 - Posicionamento da fonte de luz usada para fornecer o estímulo de alta luminosidade em relação ao folíolo central imobilizado. _____ 44

Figura 7 - Esquema da configuração experimental para as medidas do electroma das plantas controle e estimuladas com os tratamentos HL5 e HL 10 dentro da gaiola de faraday. Os dois traços negros posicionados no pecíolo indicam a posição dos eletrodos nas plantas. _____ 44

Figura 8 - Imagem da câmera termográfica durante a aplicação de uma chama por 20s a uma distância de 10cm da folha local _____ 45

Figura 9 - Esquema da configuração experimental para as medidas do electoma das plantas controle e estimuladas com os tratamentos de corte (dentro da gaiola de faraday). Os dois traços negros posicionados no pecíolo indicam a posição dos eletrodos nas plantas. _____ 46

Figura 10 - Esquema da configuração experimental para as medidas do electoma das plantas controle e estimuladas com os tratamentos corte (Wounding) dentro da gaiola de faraday. Os dois traços negros posicionados no pecíolo indicam a posição dos eletrodos nas plantas. _____ 47

Figura 11 - Esquema da configuração experimental para as medidas do electoma das plantas controle e estimuladas com os estímulos combinados de ferimento e choque de calor (W+HS, em inglês) dentro da gaiola de faraday. Os dois traços negros posicionados no pecíolo indicam a posição dos eletrodos nas plantas. _____ 48

Figura 12 - Esquema da DRT. Na etapa 1 temos as séries temporais (TS1, TS2, ..., TSN) e o processo de divisão e armazenamento das informações das posições referentes ao tempo de cada corte (t1, t2, t3, t4). Na etapa 2, as características (F1, F2, F4, ..., Fn) são calculadas para cada corte e, juntamente com o resultado, as informações de tempo são virtualmente salvas. No estágio 3, as informações de tempo são usadas para cada geração e colocação em bins (agrupamento de dados). Com cada bin em seu lugar, a série temporal original é reconstruída, agora com os resultados de cada feature analisada. _____ 51

Figura 13 - Níveis de (a) peróxido de hidrogênio, (b) superóxido e (c) peroxidação lipídica de folhas locais (barras em verde) e sistêmicas (barras em vermelho) de plantas de feijão submetidas aos tratamentos controle (c), choque de luz por 5 (HL5) e 10 (HL10) minutos, ferimento (W), choque de calor (HS) e estímulo combinado de calor e ferimento (W+HS). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre o fator tratamento pelo teste de Tukey post hoc, enquanto as letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos em cada folha. O asterisco ao lado da letra indicadora da figura, indica interação entre os fatores através de two-way anova no parâmetro avaliado, enquanto o jogo da velha indica diferença entre folha local e sistêmica no parâmetro avaliado. $p \leq 0.05$; $n=4$. _____ 57

Figura 14 - Representação original das séries temporais antes e após os estímulos de a- b) alta luminosidade por 5 e 10 minutos (HL5 e HL10), c) corte (W) e d) choque térmico (HS) e e) estímulo combinado (W+HS) nas folhas local e sistêmica. Para facilitar a comparação, o tamanho total da série ($x = 1$ h) foi reduzida a 7,5 minutos de medida. O eixo y (ΔV) foi ajustado para cada situação. A linha tracejada em vermelha indica o momento de maior alteração do electroma após a estimulação. _____ 60

Figura 15 - Gráficos de TDAF para análise de ApEn das folhas locais (a à d) e sistêmicas (e à h) antes e depois do tratamento de 5 e 10 minutos de Luz (HL5 e HL10) e seus respectivos grupos controle (C). _____ 62

Figura 16 - Gráficos de TDAF para análise de ApEn para as folhas locais. Em (a) resultado para o estímulo de corte (W), (b) choque de calor (HS) e (c) para o estímulo combinado (W+HS). De (d) à (f) temos os resultados para as plantas controles (C) de cada estímulo. _____ 63

Figura 17- Gráficos de TDAF para análise de ApEn para as frequências nas folhas sistêmicas. Em (a) resultado para o estímulo de corte (W), (b) choque de calor (HS) e (c) para o estímulo combinado (W+HS). De (d) à (f) temos os resultados para as plantas controles de cada estímulo. _____ 64

Figura 18 - Gráficos de TDAF para análise de DFA das folhas locais (a à d) e sistêmicas (e à h) antes e depois do tratamento de 5 e 10 minutos de Luz (HL5 e HL10) e seus respectivos grupos controle (C). _____ 66

Figura 19 - Gráficos de TDAF para análise de DFA para as folhas locais. Em (a) resultado para o estímulo local corte (W), (b) choque de calor (HS) e (c) para o estímulo combinado (W+HS). De (d) à (f) temos os resultados para as plantas controles de cada estímulo. _____ 66

Figura 20 - Gráficos de TDAF para análise de DFA para as frequências nas folhas sistêmicas. Em (a) resultado para o estímulo local corte (W), (b) choque de calor (HS) e (c) para o estímulo combinado (W+HS). De (d) à (f) temos os resultados para as plantas controles de cada estímulo. _____ 67

Figura 21 - Gráficos de TDAF para análise de ABP para as frequências low e Delta das folhas locais (a à d) e sistêmicas (e à h) antes e depois do tratamento de 5 e 10 minutos de Luz (HL5 e HL10) e seus respectivos grupos controle (C). _____ 69

Figura 22 - Gráficos de TDAF para análise de ABP para as frequências low e Delta das folhas locais. Em (a) resultado para corte (W), em (b) choque de calor (HS), em (c) Corte+choque de calor (W+HS). Para (d), (e) e (f) temos o resultado para as plantas controles do corte C(W), choque de calor C(HS) e corte+choque de calor C(W+HS) respectivamente. _____ 70

Figura 23 - Gráficos de TDAF para análise de ABP para as frequências low e Delta sistêmicas. Em (a) resultado para corte (W), em (b) Fogo (HS), em (c) Corte+choque de calor (W+HS). Para (d), (e) e (f) temos o resultado para as plantas controles do corte C(W), fogo C(HS) e corte+choque de calor C(W+HS) respectivamente. _____ 71

Figura 24 - Na matriz de confusão (a e c) encontramos os maiores valores de acurácia obtidos para classificação de x vs y para os grupos tla, tld, tsa, tsd, cla, cld, csa e csd. Na matriz de confusão (b e d) encontramos os maiores valores de acurácia obtidos pelo método Dummy para x vs y para os grupos tla, tld, tsa, tsd, cla, cld, csa e csd. A escala de cores vai de 0% a 100% de acurácia. _____ 72

Figura 25 - Na matriz de confusão (a) encontramos os maiores valores de acurácia obtidos para classificação de x vs y para os grupos tla, tld, tsa, tsd, cla, cld, csa e csd. Na matriz de confusão (b) encontramos os maiores valores de acurácia obtidos pelo método Dummy para x vs y para os grupos tla, tld, tsa, tsd, cla, cld, csa e csd. A escala de cores vai de 0% a 100% de acurácia. _____ 73

Figura 26 - Na matriz de confusão (a) encontramos os maiores valores de acurácia obtidos para classificação de x vs y para os grupos tla, tld, tsa, tsd, cla, cld, csa e csd, para o tratamento de choque de calor (HS). Na matriz de confusão (b) encontramos os maiores valores de acurácia obtidos pelo método Dummy para x vs y para os grupos tla, tld, tsa, tsd, cla, cld, csa e csd. A escala de cores vai de 0% a 100% de acurácia. _____ 74

Figura 27 - Na matriz de confusão (a) encontramos os maiores valores de acurácia obtidos para classificação de x vs y para os grupos tla, tld, tsa, tsd, cla, cld, csa e csd, para o tratamento combinado de ferimento + choque de calor (W+HS). Na matriz de confusão (b) encontramos os maiores valores de acurácia obtidos pelo método Dummy para x vs y para os grupos tla, tld, tsa, tsd, cla, cld, csa e csd. A escala de cores vai de 0% a 100% de acurácia. _____ 75

Figura 28 - Medidas de variação de pressão de turgor das folhas sistêmicas ao longo de 2h. A pressão hidráulica é representada como uma porcentagem da pressão de turgência inicial aos 0s. Os estímulos (a, b, c, d, e, f) foram aplicados após 1h de medida (representado por uma reta tracejada em laranja). Em cada gráfico, constam a média de 6 repetições biológicas (n=6) para os estímulos de alta luminosidade (HL em inglês) por 5, e 10 minutos, choque térmico (HS em inglês), ferimento (Wounding) e estímulos combinados (W+HS). Os coeficientes de variação médios foram obtidos para os dados antes (C.V.A) e depois (C.V.D). _____ 77

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2 HIPÓTESE	18
3 OBJETIVO GERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4 ESTADO DA ARTE	19
TIPOS DE SINAIS ELÉTRICOS	22
• POTENCIAL DE AÇÃO (PA)	22
• POTENCIAL DE VARIAÇÃO (PV)	23
• POTENCIAL SISTÊMICO (PS)	23
ELECTROMA	24
SINAL HIDRÁULICO	26
SINAIS QUÍMICOS	29
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)	29
INTEGRAÇÃO DOS SINAIS SISTÊMICOS	31
ESTUDOS COM ESTRESSES SIMPLES E COMBINADOS.....	32
5 METODOLOGIA	35
AQUISIÇÃO DOS DADOS.....	36
ELETROFITOGRAMA (EFG).....	36
MEDIDAS DE VARIAÇÃO DE TURGOR (ZIM-PROBE).....	38
QUANTIFICAÇÃO DE ROS E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	40
CONTEÚDO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2)	40

MEDIDAS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	40
EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DOS SINAIS SISTÊMICOS INDUZIDOS POR ESTÍMULOS SIMPLES.....	41
EXPERIMENTO II - AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DOS SINAIS SISTÊMICOS INDUZIDOS POR ESTÍMULOS COMBINADOS.....	47
6 ANÁLISES.....	48
ANÁLISES ELETROFISIOLÓGICAS.....	48
INSPEÇÃO VISUAIS	49
ANÁLISE DE DISPERSÃO NO TEMPO DAS FEATURES (DTF)	49
DENTRENDED FLUCTUATION ANALYSIS (DFA)	52
POTÊNCIA MÉDIA DA BANDA (AVERAGE BAND POWER – ABP)	52
ENTROPIA APROXIMADA.....	53
APRENDIZADO DE MÁQUINA (<i>ML</i>) PARA CLASSIFICAÇÃO DE SINAIS.....	54
7 - RESULTADOS.....	56
8 DISCUSSÃO.....	77
9 CONCLUSÃO.....	82
10 REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO GERAL

A condição séssil das plantas impede-as de fugirem de situações potencialmente prejudiciais. Portanto, a evolução de sistemas de monitoramento e mecanismos de resposta a vários estímulos foi necessária para a sobrevivência nessa condição, possibilitando-as se desenvolver e multiplicar (KOLLIST et al., 2019).

As mudanças ambientais podem condicionar as plantas a situações estressantes desencadeadas por fatores bióticos (por exemplo, ataque de herbívoros, infecção por patógenos) ou abióticos (temperatura, umidade, luz, precipitação) (CHEUNG et al., 2020; KOLLIST et al., 2019). Essas alterações podem ocorrer de forma gradual, como a lenta redução no conteúdo de água no solo, ou rápidas, como feixes de sol em dias nublados provocando mudanças abruptas na intensidade da luz (KOLLIST et al., 2019, DEVIREDDY et al., 2020). Além disso, sua organização modular possibilita que cada parte (folhas, raízes, galhos, etc.) experimente essas mudanças de forma não simultânea (MITTLER e BLUMWALD, 2010; BALFAGÓN et al., 2019)

Mesmo que essa percepção inicial ocorra de forma não homogênea, a parte da planta afetada pelo estímulo (tecido local) responde de forma rápida, e ativa sinais capazes de alcançar outras partes não estimuladas (tecido sistêmico) (Johns et al., 2021). Estes sinais propagados a partir do tecido local promovem respostas moleculares, metabólicas e fisiológicas à distância, resultando em processos de aclimatação que, dependendo do estímulo, induzem respostas específicas como a aclimatação sistêmica adquirida (SAA, em inglês) induzida por estresse abiótico ou resistência sistêmica adquirida (SAR, em inglês) resultante do ataque de patógenos (DEVIREDDY et al., 2018; ZANDALINAS et al., 2019; KOLLIST et al., 2019),

Estes sinais internos de longa distância capazes de levar a tais respostas sistêmicas, viajam através dos vasos condutores do xilema e do floema proporcionando a manutenção da estabilidade da planta inteira sob condições estressantes (FICHTMAN e MITTLER, 2020; JOHNS et al., 2021). A participação de diferentes vias de sinalização sistêmica é fundamental para os processos de aclimatação, e existem várias moléculas de sinalização química usadas para realizar a sinalização sistêmica, indo de hormônios e peptídeos móveis a metabólitos e RNAs, além de outros sinais atuando em paralelo

com estes, como as espécies reativas de oxigênio (ROS), sinais elétricos e hidráulicos (KOLLIST et al., 2019; FICHTMAN et al., 2019; MARCEC et al., 2019).

Uma resposta sistêmica rápida depende de um sistema de sinalização que integre diferentes tipos de sinais sistêmicos. Estudos apontam a participação dos sinais hidráulicos e elétricos como protagonistas nessa sinalização rápida de longa distância, devido sua alta velocidade de propagação após a aplicação dos estímulos (HUBER e BAUERLE, 2016; SUKHOVA e SUKHOV, 2021; JOHS et al., 2021).

A rede de sinais sistêmicos rápidos que se propagam por toda a planta durante as tensões (estímulos), pode transmitir diferentes tipos de sinais de resposta, e estes podem ou não estar ligados entre si, dependendo do tipo de estímulo que os desencadeia. Esta observação foi evidenciada no trabalho de Fichtman e Mittler (2021), em que os sinais hidráulicos e elétricos sistêmicos mostram ser dependentes das proteínas semelhantes ao receptor de glutamato (GLR) após o ferimento, enquanto após um tratamento de alta luminosidade apenas o sinal elétrico mostrou dependência ao GLR, mostrando que os mecanismos que integram estes sinais sistêmicos são distintos durante os diferentes estímulos. Portanto, o que se vê é que cada tipo de estímulo abiótico ou biótico irá desencadear sua própria sinalização sistêmica e respostas de aclimatação que incluem o acúmulo de muitos transcritos e metabólitos específicos, bem como a resposta estomática coordenada de todo o dossel (SUZUKI et al., 2014; DEVIREDDY et al., 2020).

Os estudos de estresse em laboratório tradicionalmente focam em apenas uma resposta definida a um único estímulo. Contudo, em condições naturais as plantas encontram-se frequentemente sob diferentes condições de estresse ambiental ao mesmo tempo, ou seja, diferentes “combinações de estresse”. Experimentos de combinação de estresse (ou seja, combinação de dois ou mais fatores de estresse), revelaram que as plantas respondem à essas combinações de forma única, e que essas respostas não podem ser previstas pelo estudo de respostas a cada um dos diferentes estresses individuais (BALFAGÓN et al., 2019; ZANDALINAS et al., 2020).

Foi demonstrado que a aclimatação a combinação de estresses (induzidos por seca e calor) envolve a integração de respostas a cada um dos estresses individuais que impactam simultaneamente a planta, bem como a indução de um novo tipo de resposta, às vezes envolvendo milhares de transcritos únicos para a combinação do

estado de estresse (SUZUKI et al., 2014; BALFAGÓN et al., 2019). No trabalho de ZANDALINAS et al. (2020) foram encontrados transcritos específicos de cada estímulo e novos transcritos foram identificados quando os estímulos de calor e luz foram combinados.

Trabalhos avaliando como os sinais sistêmicos se comportam sob condições de estresse combinado ainda são escassos na literatura e geralmente são realizados em plantas modelo como *Arabidopsis*. Contudo, avaliar como esses sinais em conjunto atuam em plantas cultivadas, como soja ou feijão, podem nos indicar uma dinâmica diferente destes. Portanto, este estudo teve como foco descrever o comportamento de diferentes sinais sistêmicos induzidos por estímulos abióticos simples e combinados em plantas de feijão preto sob condições controladas.

2 HIPÓTESE

Considerando que a estimulação local é capaz de induzir uma sinalização sistêmica integrando diferentes tipos de sinais e respostas estresse-específicas, testaremos a hipótese que a aplicação local de estímulos abióticos simples e combinados induzem alterações específicas na dinâmica elétrica (electroma) e hidráulica, capazes de se propagarem a longas distâncias em plantas de feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.).

3 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo caracterizar a dinâmica elétrica (electroma) e hidráulica sistêmicas de plantas de feijão preto, e identificar diferenças entre a dinâmica das séries temporais obtidas para os estímulos simples e combinados.

Objetivos específicos

- Identificar através de diferentes análises de séries temporais, o comportamento do sinal quanto a aplicação dos diferentes estímulos.

- Avaliar as diferenças entre a dinâmica elétrica presente nas folhas locais e sistêmicas.
 - Identificar se através do método de machine learning é possível obter diferenças entre as series antes e depois da aplicação de cada estímulo e entre os estímulos.
 - Avaliar o comportamento do sinal hidráulico após a aplicação de cada estímulo.
 - Comparar os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) entre os diferentes estímulos e entre as regiões local e sistêmica.

4 ESTADO DA ARTE

As plantas, por serem organismos sésseis, precisam lidar com um ambiente dinâmico e complexo. Essas condições conduziram ao surgimento de mecanismos de monitoramento ambiental que permitem a percepção do ambiente e a integração das informações obtidas, resultando numa resposta adequada de toda a planta (JOHNS et al., 2021).

Para responder ao ambiente, as plantas requerem sistemas de percepção e sinalização. Esses estímulos externos são percebidos primeiramente por diferentes tipos de sensores presentes na membrana plasmática das células. Nas plantas, os receptores de membrana mais bem caracterizados são: as enzimas receptoras transmembranares (geralmente quinases) e os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (TUTEJA e SOPROY, 2008).

Uma vez que o estímulo é percebido pelos receptores da (s) célula (s) estimulada (s), uma série de sinais são induzidos podendo ser propagados para as células ou tecidos adjacentes (sinalização local) ou regiões mais distantes do local estimulado (sinalização sistêmica) (BALUSKA et al., 2006).

Essa sinalização de longa distância é crítica, pois embora alguns estímulos, como mudanças na temperatura do ar ou transições dia/noite atuem de forma simultânea nas partes aéreas, sinais ambientais como herbivoria, toque ou ataque de patógenos são percebidos localmente, mas as respostas que eles provocam são geralmente propagadas por todo o corpo da planta (CHOI et al., 2016). Dessa forma,

os órgãos que não recebem diretamente o estímulo respondem a esses sinais de longo alcance induzidos pelo tecido estimulado.

Os sinais sistêmicos de longa distância permitem essencialmente que a planta se prepare para os desafios futuros, e as repostas desencadeadas podem ser divididas em duas classes principais: resistência sistêmica adquirida (SAR em inglês), normalmente desencadeada por patógenos; e aclimatação sistêmica adquirida (SAA em inglês) induzida por estímulos abióticos (SUZUKI et al., 2013, GILROY et al., 2016).

A literatura aborda principalmente três tipos distintos de sinais de longa distância: (i) elétrico; (ii) hidráulico; e (iii) químico, que diferem não apenas em sua natureza, mas também em sua velocidade de propagação (Figura 1). Para responder aos diferentes estímulos ou estressores, as plantas podem empregar estas diferentes vias de sinalização e usam ‘reguladores principais’, como fatores de transcrição ou turgor/ osmossensores para interconectar essas vias (CHRISTMANN et al., 20013; HUBER e BAUERLE, 2016).

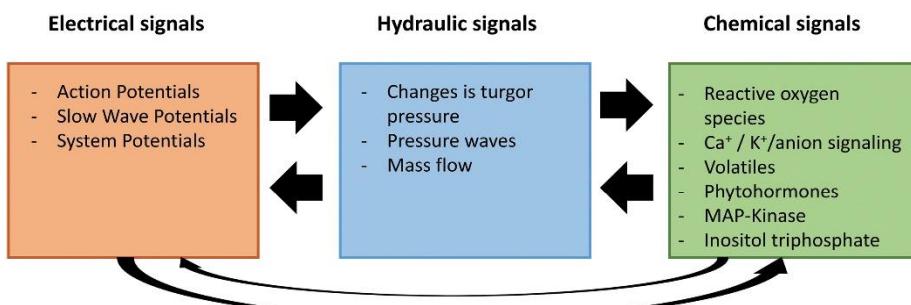


Figura 1 - Esquema dos sinais de longa distância (elétrico, hidráulico e químico) presente nas plantas. As caixas representam subcategorias de tipos de sinalização. As setas indicam que todas as vias estão interligadas (Fonte da figura: HUBER e BAULER, 2016).

Aqui, faremos um aprofundamento teórico sobre sinais elétrico e hidráulico que serão avaliados nesse estudo, e uma breve revisão sobre os sinais químicos focando na sinalização de ROS, seguida de uma abordagem referente a integração destes sinais e os estudos sobre estresses simples e combinados.

Sinal Elétrico

A geração de sinais elétricos em plantas é bastante fundamentada na literatura científica e as pesquisas sobre o tema dos fenômenos eletroquímicos nas plantas é genericamente conhecida como eletrofisiologia de plantas (VOLKOV, 2006), a qual teve seu início a cerca de 200 anos atrás.

O primeiro registro de um potencial de ação (PA) em plantas foi realizado em 1873 pelo fisiologista Sir John Burdon-Sanderson, na Inglaterra, em folhas da planta carnívora *Dionea muscipula*. Anos depois, a descoberta de que plantas comuns “não sensíveis” também propagavam PAs (GUNAR; SINYKHIN 1962), promoveu um avanço científico com importantes consequências, refutando a crença de que apenas as plantas sensíveis eram capazes de responderem ao ambiente.

Estas descobertas conduziram estudos destinados a compreender o significado dos sinais elétricos que se distribuem nos diferentes tecidos vegetais levando informações importantes com maior relevância do que a indução de movimento de órgãos em plantas sensíveis (PICKARD, 1973). No ano de 1984, foram descobertos os canais iônicos em plantas, a base para os sinais elétricos (SCHROEDER; HEDRICH; FERANDEZ 1984). Já no início do século 20, um outro tipo de sinal elétrico, denominado potencial de variação (PV) e exclusivo nas plantas, foi observado após estímulos de queima e corte, tendo este sinal por característica uma propagação lenta (DAVIES et al., 1991).

A capacidade de geração dos sinais elétricos só é possível devido à um desequilíbrio de íons através da membrana plasmática levando a uma tensão transitória promovida pelo fluxo de íons através de estruturas transmembranares conhecidas como canais iônicos e bombas eletrogênicas (VOLKOV, 2006; HUBER e BAUERLE, 2016). Sob uma condição não estimulada, o potencial gerado por essa diferença de cargas entre a região interna e externa da membrana, chamado potencial de repouso ou potencial de membrana, tende a ser mantido em torno de -2 mV a - 200 mV (GUROVICH, 2012).

A abertura ou o fechamento dos canais iônicos por estímulos, podem induzir uma mudança do estado de repouso da membrana, provocando uma despolarização da membrana, seguida de eventos de repolarização e hiperpolarização (SUKHOV et al., 2019; SUKHOVA e SUKHOV, 2021). A despolarização é resultante do influxo de Ca²⁺ na célula provocando o aumento da sua concentração intracelular, que por sua

vez irá ativar os canais de cloro induzindo um efluxo de Cl^- para a região extracelular. O potencial gerado na etapa de despolarização ativa os canais de K^+ dependentes de potencial promovendo um efluxo de K^+ , contribuindo para a repolarização (VODENEEV et al., 2015; SUKHOV et al., 2019). A hiperpolarização seria uma tensão interna mais negativa devido ao lento fechamento dos canais de K^+ (VODENEEV et al., 2015). Portanto, uma alta mudança no potencial de membrana cria uma onda de despolarização que percorre toda a membrana gerando um sinal elétrico que pode ser propagado para as células adjacentes (VODENEEV et al., 2015; SUKHOVA e SUKHOV, 2021).

Os sinais elétricos podem se propagar em segundos ou minutos após o estímulo porque apresentam uma velocidade típica variando em várias centenas de $\mu\text{m s}^{-1}$ a vários cm s^{-1} ou mais (SUKHOV et al., 2019). Isso indica, que estes sinais, (assim como os sinais hidráulicos) participam na indução de respostas fisiológicas sistêmicas iniciais após a ação dos estímulos.

A maioria dos trabalhos em eletrofisiologia, em geral, classificam dois tipos de sinais elétricos em plantas capazes de viajarem a longas distâncias: potenciais de ação (PA) e variação de potencial (VP) (WANG et al., 2009; HUBER e BAUERLE, 2016). Além destes dois sinais, um outro tipo de sinal elétrico, denominado potencial sistêmico (PS) foi relatado (ZIMMERMANN et al., 2013). Estes tipos de sinais parecem complementar outros sinais da planta: hidráulicos, mecânicos, voláteis e hormonais, já bem documentados na biologia vegetal (FROMM; LAUTNER, 2007; HUBER e BAUERLE, 2016; JOHS et al., 2021).

Tipos de sinais elétricos

- Potencial de ação (PA)**

O potencial de ação é um sinal auto-propagado que consiste em um pico de potencial elétrico de curto prazo na membrana plasmática e que opera sob uma lei de tudo ou nada, ou seja, uma vez que a despolarização ultrapassa um limiar do potencial de membrana esse sinal será propagado com velocidade e amplitude constantes (SUKHOVA et al., 2017; 2021). Esse pode se propagar a curtas distâncias através dos

plasmodesmos e, conforme o sinal é transmitido de uma célula a outra, ele pode atingir o complexo de células de tubo crivado/companheiras permitindo sua propagação a longas distâncias via floema (FROMM; LAUTNER 2007; CHOI et al., 2016).

Nas plantas superiores, durante a fase de despolarização o aumento de Ca^{2+} no citoplasma causa uma inativação reversível da H^+ - ATPase da membrana que posteriormente são rapidamente reativadas na fase de repolarização (VODNEEV et al., 2015; SUKHOV, 2016).

- **Potencial de variação (PV)**

O potencial de variação é um tipo de sinal não auto-propagado de longo prazo baseado num sistema sensitivo mecânico geralmente induzido por estímulos drásticos (queima, dano mecânico, etc), apresentando despolarização mais prolongada e picos de curta duração semelhantes ao PA, resultando na sua forma irregular. Diferente do PA, presente em plantas e animais, ele é característico das plantas e acredita-se que o PV seja uma resposta elétrica local a propagação de um sinal não elétrico (onda hidráulica, sinais químicos ou a combinação dos dois) que ativam canais de Ca^{2+} mecanossensíveis e/ou dependente de ligante, induzindo a despolarização (VODNEEV et al., 2015).

Após o PV ser gerado na membrana plasmática das células do parênquima adjacentes aos feixes do xilema, este sinal propaga-se pelo xilema e pode vir a ultrapassar os plasmodesmos e deslocar-se em direção ao floema (FROMM; LAUTNER, 2007; FROMM et al., 2013). A amplitude do PV é dependente da intensidade do estímulo e a velocidade é reduzida conforme se distancia do local estimulado (SUKHOVA e SUKHOV, 2021).

- **Potencial sistêmico (PS)**

Os potenciais sistêmicos (PSs), são sinais de hiperpolarização de longo prazo em plantas superiores identificado em 2009 (ZIMMERMANN et al., 2009). Este sinal ainda é pouco investigado, sendo o seu principal mecanismo de geração, a ativação transitória de H^+ - ATPases na membrana plasmática. No entanto, estudos recentes suportam a participação dos canais de C^{2+} e K^+ na geração do sinal. PS é considerado

um sinal autopropagado, e sabe-se que é acompanhado por uma diminuição na concentração de Ca²⁺ no apoplasto (SUKHOV et al., 2019)

Electroma

O electroma, um novo termo em analogia ao genoma, proteoma, transcriptoma, descreve a totalidade das correntes iônicas em diferentes escalas de organização nos organismos (electroma celular, electroma de tecido, electroma de órgãos e electroma de organismos), portanto, este termo inclui as correntes iônicas associadas a PAs e PVs e outras que se propagam através do citoesqueleto numa mesma escala temporal (DE LOOF, 2016). Este mesmo termo foi utilizado por Souza et al. (2017) e de Toledo et al., (2019), como referência para medidas eletrofisiológicas em tecidos de plantas. Ainda, segundo De Loof (2016), o sistema formado pela membrana plasmática com seus canais e bombas iônicas que estão ancorados pelo citoesqueleto do citoplasma, ao qual está conectado ao esqueleto da actina nuclear e as moléculas de DNA associadas a ele, formam um complexo membrana-citoesqueleto-DNA que integra e processa sinais elétricos e moleculares que podem armazenar informações e promover uma memória genética e cognitiva.

A corrente elétrica gerada pelo movimento de íons através da membrana pode ser medida por técnicas adequadas de registro, consistindo em duas diferentes técnicas usadas para captar os sinais elétricos em plantas: o método invasivo e o método não invasivo. O método invasivo apresenta a vantagem de captar os potenciais de membrana diretamente das células, livres de artefatos e ruídos externos, mas, em contrapartida, apresenta o inconveniente de ter um eletrodo inserido dentro da célula, pois a presença do eletrodo pode produzir mudanças na condição elétrica original (VOLKOV, 2012). A medida de potencial extracelular na superfície de plantas permite detectar diferenças de potencial elétrico por longos períodos, no entanto, é um tipo de medida menos precisa se comparado ao método intracelular (FROMM; LAUTNER, 2007).

A realização das medidas extracelulares em plantas utiliza dispositivos de amplificação usados para captar sinais bioelétricos em animais, como os usados em eletroencefalograma (EEG) e eletrocardiograma (ECG). Neste tipo de medida podem

ser utilizados eletrodos de superfície ou a inserção de eletrodos metálicos finos no tecido vegetal com uma relação sinal/ruído baixa, sendo necessário um período de aclimatação aos eletrodos pois a inserção destes provoca reações de injúria (VOLKOV et al., 2000; FROMM; LAUTNER, 2007; de TOLEDO et al., 2019).

Os sinais elétricos podem carregar informações a longas distâncias de um órgão a outro, permitindo ajustar seus processos metabólicos e fisiológicos, promovendo uma resposta adequada frente aos estímulos (GALLÉ et al., 2015, CHOI et al., 2017; SUKHOVA et al., 2021). Devido sua rapidez, os sinais elétricos podem preceder sinais químicos, como exemplo, a propagação de um sinal elétrico após uma injúria causada por um inseto, promovendo repostas a nível de expressão gênica (WILDON et al., 1992). Além disso, os sinais elétricos possuem um papel fisiológico importante na absorção de nutrientes, respiração, fotossíntese (KOZIOLEK et al., 2004; LAUTNER et al., 2005), transporte no floema (FROMM & BAUER, 1994), expressão gênica (GALLÉ et al., 2015) entre outros.

É importante compreender que as plantas, assim como os animais, apresentam uma dinâmica elétrica característica sob condições estressantes e não estressantes e as análises de séries temporais têm permitido relacionar as variações da dinâmica elétrica ao estado da planta sob diferentes condições (SOUZA et al., 2017; SARAIVA et al., 2017; SIMMI et al., 2020; PARISE et al., 2021).

Um conjunto de observações, medidas ou valores obtidos num determinado intervalo de tempo é considerado uma série temporal. Segundo Morettin e Toloi (2004), através desta análise pode-se investigar o mecanismo gerador da série temporal, fazer previsões sobre os valores futuros da série, e caracterizar seu comportamento permitindo identificar tendências ou sazonalidades.

Nos organismos vivos, as séries temporais tendem a apresentar uma dinâmica não linear, variando em complexidade e regularidade, que pode ser avaliada, por exemplo, adotando abordagens matemáticas como a Entropia Aproximada (ApEn). Segundo Costa et al. (2005), a entropia permite realizar uma comparação entre o grau de complexidade de diferentes séries temporais, com aplicações importantes na fisiologia e medicina, para discriminar séries temporais geradas por sistemas diferentes ou pelo mesmo sistema sob condições diferentes.

Estudos recentes analisando o electroma vegetal (SARAIAVA et al., 2017; SIMMI et al., 2020, PARISE et al., 2021, REISSING et al., 2021a, 2021b), mostram seu potencial como ferramenta para o diagnóstico de estresse em plantas, uma vez que o eletroma exibe respostas com padrão específico que funcionam como uma “assinatura elétrica” capaz de ser classificada por técnicas padrão de análise de séries temporais, incluindo aprendizado de máquina (PEREIRA et al., 2018; PARISE et al., 2021, REISSING et al., 2021a, 2021b).

Sinal hidráulico

A água é o meio de conexão entre os órgãos da planta, permitindo a troca de nutrientes e manutenção dos processos metabólicos, além de ser uma via muito eficiente para a troca rápida de informações. As plantas atuam como integrantes do movimento global da água, também conhecido como sistema solo-planta-atmosfera (STEUDLE, 2001). Em resumo, as plantas realizam a translocação de água do solo para a atmosfera através dos tecidos vegetais orientados por um gradiente de potencial hídrico (Ψ_w), com valores mais baixos nas folhas (CHRISTIMANN et al., 2013). Portanto, as diferenças no potencial da água Ψ_w determinam a direção do seu fluxo, que flui para o meio com Ψ_w mais negativo.

O sinal hidráulico é resultante das mudanças no Ψ_w , que por sua vez é propagado através das conexões hidráulicas do xilema, possibilitando a transmissão do sinal hidráulico a longas distâncias na forma de uma onda de pressão (CHRISTIMANN et al., 2013). Essa onda hidráulica pode ser rápida, viajando na velocidade do som (MALONE, 1993), mas para ser fisiologicamente importante este sinal deve causar uma mudança significativa na pressão de turgor dentro da célula.

O turgor celular irá mudar apenas quando um influxo forte (ou efluxo) de água ocorrer. Logo, o sinal hidráulico deve envolver um fluxo de água significante; por exemplo, para aumentar a pressão de turgor na célula foliar em 1 bar, deve ocorrer um influxo líquido de água equivalente a 1 – 5% do volume total de uma folha (MALONE, 1996).

O fluxo de massa associado com o sinal hidráulico pode ser dividido em dois componentes: axial e radial (MALONE, 1996). O principal, caracterizado por uma longa via axial, tem uma taxa de fluxo volumétrico aproximada pela lei de Hage-Poiseuille que considera: a taxa volumétrica do fluxo, o raio do tubo, o gradiente de pressão, viscosidade cinemática do fluido e o comprimento do tubo. A viscosidade da água dentro dos vasos varia de valores desprezíveis (com solutos diluídos), a valores mais altos (com solutos concentrados). O fluxo é proporcional a quarta potência do diâmetro do capilar (vaso do xilema), logo um ligeiro aumento no diâmetro do vaso causa um aumento considerável na condutividade e, portanto, no sinal hidráulico. O componente menor é definido como uma via radial curta através de células em cada extremidade do fluxo, que apresentam maior resistência hidráulica do que a via axial (STAHLBERG et al., 2006).

Os sinais hidráulicos controlam o comportamento fisiológico das plantas diariamente, através da regulação da expansão celular que são principalmente controladas pela pressão de turgência da célula. Essas mudanças de pressão se originam nos vasos do xilema e, devido à baixa resistência axial, podem ser propagadas rapidamente para as células circundantes (BRAMLEY et al., 2007) e em toda a planta. No entanto, as alterações de pressão não são percebidas pelas células mortas do xilema e, portanto, devem ser decodificadas pelas células do parênquima adjacentes (CHRISTIMANN et al., 2013).

As células do parênquima podem perceber e sofrer alterações de pressão (mudança de turgor) por meio de paredes celulares elásticas e resistentes (TYREE e YANG, 1990; CHRISTIMANN et al., 2013). Na maioria dos casos, a mudança no turgor celular é apenas um subproduto secundário das mudanças iniciais na tensão dentro dos vasos do xilema, e ocorre após a alteração da tensão da seiva do xilema, resultando no movimento da água para dentro ou para fora das células buscando o equilíbrio do potencial hídrico (TYREE e YANG, 1990; LOPEZ et al., 2014).

Dependendo do estressor imposto, as mudanças de pressão podem ser positivas, através de uma expansão do fluido do xilema, ou negativas, devido a um aumento de tensão na coluna da seiva do xilema, como resultado de uma diminuição no gradiente de potencial de água dentro da planta (HUBER e BAUERLE, 2016). A tensão do xilema pode ser alterada positivamente (diminuição da tensão do xilema ou

pulsos de pressão), pelo aquecimento ou queima das folhas (STAHLBERG e COSGROVE, 1997), ou realocação de água através da flexão mecânica pelo vento ou meios artificiais (LOPEZ et al., 2014). Já as alterações negativas da tensão do xilema (aumento da tensão) podem ser causadas por estressores abióticos como o estresse salino e hídrico (BRÉDA et al., 2006). Durante o estresse osmótico ou hídrico, o início do sinal é na raiz, primeiro órgão exposto à escassez de água, e transmitido através do caule para as folhas onde as células do parênquima percebem o sinal (CHRISTMANN et al., 2013) e iniciam a produção do ácido abscísico (ABA) para iniciar o fechamento estomático (BAUER et al., 2013).

As células do parênquima são capazes de traduzir os sinais hidráulicos em um sinal fisiológico com a ajuda de diferentes sensores hidráulicos. Vários sensores diferentes evoluíram para detectar as forças mecânicas induzidas pelo turgor. Entre os sensores de turgor estão os canais mechanossensíveis, como MscS e MscL (canais mechanossensíveis de pequena/grande condutância). Quando o turgor aumenta sob condições hipoosmóticas, eles percebem forças de estiramento atuando na membrana plasmática para permitir a rápida liberação de solutos e água da célula (HASWELL et al., 2011). MscS, mas não homólogos de MscL, foram encontrados em todos os genomas de plantas examinados até o momento. O genoma de *Arabidopsis* codifica dez proteínas relacionadas ao MscS, duas das quais, MSL2 e MSL3, parecem desempenhar um papel de osmoproteção de plastídeos semelhante ao papel do MscS (HASWELL et al., 2011).

Outros possíveis sensores são a quinase AHK1 (REISER et al., 2003), sensores envolvidos na via de integridade da parede celular (CWI), critico durante a germinação do pólen onde a entrada do gametófito masculino no gametófito feminino desencadeia um aumento de turgor na região apical do tubo polínico, resultando no rompimento da ponta (AMIEN et al., 2010). As quinases semelhantes a receptor (RLKs) pertencentes à família RLK1 de *Catharanthus roseus* (GUO et al., 2009), estão envolvidas no controle do turgor e têm domínios extracelulares que medeiam a ligação de carboidratos na parede celular.

Em *Arabidopsis* também foram detectadas proteínas quinases associadas à parede celular (WAKs) que se ligam a pectinas na parede celular, compatível com uma função de sensor hidráulico. As quinases de receptor semelhantes à extensina ricas em

prolina (PERKs), são candidatas potenciais a sensores CWI em plantas. PERKs estão envolvidos na sinalização de Ca^{2+} e, portanto, pode traduzir o estresse mecânico na parede celular em um sinal de Ca^{2+} (BAI et al., 2009). Um papel na sinalização de Ca^{2+} em resposta a estímulos mecânicos foi associado ao canal de cálcio da membrana plasmática putativo MCA1 (NAKAGAWA et al., 2007).

A percepção do sinal hidráulico pelos possíveis sensores citados acima, levam a conversão do sinal físico em químico, que irão mediar várias respostas adaptativas. Mudanças na pressão de turgência da raiz, por exemplo, foram capazes de acionar a sinalização local de ABA da raiz perto do feixe vascular, bem como o acúmulo de ABA nas folhas para regular o fechamento estomático (CHRISTIMANN et al., 2013), indicando que os sinais hidráulicos estão correlacionados com a sinalização de ABA.

Sinais químicos

Apesar de ser improvável que os sinais químicos atuem na sinalização rápida de longa distância, as espécies reativas de oxigênio (ROS) foram recentemente identificadas como possíveis sinais químicos de autopropagação adequados para viajar distâncias mais longas, com uma velocidade de propagação de até 8,4 cm s⁻¹ a partir do local estimulado (CHOI et al., 2014). Além disso, sua potencial interconectividade com outras vias de sinalização (elétricas, hormonais e ondas hidráulicas; MITTLER e BLUMWALD, 2015), torna-as comunicadoras adequadas de estresse biótico ou abiótico. Desta forma, daremos ênfase as espécies reativas de oxigênio (ROS) como representantes dos sinais químicos.

Espécies reativas de oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio (ROS), que incluem oxigênio singuleto (O_2), superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH°) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), desempenham um papel fundamental no desenvolvimento, crescimento, diferenciação e proliferação dos organismos multicelulares (CASTRO e FOYER, 2021; MITTLER et al., 2011).

São formadas em todos os compartimentos celulares, incluindo mitocôndrias, cloroplastos, peroxissomos e membrana plasmática e são mantidas num nível basal (NOCTOR et al., 2018). Os diferentes tipos de ROS apresentam propriedades moleculares diferentes, por exemplo, o superóxido é uma molécula presente na maioria das condições fisiológicas e não pode ser transferida passivamente através de uma membrana. Contudo, o superóxido pode facilmente ser convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), capaz de atravessar as membranas de forma passiva ou através de canais de água (aquaporinas). Suas propriedades e mobilidade dentro da célula, torna-as importantes moléculas sinalizadoras (MITTLER et al., 2011; MITTLER e BLUMWALD, 2015).

Em resposta a certas condições bióticas e abióticas, o nível de ROS pode aumentar nas células e sinalizar para a ativação de diferentes vias de sinalização, e entre os muitos mecanismos celulares usados para gerar e transduzir sinais de ROS, a liberação de ROS induzida por ROS (RIRR em inglês), é uma importante via envolvida em diferentes respostas de estresse em plantas (MITTLER et al., 2011; MITTLER e BLUMWALD, 2015; CONSIDINE e FOYER., 2021).

RIRR é um processo no qual um compartimento celular ou organela gera ou libera ROS, desencadeando a produção ou liberação intensificada de ROS por outro compartimento ou organela (MITTLER e BLUMWALD, 2015; ZANDALINAS e MITTLER, 2018). Em plantas, foi demonstrado que um processo de RIRR medeia a sinalização sistêmica rápida de longa distância em resposta aos estresses (ZANDALINAS e MITTLER, 2018).

Acredita-se que este processo envolva a produção aprimorada de ROS por células vizinhas em um processo que se propaga o “estado de produção aprimorado de ROS” de uma parte da planta para outra. Essa onda de ROS podem se propagar através dos tecidos vasculares e não vasculares dependendo do estímulo (FICHMAN et al., 2019; LEW et al., 2020). Em *Arabidopsis*, esses sinais de propagação de ROS parecem depender de OXIDASE HOMÓLOGA DA EXPLOSÃO RESPIRATÓRIA (em inglês *RBOHD*) e *RBOHF*, ambas de membrana plasmática, NADPH oxidases produtoras de ROS conhecidas por serem centrais para uma gama de sistemas de sinalização à defesa de patógenos e a seca (KADOTA et al., 2015; ZANDALINAS et a., 2020).

Uma vantagem importante no uso de ROS como molécula sinalizadora, é a capacidade da célula de produzir rapidamente e eliminar diferentes formas de ROS de maneira simultânea, permitindo mudanças rápidas e dinâmicas nos níveis de ROS (MITTLER et al., 2011; CONSIDINE e FOYER, 2021).

Integração dos sinais sistêmicos

Repostas fisiológicas apropriadas aos estímulos/estressores requerem uma rápida transmissão de informação entre órgãos distantes das plantas. Embora boa parte dos estudos avaliem os sinais separadamente, estudos apontam que a integração destes sinais seja necessária para uma resposta mais eficiente aos estímulos. (CHOI et al., 2017; ZANDALINAS et al., 2020; FICHMAN e MITTLER, 2021; JOHS et al., 2021).

Chegar a um consenso sobre quais tipos de sinais transmitem informações primárias é inherentemente difícil, em grande parte devido a inconclusão sobre a velocidade dos sinais de longa distância e pelos poucos experimentos que mediram todas as três principais vias de sinalização simultaneamente (elétrica, química e hidráulica), como um meio de estabelecer a influência de cada via na resposta final (HUBER e BAUERLE, 2016; ZANDALINAS et al., 2020).

Sinais hidráulicos e elétricos possuem grande capacidade de transmitir sinais de longa distância em virtude de sua rápida propagação (GALLÉ et al., 2015; JOHS et al., 2021). O sinal elétrico do tipo potencial de ação (PA), geralmente associado a estímulos não prejudiciais, é capaz de se propagar a uma velocidade de 6-44 mm/s no pecíolo das folhas de Mimosa (SIBAOKA et al., 1966). Para o sinal elétrico do tipo potencial de variação (PV), desencadeado por estímulos prejudiciais (por exemplo, queima ou corte), apresentam uma velocidade média de propagação variando de 1 cm s⁻¹ a 2 cm s⁻¹ (FROMM, 2006), e podem atingir velocidades mais rápidas de até 3000 cm s⁻¹ como encontrado em plantas de soja (VOLKOV et al., 2000; HUBER e BAUERLE, 2016). Em relação aos sinais hidráulicos, acredita-se que sejam ainda mais rápidos (MALONE, 1994; HUBER; BAUERLE, 2016).

Os sinais químicos são os sinais de longa distância mais lentos (HUBER e BAUERLE, 2016). No entanto, dependendo da via de transporte (xilema ou floema), a

velocidade de transmissão dos sinais químicos pode diferir amplamente. Velocidades de propagação mais altas foram registradas no xilema durante a transpiração das folhas (PASSIOURA, 1972; GILROY et al., 2014). Contudo, durante a noite e sob condições de estresse, quando os estômatos estão fechados, essas velocidades de propagação diminuem consideravelmente (GILROY et al., 2014; HUBER e BAUERLE, 2016).

A integração dos sinais tem por base a ativação de várias proteínas de membrana que mediam as diferentes vias de sinalização. Foi observado que os sinais elétricos e ondas de Ca^{2+} , que ocorrem durante SAR, dependem dos canais do tipo receptor de glutamato permeável a Ca^{2+} (GLR), e as ondas de Ca^{2+} e ROS que ocorrem durante a SAA, estão associadas a função da proteína D homóloga da oxidase de explosão respiratória (RBOHD), envolvida na geração de ROS (FICHMAN et al., 2021).

Embora não se saiba como as ondas hidráulicas estejam ligadas aos sinais elétricos, de Ca^{2+} e ROS, foi proposto que canais mecanossensíveis permeáveis a Ca^{2+} e outros cátions e ânions, poderiam detectar ondas hidráulicas sistêmicas em tecidos distantes do local de estresse e convertê-los em sinais de Ca^{2+} (CHOI et al., 2017; FICHMAN e MITTLER, 2020).

Essa integração dos diferentes sinais sistêmicos é mediada por pulsos de expressão gênica coordenados em toda a planta (KOLLIST et al., 2019). Além disso, a transmissão do sinal sistêmico mostrou-se mais eficiente entre as folhas que possuem uma conexão vascular direta entre si, sugerindo que pelo menos alguns dos componentes envolvidos são transmitidos pelo floema ou outras células vasculares companheiras, como células da bainha do feixe (CORMODY et al., 2016; GUO et al., 2016).

Estudos com estresses simples e combinados

Apesar das plantas estarem constantemente expostas a diversos estímulos na natureza, o estudo de estímulos únicos possibilita entender os mecanismos por trás da resposta de cada estímulo. Cada estímulo pode afetar a planta de forma diferente ou mesmo afetar as partes (módulos) das plantas de forma diferente. Por exemplo, como na natureza nem todas as folhas de uma mesma planta estão sujeitas a mesma

intensidade ou qualidade de luz, as plantas desenvolveram várias vias de sinalização para traduzir os sinais relacionados à luz entre suas partes (GILROY et al., 2016; DEVIREDDY et al., 2018; 2020; ZANDALINAS et al., 2020). Uma situação dessas é dada por uma folha local (local que recebe o estímulo), submetida a um estresse de alta luminosidade, que por sua vez desencadeia vias de sinalização sistêmica para uma folha sistêmica que não foi submetida a alta luminosidade, ativando diferentes vias de aclimatação nestes tecidos sistêmicos e preparando-os para a possibilidade de serem submetidos a um estresse leve, a aclimatação sistêmica adquirida (CHOI et al., 2017; KOLLIST et al., 2019; BALFAGON et al., 2021).

Mudanças locais no potencial elétrico da membrana plasmática em resposta à luz, chamadas de sinalização fotoelétrica, são as reações fisiológicas mais bem conhecidas em plantas (na ordem de microssegundos ou milissegundos) (WHEELER e BROWNLEE, 2008). As plantas também são especialmente suscetíveis a danos que podem se originar de condições climáticas adversas, danos físicos, exposição a produtos químicos ou ataque de herbívoros. Em laboratórios, os danos mecânicos podem ser realizados por meio de cortes com lâminas de barbear e tesouras afiadas, aplicação de picadas de agulhas e ferimentos a laser, ou contusões com pinças (VEGA-MUÑOZ et al., 2020).

Feridas geradas por danos mecânicos resultam no aumento da concentração de glutamato apoplástico ($[Glu]$ apo) de ~ 50 mM em minutos no local do dano, sugerindo que $[Glu]$ apo pode atuar como um DAMP (padrões moleculares associados a danos) (TOYOTA et al., 2018). O glutamato, entre outros aminoácidos, é percebido especificamente em plantas por meio dos GLRs (TOYOTA et al., 2018; SHAO et al., 2020). GLRs são canais permeáveis ao cálcio e, portanto, medeiam o influxo de Ca^{2+} citosólico dentro de segundos após o dano (NGUYEN et al., 2018; TOYOTA et al., 2018).

Semelhante aos potenciais de onda lenta, as ondas de Ca^{2+} sistêmicas são observadas após ferimentos (KIEP et al., 2015) e não se espalharam para as folhas intactas vizinhas no mutante *glr3.3 glr3.6* (TOYOTA et al., 2018), mostrando que os sinais elétricos e de Ca^{2+} estão interagindo intimamente por meio de GLRs. Em folhas sistêmicas de *Arabidopsis*, potenciais de ondas lentas parecem preceder os sinais de pico de Ca^{2+} (NGUYEN et al., 2018).

Em relação ao estresse térmico, as plantas desenvolveram sensores específicos envolvidos na percepção da resposta ao estresse térmico (HSR) como as proteínas de choque térmico (HSP), capazes de detectar as transições da temperatura ambiente para a alta/baixa temperatura e ativando cascatas de sinalização para ajustar o metabolismo celular e evitar os danos induzidos pelo calor (ZANDALINAS et al., 2017). A função de RBOHD, por exemplo, conhecida por integrar diferentes sinais, foi observada ser necessária para a propagação sistêmica de VPs induzidos por estresse térmico (SUZUKI et al., 2014).

Embora nosso conhecimento de como os estresses afetam as plantas quando aplicados individualmente seja vasto, sabemos muito pouco sobre como as plantas se aclimatam a uma combinação de diferentes estresses e muito menos como os diferentes sinais se comportam. A ocorrência de dois ou mais estresses diferentes (seja biótico e/ou biótico) pode ser desafiador para as plantas. Este desafio pode ser resolvido por efeitos aditivos, subtrativos e/ou combinatórios de diferentes vias, redes e mecanismos que são ativados por cada um dos diferentes estresses, ou pela ativação de novas vias e genes que são explicitamente ativados durante a combinação de estresse (ZANDALINAS et al., 2019).

Estudos recentes em plantas de *Arabidopsis* forneceram evidências de como as plantas integram diferentes sinais sistêmicos gerados simultaneamente durante a combinação de tensões e que a maneira como as plantas percebem as diferentes tensões que acionam esses sinais (ou seja, na mesma ou em partes diferentes), faz uma diferença significativa em quão rápido e eficiente eles induzem, por exemplo, sinais de espécies reativas de oxigênio (ROS); respostas trascriptômicas, hormonais e estomáticas; bem como a aclimatação das plantas.(ZANDALINAS et al., 2020).

São escassos os estudos mostrando mudanças na atividade elétrica e hidráulicas de plantas sujeitas a combinações de estresse, e acredita-se que estes sinais estejam por trás de respostas como as respostas estomáticas. Foi observado que a combinação de seca (que requer fechamento estomático para evitar a perda de água) e calor (que requer abertura estomática para resfriar as folhas por transpiração) resultou em uma resposta geral de fechamento estomático (RIZHSKY et al., 2004), um outro estudo mostrou que durante uma combinação de calor e estresse de luz elevada

(que requer o fechamento dos estômatos; DEVIREDDY et al., 2018), os estômatos permaneceram abertos (BALFAGÓN et al., 2019).

Avaliar como a integração desses sinais em plantas cultivadas se comportam quando estímulos únicos e combinados são aplicados pode possibilitar uma representação mais realista da resposta dessas plantas. Portanto, considerando que a estimulação local é capaz de induzir uma sinalização sistêmica integrando diferentes tipos de sinais e respostas estresse-específicas, investigamos se a aplicação local de estímulos abióticos simples e combinados induzem alterações específicas no electroma vegetal e na dinâmica hidráulica, capazes de se propagarem a longas distâncias em plantas de feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.).

Portanto, embora as respostas individuais provocadas por cada estímulo sejam bem documentadas (CHOI et al., 2014; TORRES-RUIZ et al., 2015), especialmente em *Arabidopsis*, avaliar como a integração desses sinais em plantas cultivadas se comportam quando estímulos únicos e combinados são aplicados pode possibilitar uma representação mais realista da resposta dessas plantas a essas condições.

5 METODOLOGIA

Para testarmos essa hipótese, conduzimos primeiramente: 1) a avaliação da dinâmica dos sinais sistêmicos induzidos por estímulos simples, seguida da 2) avaliação da dinâmica dos sinais sistêmicos induzidos por estímulos combinados. As medidas bioelétricas foram obtidas na forma de séries temporais a partir do método de eletrofitograma (EFG), enquanto a aquisição das medidas hidráulicas se deu através da sonda magnética de variação de pressão de turgor (ZimProbe). Já as respostas oxidativas foram obtidas por métodos tradicionais de avaliação de ROS. As alterações no perfil dos sinais bioelétricos (electroma) e hidráulicos foram avaliadas por meio de análises de séries temporais e classificação por aprendizado de máquinas (Machine learning), comparando as condições antes e após a aplicação dos estímulos.

Material vegetal e condições de crescimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cognição e Eletrofisiologia Vegetal (LACEV), utilizando como planta modelo o feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar IAC Netuno. Esta cultivar foi desenvolvida pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC) no ano de 2015, sendo muito cultivada nos estados da Bahia, Paraná e Santa Catarina (IAC, 2016).

A germinação, o crescimento e o desenvolvimento das plantas, bem como o processo de aquisição dos dados, foram conduzidos dentro de uma sala climatizada com ar-condicionado, programado para ficar a uma temperatura de aproximadamente 25 °C. Para a germinação, sementes de feijão preto foram dispostas em caixas gerbox forradas com papel germitest umedecidos com água destilada. Quando as raízes apresentavam de 1 a 2 cm de comprimento, as plântulas foram transplantadas para copos de poliestireno de 380 mL (furados na base), contendo 450g de areia lavada e esterilizada, e mantidas sob um sistema de iluminação customizado composto de lâmpadas LEDs fornecendo uma densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de aproximadamente $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, medida com o sensor par do IRGA. O sistema de iluminação foi conectado a um temporizador que regulava o fotoperíodo em 14 horas de luz/ 10 horas escuro. A umidade relativa do ar foi mantida em torno de 74% (padronizado conforme outros trabalhos conduzidos no LACEV), e a temperatura em $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ monitoradas em tempo real.

Durante todo o cultivo, regas diárias com um volume de 40 ml de água destilada e, por 3 vezes na semana irrigação com solução nutritiva total de Hoagland e Arnon (20 ml) foram realizadas (Hoagland; Arnon, 1950). As plantas foram mantidas nessas condições até que o 2º trifólio estivesse completamente expandido.

AQUISIÇÃO DOS DADOS

Eletrofitograma (EFG)

As medidas bioelétricas foram realizadas a partir do método de eletrofitograma (EFG) utilizando o sistema de aquisição de dados bioelétricos da Biopac Student Lab System, modelo MP-36 (Goleta, Califórnia, USA) de 4 canais de alta impedância ($10\text{G}\Omega$), cabos SSL2, eletrodos de agulha em aço inox com 12 mm de espessura

(modelo EL-452). Um par de eletrodos, com uma distância de 1 cm um do outro, foi inserido no pecíolo tanto das folhas locais quanto das folhas sistêmicas.

As variações de voltagem (ΔV , medidas em μV) captadas pelos eletrodos passam por uma série de etapas partindo do sistema de aquisição dos dados, amplificação, filtragem e conversão desses sinais. Neste estudo, usamos a função Eletrocardiograma (ECG-AHA) presente no software BSL-PRO do MP-36 (Simmi et al., 2020; Parise et al., 2021). A etapa de amplificação é necessária pois os sinais bioelétricos geralmente são fracos (na ordem de microvolts e milivolts), e o uso de amplificadores com alta impedância de entrada ($> 10^9 \Omega$) evita distorções no sinal. Após a amplificação, o sinal passa por um processo de filtragem para a redução do ruído captado pelos eletrodos e melhorar a razão sinal/ruído, seguindo então para a conversão analógico/digital do sinal. Um filtro high-pass (passa alta) mínimo de 0,5 Hz e outro low-pass de 1,5 kHz foi usado nessas medidas para que todas as frequências abaixo de 0,5 Hz e acima de 1,5 kHz fossem atenuadas. Além disso, foi adotado um band-stop de 60 Hz em todos os canais para evitar os ruídos dos componentes eletrônicos presentes no laboratório. Em todos os experimentos foi usada uma frequência de captação de dados de 62,5 Hz com um ganho (amplificação) de 1000 vezes.

As medidas do electroma foram conduzidas simultaneamente em duas plantas de feijão, sendo 1 planta controle (não estimulada) e 1 planta tratada (estimulada) (Figura 2), com duração total de medida de 2 horas divididas em 1h antes e 1h após o estímulo. Dois eletrodos por planta foram necessários para captar as medidas bioelétricas das folhas local (fl) e sistêmica (fs). Um período de 24 horas de aclimatação aos eletrodos foi necessário antes da aquisição dos dados, já que o momento de inserção dos eletrodos provoca respostas de ferida na planta que se normalizam após algumas horas (VOLKOV e HAACK, 1995).

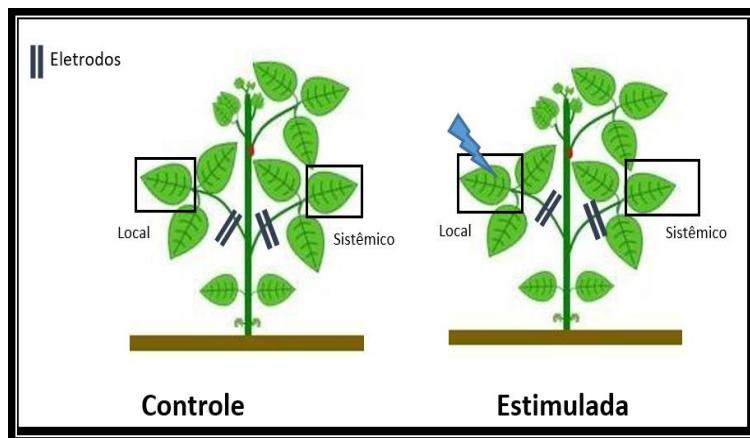


Figura 2 - Representação da disposição das plantas dentro da gaiola de Faraday durante as medidas bioelétricas. As folhas local e sistêmica da planta controle e estimulada, estão delimitadas pelas bordas quadradas; os eletrodos (traços escuros pareados) estão delimitadas pelas bordas quadradas; os eletrodos (traços escuros pareados) estão dispostos no percíolo das folhas. O raio representa o estímulo sendo aplicado na folha local.

Medidas de variação de turgor (Zim-Probe)

A sonda magnética de pressão de turgor foliar “Zim-Probe” é uma sonda comercial registrada pela empresa Yara (Zimmermann et al., 2013), que possibilita a realização de medidas precisas e contínuas da dinâmica espaço-temporal da água na planta por longos períodos de tempo, em tempo real sob condições de laboratório ou campo, detectando mudanças relativas na pressão de turgor foliar.

A sonda consiste de dois cilindros metálicos com um ímã tórico dentro de cada um, que quando instalados posicionam-se um de cada lado da folha (Figura 3). Um dos cilindros possui uma rosca, que possibilita mover o ímã para ajustar a pressão conforme a espessura e rigidez de cada folha. O interior de um dos ímãs é preenchido com um polímero sensível à deformação com um sensor de pressão que se encontra mergulhado neste polímero. Portanto, as deformações causadas no polímero pelas mudanças na pressão de turgor foliar são captadas pelo sensor de pressão.

As mudanças na pressão são convertidas em sinais elétricos transmitidos através de um fio até um rádio transmissor. O rádio transmissor envia os sinais por telemetria a um rádio controlador que encaminha os sinais via internet à central de processamento e armazenamento de dados na Alemanha, de onde é disponibilizado na página do usuário os dados na forma de gráficos ou tabelas em tempo real ou para

download. O resultado oferecido em gráficos e tabelas é dado pela “pressão de clipe” (P_c), que é inversamente proporcional à pressão de turgor foliar da região compreendida entre as sondas (ZIMMERMAN et al., 2013).

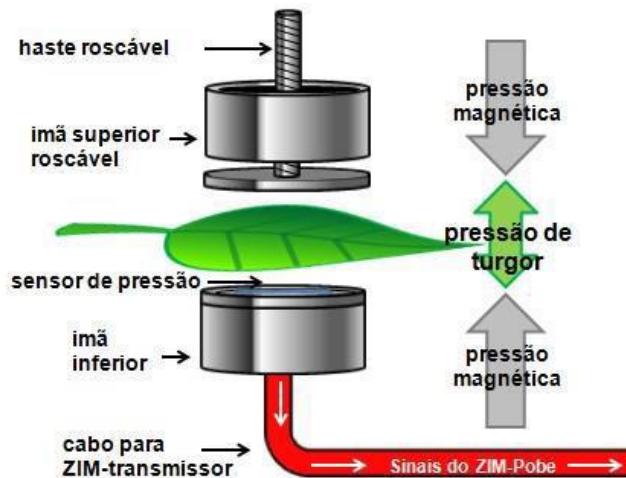


Figura 3 - Representação da sonda magnética de pressão de turgor foliar com seus componentes principais (Fonte da figura: ZIMMERMAN et al., 2013).

No momento da instalação das sondas, é preciso que os estômatos estejam fechados e que o pedaço da folha esteja em contato hidráulico com o restante da folha na hora da instalação. Portanto, é importante que as plantas estejam bem irrigadas, sadias (sem necrose, manchas ou partes secas) e as folhas totalmente expandidas; além disso é importante evitar as nervuras maiores (ZIMMERMANN et al., 2013).

Antes de iniciar a instalação das sondas magnéticas, foi realizada a indução do fechamento estomático por meio do desligamento do sistema de iluminação por 40 minutos. Ainda com o sistema de luz desligado, as sondas foram instaladas no folíolo central do primeiro trifólio. Após a instalação, o sistema de luz foi ligado e as medidas das sondas foram ajustadas para captar dados a cada 10 segundos. Antes da aplicação dos estímulos, a variação do turgor foi monitorada por 2 dias para verificar se a instalação em cada planta foi bem-sucedida.

Nos experimentos também foram usados os sensores de temperatura e de umidade relativa do ar do próprio Zim-Probe possibilitando o monitoramento desses parâmetros que influenciam muito na dinâmica do controle da transpiração e do turgor foliar (ZIMMERMAN et al., 2013).

Quantificação de ROS e peroxidação lipídica

Para a quantificação de ROS e peroxidação lipídica, quatro amostras (repetições) do folíolo central foram obtidas por tratamento e coletadas logo após a aplicação dos estímulos e condicionadas em ultra freezer. A extração e a leitura em espectrofotômetro foram conduzidas no laboratório de cultura de tecidos de planta do PPG em Fisiologia Vegetal.

Conteúdo de superóxido (O_2^-)

O conteúdo de O_2^- foi determinado de acordo com os critérios de Li et al., (2010) em todos os experimentos. Para a extração, os tecidos (0,2 g) foram triturados em tampão fosfato 65 mM, pH 7,8 e centrifugados a 5000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi misturado com tampão fosfato 65 mM, pH 7,8 e cloridrato de hidroxilamina 10 mM, e colocado a 25 °C por 20 min. Em seguida, sulfanilamida 17mM e 7 mM α - anaftilamina 7 mM em uma concentração final, foram adicionadas à mistura. A absorbância da solução a 530 nm foi medida após a incubação por 20 min a 25 °C. Uma curva padrão com radical de dióxido de nitrito (NO_2^-) foi usada para calcular a taxa de geração de O_2^- .

Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Os níveis de peróxido de hidrogênio foram determinados de acordo com Velikova et al. (2000) em cada experimento. Os tecidos (0,2 g) foram macerados em 0,1% de ácido (p:v) de ácido tricloroacético (TCA). O homogenato foi centrifugado (12000 g, 4 °C, 20 min) e o sobrenadante adicionado a tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 e iodeto de potássio 1 M. A absorbância da reação foi medida a 390 nm. O conteúdo de H_2O_2 foi dado em uma curva padrão preparada com concentrações conhecidas de H_2O_2 .

Medidas de peroxidação lipídica

Para a mensuração da peroxidação lipídica, foi utilizado o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA), que determina o malondialdeído (MDA) como produto final da

peroxidação lipídica. O material (0,1 g) foi homogeneizado em solução de TCA 0,1% (p:v). O homogenato foi centrifugado (12000 g, 4 °C, 20 min) e o sobrenadante foi adicionado a 0,5% (p:v) de TBA em solução de 10% de TCA .

A mistura foi incubada em água quente (90 °C) por 20 min, e a reação foi interrompida com a colocação dos tubos de reação em banho de gelo por 10 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 5 min, e a absorbância foi lida a 535 nm. O valor para a absorção não específica a 600 nm foi subtraído. A quantidade de complexo MDA-TBA (pigmento vermelho) foi calculada a partir do coeficiente de extinção ($\epsilon = 155 \times 103 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

EXPERIMENTO 1 – Avaliação da dinâmica dos sinais sistêmicos induzidos por estímulos simples

O experimento teve como objetivo avaliar se após a aplicação de estímulos simples, as alterações sistêmicas na dinâmica hidráulica e elétrica, e as respostas oxidativas, diferem entre cada estímulo aplicado. Para atender este objetivo, foram conduzidos 4 ensaios onde em cada um, estímulos de luz (HL em inglês), choque de calor (HS, em inglês) e ferimento (W, em inglês) foram aplicados localmente e obtidas as séries temporais dos sinais biolétricos e da variação da pressão de turgor, além das amostras para as análises de conteúdo de ROS e peroxidação lipídica.

O folíolo central do segundo trifólio foi a região selecionada para a aplicação local dos tratamentos (estímulos) HL, HS e W, enquanto o primeiro trifólio foi considerado como a folha sistêmica (Figura 4).

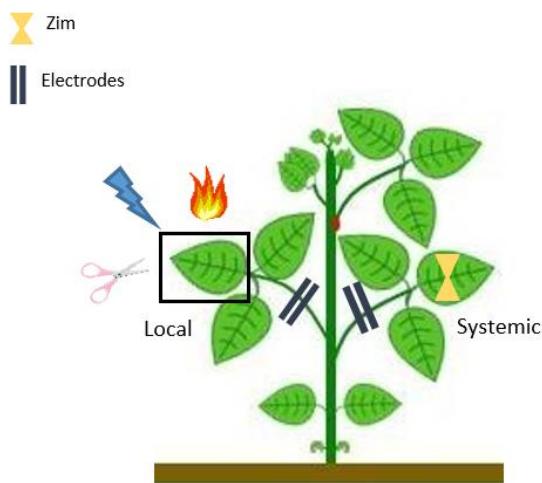


Figura 4 - Representação da configuração experimental indicando o local de aplicação dos estímulos e onde a avaliação sistêmica dos sinais foram realizadas. A borda retangular em preto indica o local (tecido local) onde os diferentes estímulos foram aplicados. A ampulheta amarela representa a sonda de pressão de turgor que será instalada na folha sistêmica. Os dois traços cinzas sob o pecíolo das folhas, indicam a região de inserção dos eletrodos.

Para cada tratamento, foram conduzidos ensaios independentes onde as medidas do electroma, variação de pressão de turgor, quantificação de ROs e peroxidação lipídica foram obtidas.

As medidas elétricas foram realizadas dentro de uma gaiola de Faraday com um sistema de iluminação próprio para evitar interferências eletromagnéticas, enquanto as medidas de variação de turgor foliar e a coleta de material para as avaliações bioquímicas foram conduzidas sob o mesmo sistema de iluminação onde as plantas se desenvolveram (Figura 5). A intensidade da luz nos dois sistemas de iluminação foi ajustada 24 horas antes da realização das medidas ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), permitindo condições iguais de luz nos dois sistemas.



Figura 5 - Disposição dos sistemas de iluminação usados nos experimentos. A esquerda o sistema de iluminação adaptado para o crescimento das plantas e a direita, o sistema de iluminação da gaiola de Faraday para aferição das medidas elétricas.

- Ensaio I – Alta luminosidade (HL)

Este ensaio foi dividido em dois níveis: 5 minutos de duração de luz (HL 5) e 10 minutos de duração de luz (HL 10). Medidas em plantas não estimuladas (controle) também foram obtidas por nível.

Para a aplicação do estímulo luminoso foi usada uma fonte de luz LED (COB 50w 3000-3500K) adaptada, permitindo que apenas uma área específica do folíolo fosse irradiada (Figura 6). A distância da abertura da fonte de luz para a folha estimulada foi de 2 cm e a intensidade da luz a essa distância foi de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ conforme medidas do sensor PAR do IRGA. Todas as medidas ocorreram entre os horários de 10-14h. Para evitar o movimento nictinástico e permitir um ângulo e uma distância padrão da luz estimulante, o folíolo central foi imobilizado usando um recorte de cartolina posicionado entre o folíolo central e os restantes, e uma alça pequena de silicone retangular fixa numa haste de madeira foi posicionada a frente do pecíolo para evitar que a folha subisse (Fig. 6). Esse mesmo procedimento foi realizado nas plantas controle.



Figura 6 - Posicionamento da fonte de luz usada para fornecer o estímulo de alta luminosidade em relação ao folíolo central imobilizado.

Foram obtidas um total de 360 séries temporais de 1 hora, sendo 30 séries antes e 30 séries após o estímulo (nas folhas local e sistêmica). Para a quantificação de ROS e peroxidação lipídica, foram coletadas amostras da folha local e sistêmica logo após o tratamento de luz, com 4 repetições por nível. As medidas de variação de turgor (sistêmica) foram divididas em 1h antes (sem estímulo) e 1h depois (após o estímulo) para o tratamento de luz, com 6 repetições por nível. A configuração deste ensaio durante a obtenção das medidas elétricas é demonstrada na figura 7.

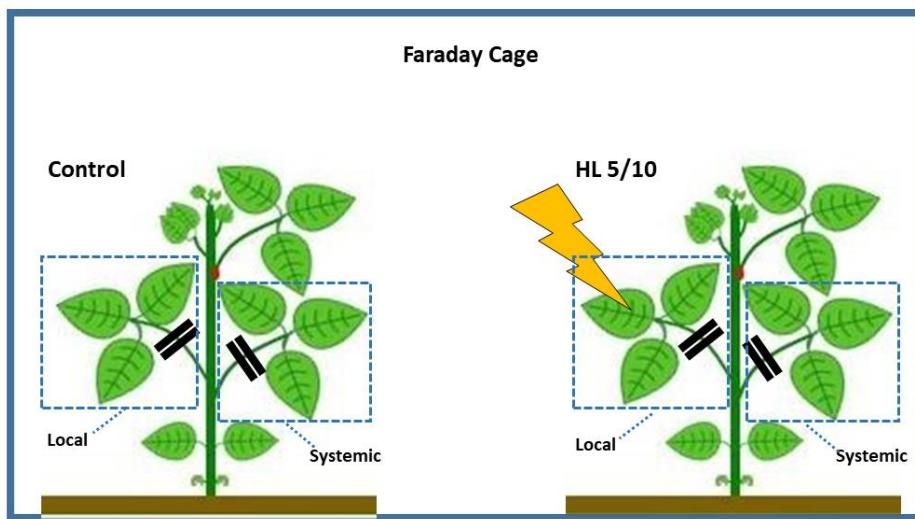


Figura 7 - Esquema da configuração experimental para as medidas do electroma das plantas controle e estimuladas com os tratamentos HL5 e HL 10 dentro da gaiola de faraday. Os dois traços negros posicionados no pecíolo indicam a posição dos eletrodos nas plantas.

- Ensaio II – Choque de calor (HS)

O estímulo de choque de calor (HS) foi aplicado colocando uma chama a aproximadamente 10 cm do folíolo central por 20 s. Medidas em plantas não estimuladas (controle) também foram obtidas. A temperatura foliar foi medida com uma câmera infravermelho (FLIR Systems) nas folhas locais antes e após a estimulação para se ter uma noção da variação da temperatura foliar durante o ensaio (Fig. 8). De acordo com as medidas, após a estimulação a temperatura da folha local aumentou em média ± 23 °C.



Figura 8 - Imagem da câmera termográfica durante a aplicação de uma chama por 20s a uma distância de 10cm da folha local

Foram obtidas um total de 240 séries temporais de 1 hora, sendo 30 séries antes e 30 séries após o estímulo (nas folhas local e sistêmica). Para a quantificação de ROS e peroxidação lipídica, foram coletadas amostras da folha local e sistêmica logo após o tratamento de choque de calor (HS), com 4 repetições por nível. As medidas de variação de turgor (sistêmica) foram divididas em 1h antes (sem estímulo) e 1h depois (após o estímulo) para o tratamento de HS, com 6 repetições por nível. A configuração deste ensaio durante a obtenção das medidas elétricas é demonstrada na figura 9.

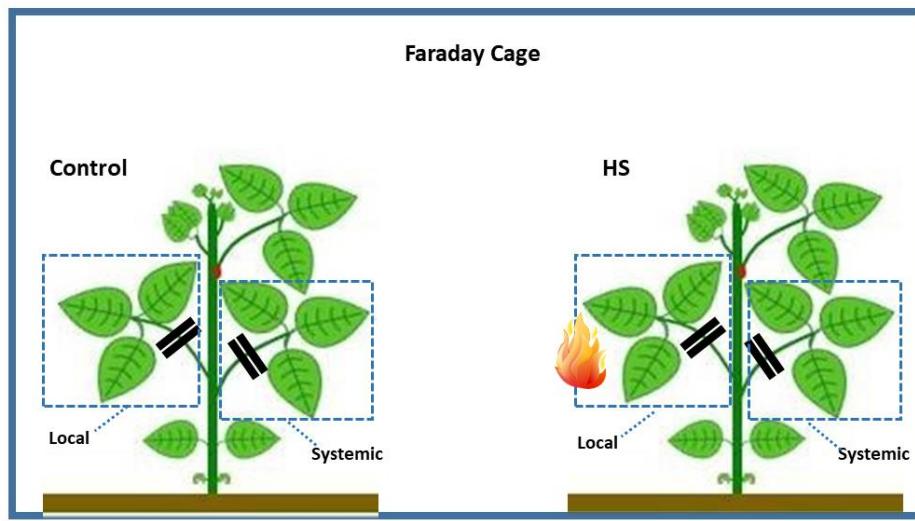


Figura 9 - Esquema da configuração experimental para as medidas do electoma das plantas controle e estimuladas com os tratamentos de corte (dentro da gaiola de faraday). Os dois traços negros posicionados no pecíolo indicam a posição dos eletrodos nas plantas.

Ensaio III – Ferimento (Wounding)

Com uma tesoura calibrada, cortes de 2 cm no folíolo central do segundo trifólio foram realizados para induzir uma sinalização e resposta sistêmica de ferida. Foram obtidas um total de 240 séries temporais de 1 hora, sendo 30 séries antes e 30 séries após o estímulo (nas folhas local e sistêmica). Para a quantificação de ROS e peroxidação lipídica, foram coletadas amostras da folha local e sistêmica logo após o corte (Wounding), com 4 repetições por nível. As medidas de variação de turgor (sistêmica) foram divididas em 1h antes (sem estímulo) e 1h depois (após o estímulo) para o tratamento de corte, com 6 repetições por nível. A configuração deste ensaio durante a obtenção das medidas elétricas é demonstrada na figura 10.

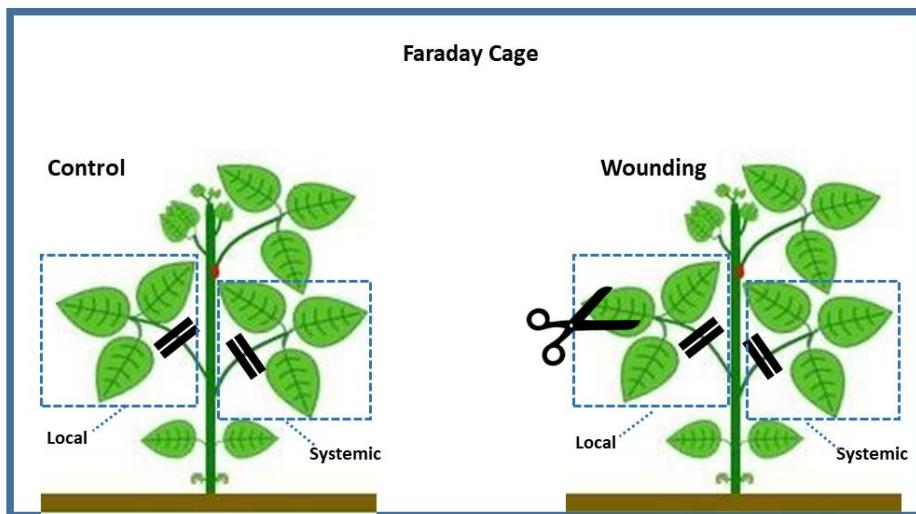


Figura 10 - Esquema da configuração experimental para as medidas do electoma das plantas controle e estimuladas com os tratamentos corte (Wounding) dentro da gaiola de faraday. Os dois traços negros posicionados no pecíolo indicam a posição dos eletrodos nas plantas.

Experimento II - Avaliação da dinâmica dos sinais sistêmicos induzidos por estímulos combinados

Aqui, objetivou-se avaliar se após a aplicação de estímulos combinados, as alterações sistêmicas na dinâmica hidráulica e elétrica, e as repostas oxidativas, se diferenciam do comportamento observado para os estímulos simples. Para atender este objetivo, os estímulos de choque de calor (HS, em inglês) e ferimento (W, em inglês) foram aplicados, respectivamente, no 2º e 3º trifólio (região do folíolo central) da mesma planta, e obtidas as séries temporais dos sinais biolétricos e da variação da pressão de turgor, além das amostras para as análises de conteúdo de ROS e peroxidação lipídica.

Devido a limitação de canais, um dos eletrodos foi introduzido no entrenó das folhas estimuladas (local I e II) e outro no pecíolo da folha sistêmica (não estimulada) (Figura 11). O corte de 2 cm foi aplicado no terceiro folíolo, e a aplicação do choque térmico no segundo folíolo por 20 s.

Foram obtidas um total de 240 séries temporais de 1 hora em cada ensaio, divididas em 30 antes e 30 após os tratamentos (medidas local e sistêmica). Para a quantificação de ROS e peroxidação lipídica, foram coletadas 4 amostras (repetições) das folhas local e sistêmica logo após os estímulos. As medidas de variação de turgor

(sistêmica) foram divididas em 1h antes (sem estímulo) e 1h depois (após o estímulo), com 6 repetições.

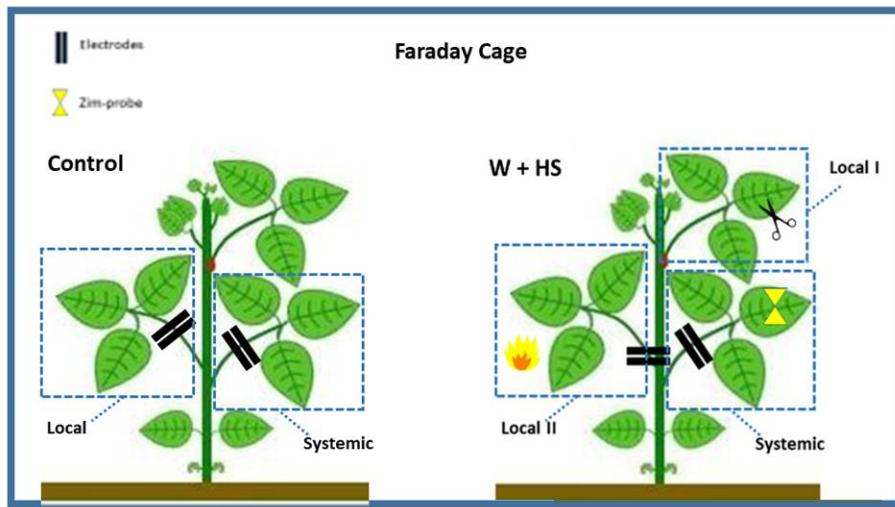


Figura 11 - Esquema da configuração experimental para as medidas do electoma das plantas controle e estimuladas com os estímulos combinados de ferimento e choque de calor (W+HS, em inglês) dentro da gaiola de faraday. Os dois traços negros posicionados no pecíolo indicam a posição dos eletrodos nas plantas.

6 ANÁLISES

Análises eletrofisiológicas

As medidas do electoma de cada planta foram obtidas na forma de séries temporais de variação de microtensão como $\Delta V = \{\Delta V_1, \Delta V_2, \dots, \Delta V_N\}$, onde a ΔV_i é a diferença de potencial entre os eletrodos inseridos no pecíolo das folhas e N é o tamanho da série temporal. A duração da série é derivada de uma amostra de 1 h de aquisição de dados, com taxa de aquisição de 62,5 Hz, totalizando um $N = 225.000$ pontos.

As medidas eletrofisiológicas das folhas locais e sistêmicas foram divididas em dois momentos: 1) Uma hora (1 h) de medida antes da estimulação, 2) Uma hora (1 h) de medida após a estimulação. Essa forma procedeu para cada um dos tratamentos. O total de séries temporais em cada instante está indicado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos grupos e seus respectivos números de séries temporais.

Tratamentos	Grupos	Número de series *
	<i>tla</i>	150
<i>HL5/10, W,</i>	<i>tld</i>	150
<i>HS, W + HS</i>	<i>tsa</i>	150
	<i>tsd</i>	150
	<i>cla</i>	750
Controle	<i>cld</i>	750
	<i>csa</i>	750
	<i>csd</i>	750

*Total de séries temporais em cada grupo dos diferentes tratamentos e controle. Tla/tld (tratamento local antes/depois); tsa/tsd (tratamento sistêmico antes/depois); cla/cld (controle local antes/depois); csa/csd (controle sistêmico antes/depois).

Após a aquisição das medidas, cada série temporal seguiu para o processo de análise utilizando as seguintes técnicas:

Inspeção visuais

A Inspeção visual das séries temporais possibilita uma busca preliminar de padrões ou alterações nas séries temporais. Embora descritiva e subjetiva, permite uma primeira análise do comportamento das séries temporais, bem como algumas comparações entre elas, por exemplo, a maior presença de picos de variação de tensão em algum trecho da série (SIMMI et al., 2020; PARISE et al., 2021).

Análise de Dispersão no Tempo das Features (DTF)

O método DTF, desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Cognição e Eletrofisiologia Vegetal (LACEV), objetiva demonstrar a dinâmica das características (features) da ST do electroma. Os últimos estudos publicados na literatura sugerem que 3 min de medida das séries temporais (STs) já contêm

informações suficientes para identificar comportamentos no electroma da planta (Parise et al., 2021; Reissig et al., 20221 b, 2021 b). Por vezes, as análises considerando uma série temporal inteira do electro podem “mascarar” comportamentos que acontecem em alguns segundos ou minutos, devido a influência da média. Assim, por meio de diversos testes, conseguimos observar o comportamento das séries temporais elétricas em diferentes recortes de tempo.

Portanto, considerando estas informações, a primeira ação na geração dos recursos informativos das séries (características) é a divisão (corte) de todas as STs, de cada tratamento, em séries menores (3 minutos). Em seguida, cada nova ST de 3 minutos, é subdividida em intervalos aproximados de 20 segundos intercambiáveis, com um atraso de 20%, resultando na quantidade de amostras indicada na tabela 2. A escolha da subdivisão em 20 segundos se deve a menor faixa de tempo em que foi possível obter informações suficientes das características.

Tabela 2. Classificação dos grupos e seus respectivos números de amostras.

Tratamentos	Grupos	Número de amostras *
	<i>tla</i>	9300
<i>HL5/10, W,</i>	<i>tld</i>	9300
<i>HS, W + HS</i>	<i>tsa</i>	9300
	<i>tsd</i>	9300
	<i>cla</i>	9300
Controle	<i>cld</i>	9300
	<i>csa</i>	9300
	<i>csd</i>	9300

*Total de amostras em cada grupo dos diferentes tratamentos e controle. Tla/tld (tratamento local antes/depois); tsa/tsd (tratamento sistêmico antes/depois); cla/cld (controle local antes/depois); csa/csd (controle sistêmico antes/depois).

As informações temporais da posição de cada corte foram mantidas e transportadas virtualmente para cada feature (Fig. 12). Ao final, agregamos cada feature por tempo e realizamos análises de dispersão (valores máximos/mínimos, mediana, quartis) naqueles momentos específicos. Ao plotar as análises momento a momento, na ordem temporal correta, obtemos a dinâmica da dispersão das features para todas as séries temporais analisadas.

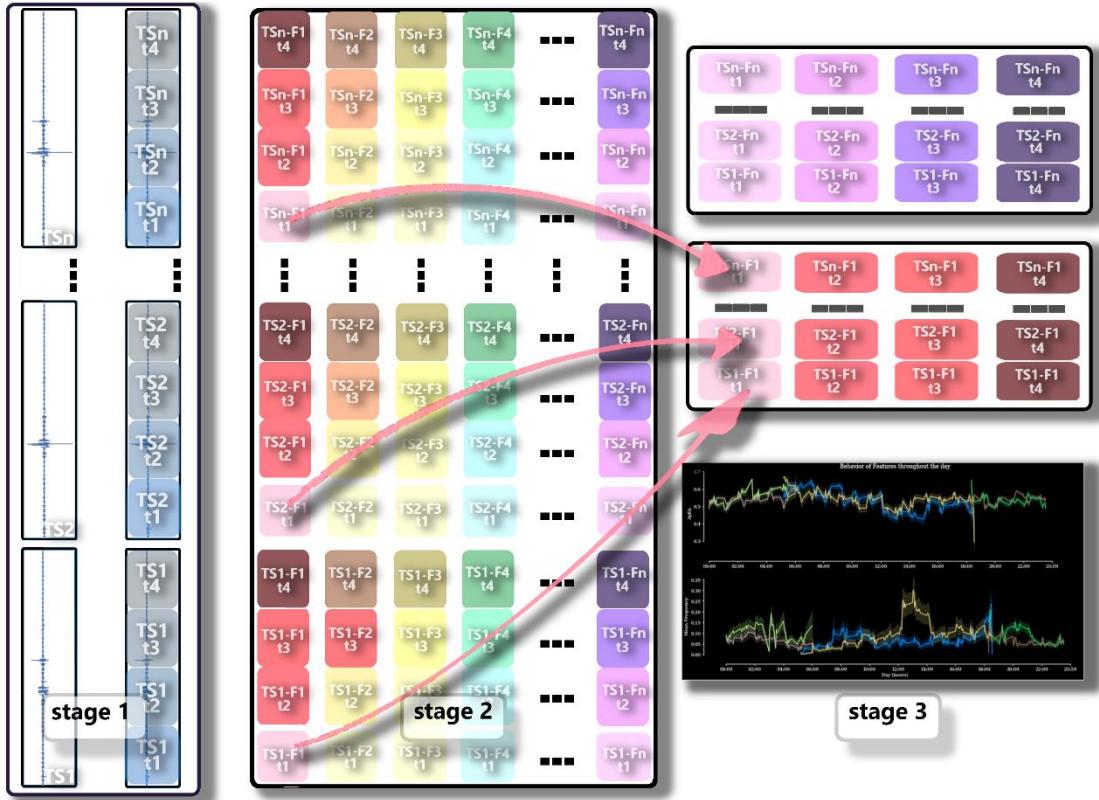


Figura 12 - Esquema da DRT. Na etapa 1 temos as séries temporais (TS_1, TS_2, \dots, TS_n) e o processo de divisão e armazenamento das informações das posições referentes ao tempo de cada corte (t_1, t_2, t_3, t_4). Na etapa 2, as características ($F_1, F_2, F_3, \dots, F_n$) são calculadas para cada corte e, juntamente com o resultado, as informações de tempo são virtualmente salvas. No estágio 3, as informações de tempo são usadas para cada geração e colocação em bins (agrupamento de dados). Com cada bin em seu lugar, a série temporal original é reconstruída, agora com os resultados de cada feature analisada.

Uma boa vantagem dessa análise é a visão humana do comportamento dos recursos e como eles diferem, ou não, para cada classe, sem a necessidade de nenhum cálculo extra, apenas manipulação via software. No entanto, a maior desvantagem é que ele só pode ser usado para classificações de eventos muito delimitados no tempo, e ST altamente diversificadas causam análises muito imprecisas e ruidosas.

Para cada amostra, definimos as features com base em diferentes técnicas de análise de ST, que juntas auxiliam na classificação do electroma. Cada técnica é definida a seguir:

Dentrended fluctuation analysis (DFA)

A Análise de Flutuação Destendida (DFA) calcula uma estimativa da escala da lei de potência (expoente de Hurst). Por meio da observação de alterações nos expoentes da escala, esse método foi capaz de identificar cardiopatias por meio da análise da ST de um eletrocardiograma (Peng et al., 1995). Essa análise pode calcular a autocorrelação de um TS e indicar seu índice de memória de longo e curto prazo. O cálculo do DFA retorna valores alfa que variam da seguinte forma: $\alpha < 1$ o sinal é estacionário e pode ser modelado como ruído gaussiano fracionário; $\alpha = 0,5$ indica falta de correlação ou "memória", indicando sinal ruidoso; $0,5 > \alpha < 1$ corresponde a um sinal com memória com correlação positiva; $\alpha < 0,5$ a correlação é negativa; $\alpha > 1$ o sinal é não estacionário e pode ser modelado como movimento browniano fracionário como $H = \alpha - 1$ (HARDSTONE et al., 2012). O método dfa da biblioteca nolds foi usado para geração de recursos em linguagem python.

Potência média da banda (Average Band Power – ABP)

A ABP foi calculada com os valores obtidos da Função de densidade espectral de potencial (PSD, mostra como a energia espectral é distribuída pela frequência). Resumidamente, este método analisa o sinal em frequências específicas, como 'delta' (0.5-4 Hz), 'theta' (4-8 Hz), 'alpha' (8-12 Hz), 'beta' (12-30 Hz) e 'gama' (30-100 Hz), indicando os níveis de energia nestas frequências. Ela é comumente usada para gerar as feature nas análises de EEG em neurociência (ABHANG; GAWALI; MEHROTRA, 2016a, 2016b; DELIMAYANTI et al., 2020; EVANS, 2002; HERAZ; RAZAKI; FRASSON, 2007; KORA et al., 2021; SAVADKOOHI; OLADUNNI; THOMPSON, 2020; WHITE; RICHARDS, 2009). Para calcular a ABP, integramos a área da PSD determinada pela região de interesse. Foi utilizada a regra de Simpson composta, utilizando o método Simpson da biblioteca scipy (PRESS et al., 1989). Em geral, a regra de Simpson decompõe a área em várias parábolas e depois as soma, retornando o valor total da

área de interesse. Para obtenção das características, foi calculada a ABP das frequências de 0-0.5 Hz (aqui chamadas de baixa {low}), 0.5-4 Hz delta, 4-8 Hz theta, 8-12 Hz alpha, e 12-30 Hz beta.

Entropia aproximada

A Entropia Aproximada (ApEn) fornece informações sobre o nível de organização da série temporal. A ApEn leva em consideração a ordem temporal dos pontos em sequência de uma série temporal, e por isso, ela é preferível para medir a regularidade ou aleatoriedade dos sinais biológicos (COSTA et al., 2005; OCAK, 2009). Valores mais altos de ApEn indicam a existência de dinâmicas mais irregulares (maior complexidade), enquanto valores mais baixos indicam que a dinâmica é mais regular e determinística (PINCUS, 1991, 1995).

O desenvolvimento dessa análise teve como objetivo discriminar entre duas séries temporais geradas por sistemas diferentes ou situações de um mesmo sistema (PINCUS, 1991; PINCUS; GOLDBERGER, 1994). A partir disso, a medida da complexidade por meio da ApEn é considerada uma ferramenta robusta para aferir diferentes condições fisiológicas e de saúde.

Valores menores de ApEn foram associados a processos fisiológicos comprometidos e deteriorados, ou seja, apresentam maior regularidade, enquanto processos fisiológicos saudáveis têm maior complexidade (COSTA et al., 2005).

A definição da entropia aproximada parte do teorema de Takens (PINCUS, 1991), de onde se calcula o conjunto de M vetores $\Delta v_j = (\Delta v_j, \Delta v_{j-\tau}, \Delta v_{j-2\tau}, \dots, \Delta v_{j-(m-1)\tau})$ de m dimensões de imersão (embedding dimension) com $lag \tau$, para $j = 1, 2, 3, \dots, M$ e $M = N-(m-1)\tau$; onde N é o tamanho da série unidimensional ($\Delta V = \Delta V_1, \Delta V_2, \Delta V_3, \dots, \Delta V_N$). Para cada vetor j , calcula-se o número de vizinhos dentro de uma hipersfera de raio r . Posteriormente, toma-se a média do logarítmico do número de vizinhos, que dado por $\Phi^m(r) = \frac{1}{M} \sum_{j=1}^M \ln(N(j))_{viz \leq r}$. Assim, a ApEn é definida na seguinte relação:

$$ApEn = \phi^m(r) - \phi^{m+1}(r)$$

Para os cálculos fixamos $m = 2$, $\tau = 1$ e $r = 0,02 \cdot \sigma$, onde σ é o desvio padrão da série temporal original. A escolha de $m = 2$ deve-se a melhor eficiência do cálculo de ApEn para séries temporais pequenas (PINCUS, 1991).

Neste estudo, a entropia aproximada obtida a partir das séries temporais, foram comparando entre os momentos “antes” e “depois” de cada estímulo (simples ou combinados).

Aprendizado de máquina (*ML*) para classificação de sinais

As características obtidas constroem o que chamamos de espaço amostral, e este espaço foi utilizado para treino e teste da ML. A análise se deu na classificação dos grupos tld min X tla min das folhas local e sistêmica de cada tratamento.

O desenvolvimento dos cálculos de classificação seguiu os mesmos protocolos de ML utilizados por Parise et al. (2021) e Reissig et al. (2021). Os hiperparâmetros utilizados seguiram o recomendado pela literatura, aliado com uma prévia análise e adequação para os dados (CLAESEN; DE MOOR, 2015; LUJAN-MORENO et al., 2018; PROBST; BISCHL, 2019).

A linguagem utilizada foi Python 3 (ROSSUM; DRAKE, 2009) e suas bibliotecas SciPy e Scikit-learn para algoritmos de aprendizado de máquina e filtragem dos dados (PEDREGOSA; VAROQUAUX; GRAMFORT et al., 2020; VIRTANEN et al., 2020), NumPy (Harris et al., 2020) para cálculos matemáticos, Pandas para manipulação de DataFrames (MCKINNEY, 2010) e Matplotlib para criação dos gráficos (HUNTER, 2007). Em todos os processos randômicos foram utilizados numpy.random.seed (seed = 42).

Os seguintes modelos de classificação foram utilizados:

- *RBF SVM* (gama=1e-2)

O RBF (Radial Basis Function) é uma função de kernel comumente usada em SVM (Support Vector Machine) que é um modelo de aprendizagem supervisionada usado para classificação e análise de regressão (HSU et al., 2016). Esse modelo toma como entrada um conjunto de dados e prediz, para cada entrada de dados, qual de duas possíveis classes a entrada faz parte, tornando-o um classificador linear binário não probabilístico. Um modelo SVM determina o hiperplano/fronteira que melhor segregá as duas classes.

- *AdaBoost* (n_estimators = 100)

O Adaptive Boosting é um modelo de reforço, cuja ideia principal é que cada conjunto de treinamento deve atuar em um papel diferente para a discriminação em diferentes estágios de treinamento. Os exemplos que podem ser facilmente reconhecidos devem ser menos considerados no treinamento que se segue; enquanto os exemplos classificados incorretamente nas rodadas testes anteriores devem receber mais atenção, levando a um reforço (FREUND; SCHAPIRE, 1997).

- *Gaussian Process Classifier* (max_iter_predict = 150 e multi_class = one_vs_one)

Implementa processos gaussianos (GPs) para regressões. Os GPs são um método genérico de aprendizagem supervisionada, projetados para resolver problemas de regressão e classificação probabilística (MACKAY; GIBBS, 2000).

- *Controle*

O modelo controle neste estudo foi o Dummy Stratified baseado no método Dummy Classifier (sklearn.dummy.DummyClassifier, 2020; PEDREGOSA et al., 2020), que classifica os dados utilizando estratégias não inteligentes, ou seja, ao acaso. Logo, o modelo que obtiver uma precisão próxima ao Dummy é considerado não adequado para o conjunto de dados, pois obteve resultado próximo ao valor encontrado pelo acaso. O método Dummy, também, indica uma distribuição igualitária dos dados, pois este método tende a retornar valores próximos aos estatisticamente referidos a distribuição do espaço amostral.

Os métodos Stratified KFold (n_splits = 4 e shuffle = True) e Cross Validate (FORMAN et al., 2009; ADAGBASA et al., 2019) foram usados para minimizar o efeito do acaso na distribuição dos dados usados para treinamento e teste.

Análise estatística

Para os dados dos sinais elétricos, nas análises de ABP, ApEn e DFA, os dados são apresentados como mediana \pm DP (desvio padrão da média). Os dados da quantificação de EROs e Peroxidação Lipídica foram analisados como um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial duplo, no qual o primeiro

fator é os tecidos (2 níveis – Local/Sistêmico) e o segundo os estímulos (tratamentos) (C, HL5, HL 10, W, HS e W+HS). A análise de variância (ANOVA) foi realizada, seguida pelo teste Tukey ($P<0,05$), para avaliar a interação entre os fatores. Os resultados para as medidas de variação de pressão de turgor obtidas pela sonda Zim foram calculados como a porcentagem de controle, que é a pressão medida na folha 1 hora antes da aplicação do estímulo. Cada conjunto de dados inclui SE de 6 repetições biológicas. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico RStudio 1.2.1335 (RStudio Team, 2019) e os gráficos produzidos nos programas SigmaPlot 12.0® e Excel 2204®.

7 - RESULTADOS

Respostas locais e sistêmicas de EROS

Na quantificação de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica (Fig. 13 A e C) verificou-se interação entre os fatores analisados (tecido e tratamento). No caso do peróxido, o efeito nos tecidos foi dependente dos tratamentos. Os maiores valores, em relação às plantas controle, foram encontrados nos tratamentos por HL 5, W e HS ($P <0.05$), tanto no tecido local quanto no sistêmico. Entretanto, verificou que com os estímulos combinados (W+HS), os valores foram iguais ao controle.

Com relação à taxa de geração do ânion superóxido (Fig. 13 B), não houve interação entre os fatores, sendo os maiores valores observados nos tratamentos de HL 5 e HS ($P <0.05$), seguido dos tratamentos de HL 10, W e controle e as menores taxas para o tratamento combinado (W+HS) ($P <0.05$). Em relação à comparação entre locais e sistêmicos, não houve diferença significativa em nenhum tratamento.

A peroxidação lipídica (Fig. 13 C) apresentou interação entre os fatores (tecido e tratamento). Houve diferença significativa entre os tratamentos quanto ao nível de peroxidação lipídica, sendo os maiores valores obtidos após HL 5 e o menor após os estímulos combinados (W+HS) ($P <0.05$), sendo que para HL5 houve diferença entre as folhas locais e sistêmicas, enquanto W+HS não diferiu dentro dos tecidos analisados.

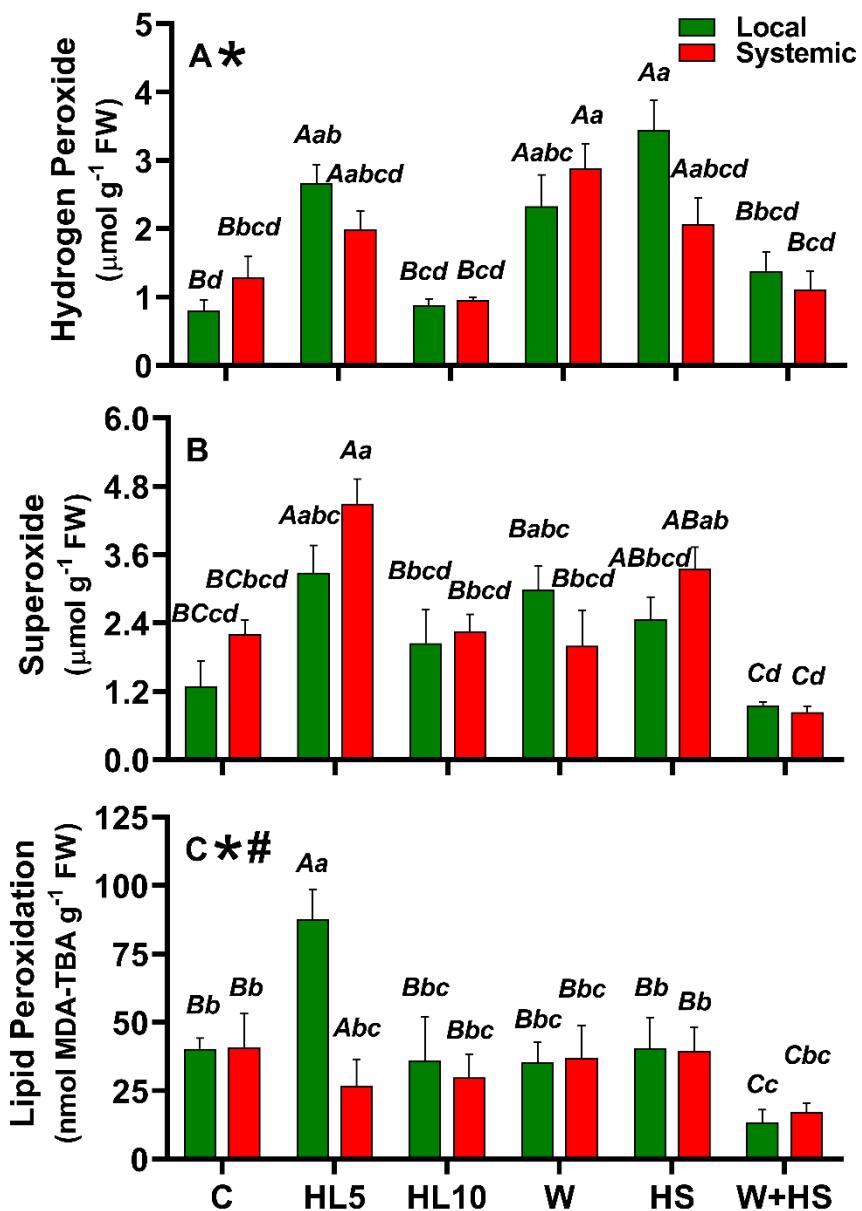
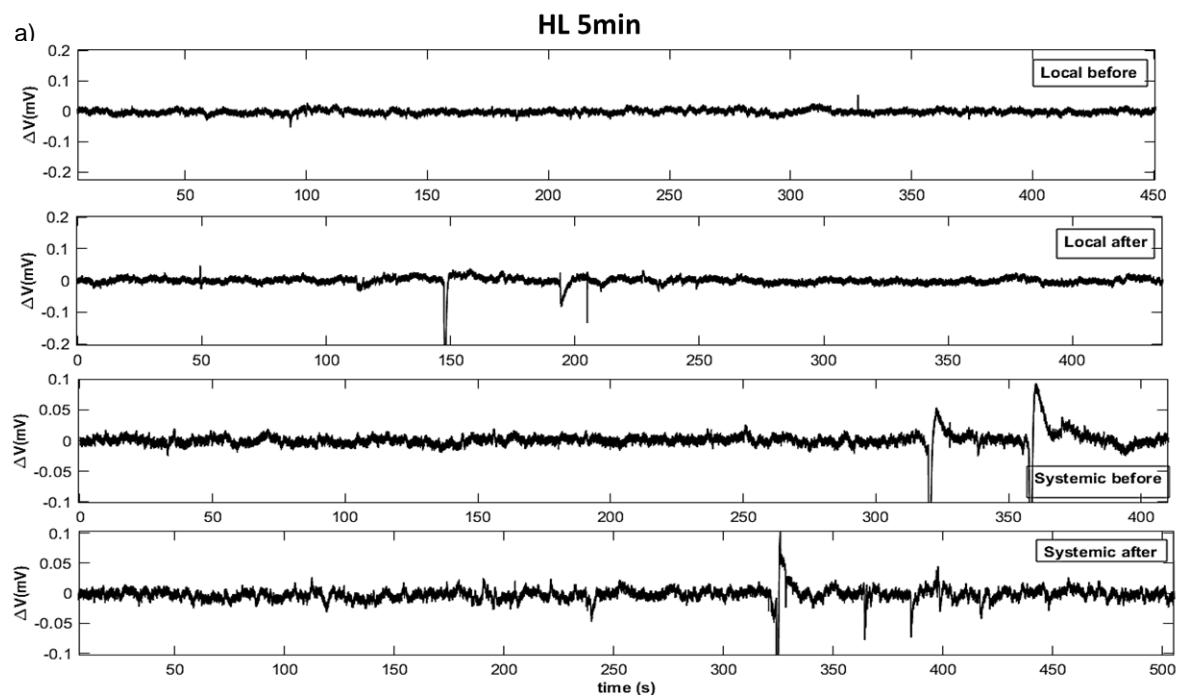


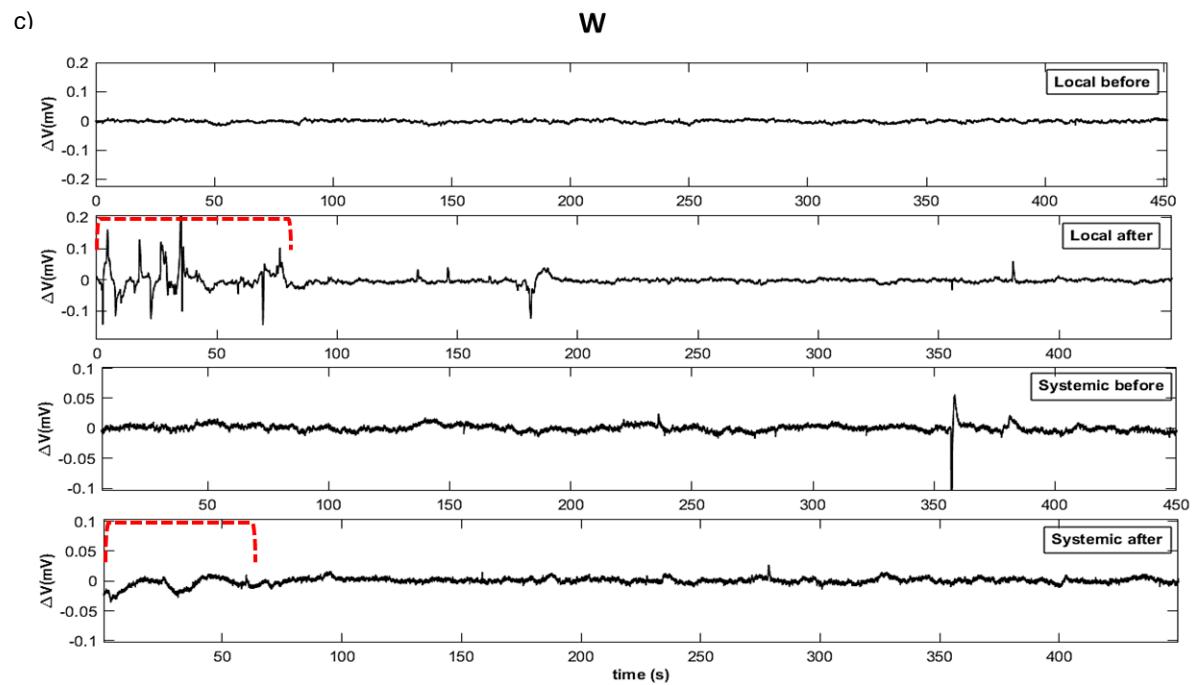
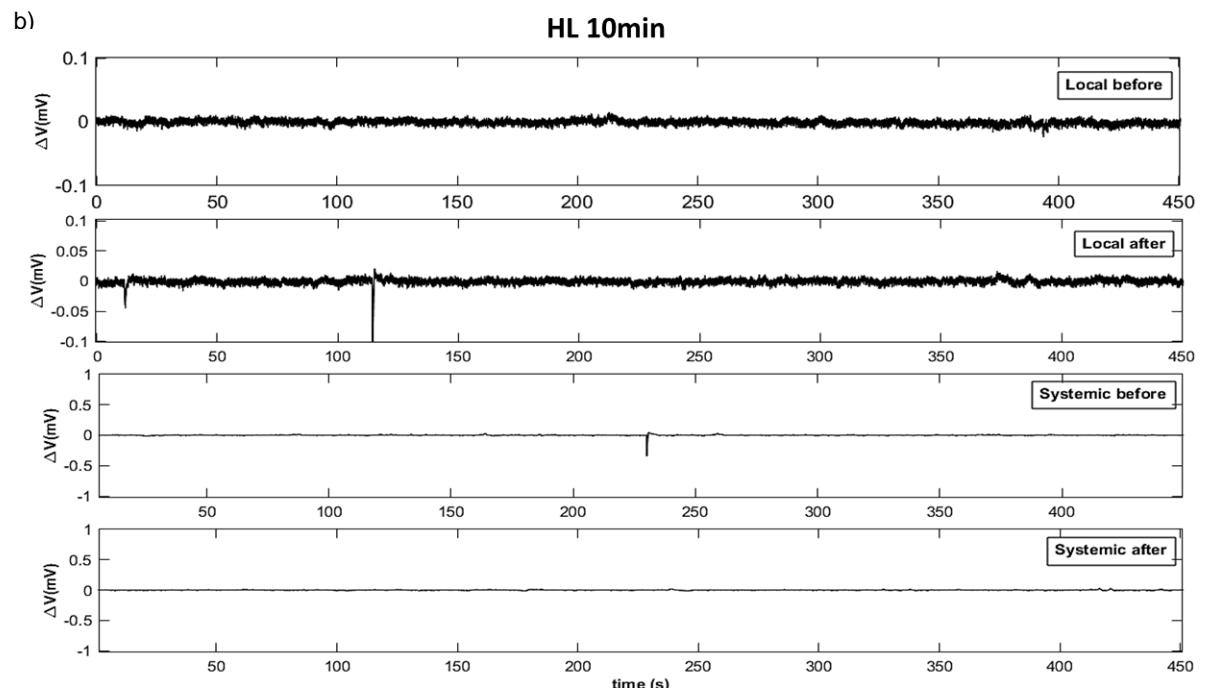
Figura 13 - Níveis de (a) peróxido de hidrogênio, (b) superóxido e (c) peroxidação lipídica de folhas locais (barras em verde) e sistêmicas (barras em vermelho) de plantas de feijão submetidas aos tratamentos controle (c), choque de luz por 5 (HL5) e 10 (HL10) minutos, ferimento (W), choque de calor (HS) e estímulo combinado de calor e ferimento (W+HS). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre o fator tratamento pelo teste de Tukey post hoc, enquanto as letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos em cada folha. O asterisco ao lado da letra indicadora da figura, indica interação entre os fatores através de two-way anova no parâmetro avaliado, enquanto o jogo da velha indica diferença entre folha local e sistêmica no parâmetro avaliado. $p \leq 0.05$; $n=4$.

Dinâmica do electroma

Análise visual

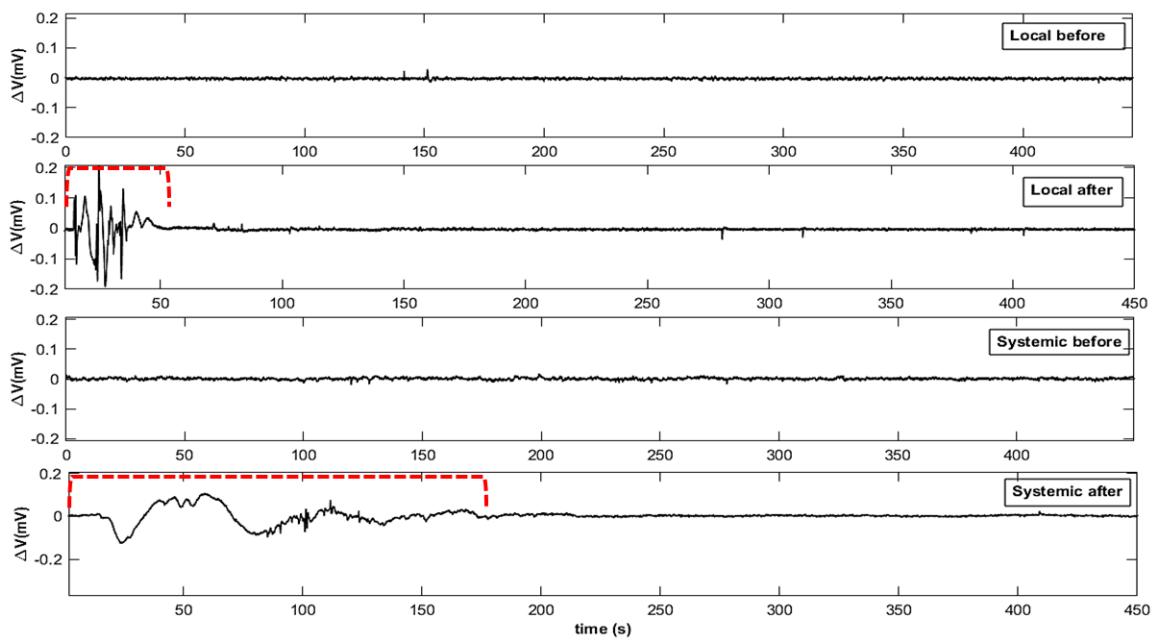
As análises visuais das séries temporais originais possibilitaram detectar mudanças qualitativas no electroma ao comparar as medidas antes e depois dos estímulos. Nas séries após a aplicação do estímulo de luz (5 e 10 minutos de HL), os *spikes* (variações de voltagem de maior amplitude, tipicamente acima de $50 \mu\text{V}$), não apresentaram um padrão de distribuição evidente no tempo (Figura 14 – a, b), enquanto após a aplicação dos estímulos de W, HS e W + HS os *spikes*, exibiram mudanças evidentes após os estímulos nas folhas locais e sistêmicas (Figura 14 – c, d), sendo que nas folhas sistêmicas a amplitude dos *spikes* foi menor. Essas observações indicam que nos primeiros minutos após a estimulação, o electroma foi mais afetado em relação ao restante da série.





d)

HS



e)

W + HS

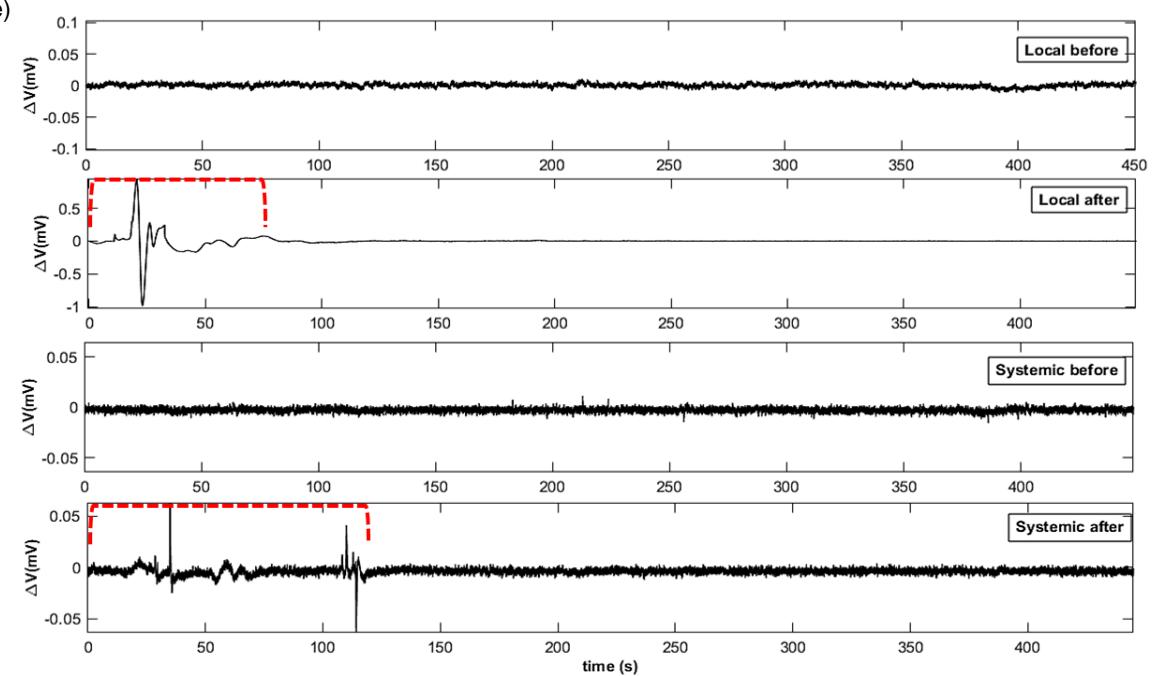
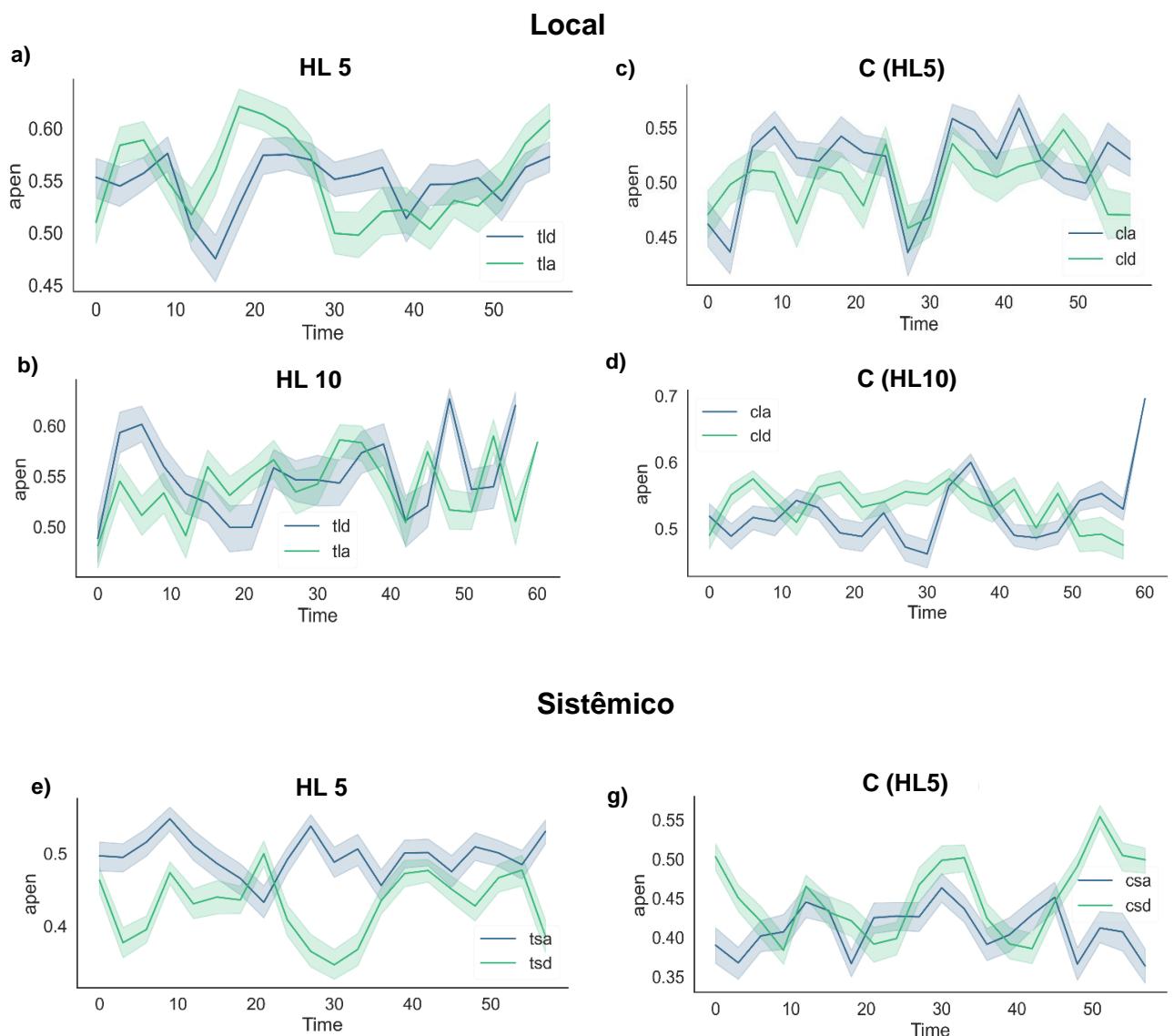


Figura 14 - Representação original das séries temporais antes e após os estímulos de a- b) alta luminosidade por 5 e 10 minutos (HL5 e HL10), c) corte (W) e d) choque térmico (HS) e e) estímulo combinado (W+HS) nas folhas local e sistêmica. Para facilitar a comparação, o tamanho total da série ($x = 1$ h) foi reduzida a 7,5 minutos de medida. O eixo y (ΔV) foi ajustado para cada situação. A linha tracejada em vermelha indica o momento de maior alteração do electroma após a estimulação.

ApEn

Na figura 15, temos os resultados de ApEn para os diferentes tratamentos a nível local e seus respectivos controles. Os valores medianos de ApEn das folhas locais antes (tla) e depois (tld) da aplicação tratamentos de luz (HL 5 e 10), não apresentaram diferenças consistentes entre si (Fig. 15 – a e b), apresentando um comportamento semelhante ao observado nos grupos controle (Fig.15 – c e d). Os mesmos resultados foram observados para as folhas sistêmicas destes tratamentos.



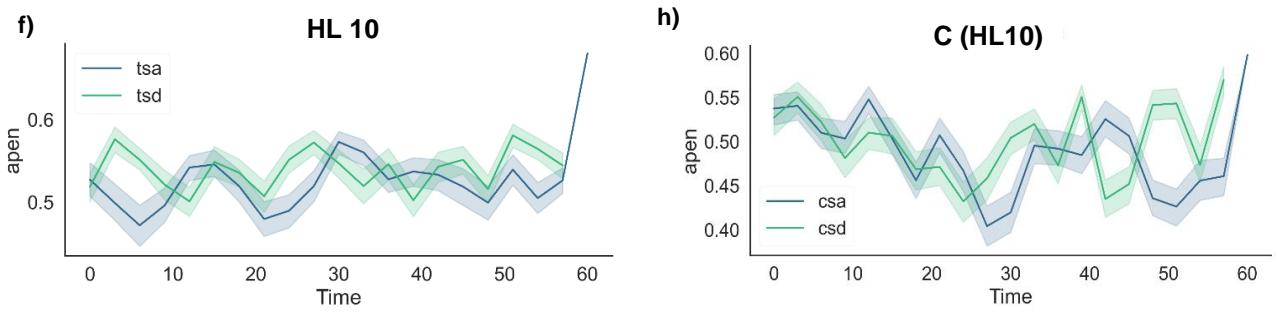
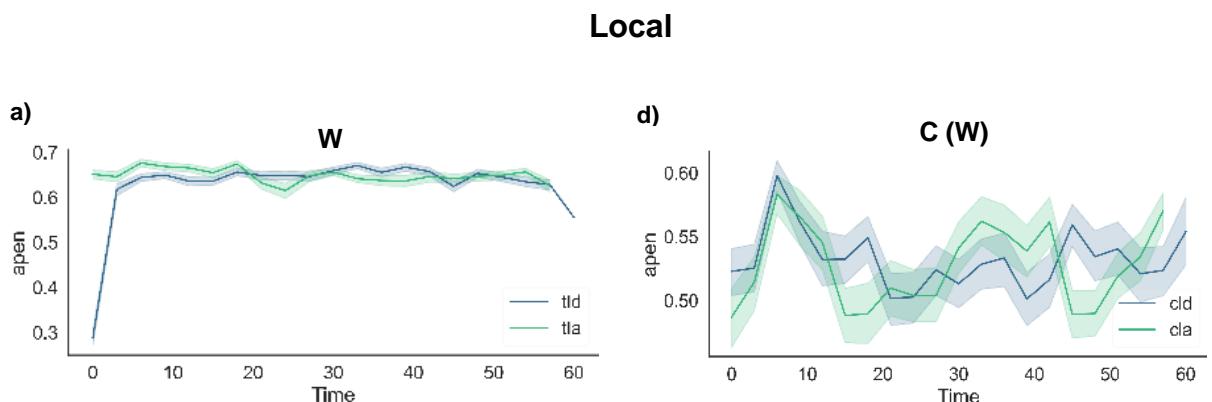


Figura 15 - Gráficos de TDAF para análise de ApEn das folhas locais (a à d) e sistêmicas (e à h) antes e depois do tratamento de 5 e 10 minutos de Luz (HL5 e HL10) e seus respectivos grupos controle (C).

Na Fig. 16 encontramos os resultados para a análise de ApEn para os experimentos de W, HS e W+HS comparados com o antes e depois o estímulo na folha local. É possível observar que nos primeiros momentos existe uma alteração significativa nos resultados da análise. No entanto, não foi encontrado tal alteração nas plantas controle para corte e fogo. Em média, temos uma diminuição de 0.3 do valor da ApEn, e quando aplicados os dois estímulos simultaneamente a alteração ficou dentro deste mesmo valor. Apesar de não encontrarmos no controle diferença significativa entre o antes e após a estimulação, o controle para W+HS indicou uma diferença entorno de 0.1 de complexidade nos primeiros minutos. Apesar de uma diferença ter sido encontrada em todas as análises nos primeiros minutos, todos os resultados voltaram a ter um comportamento similar após os primeiros 10 minutos.



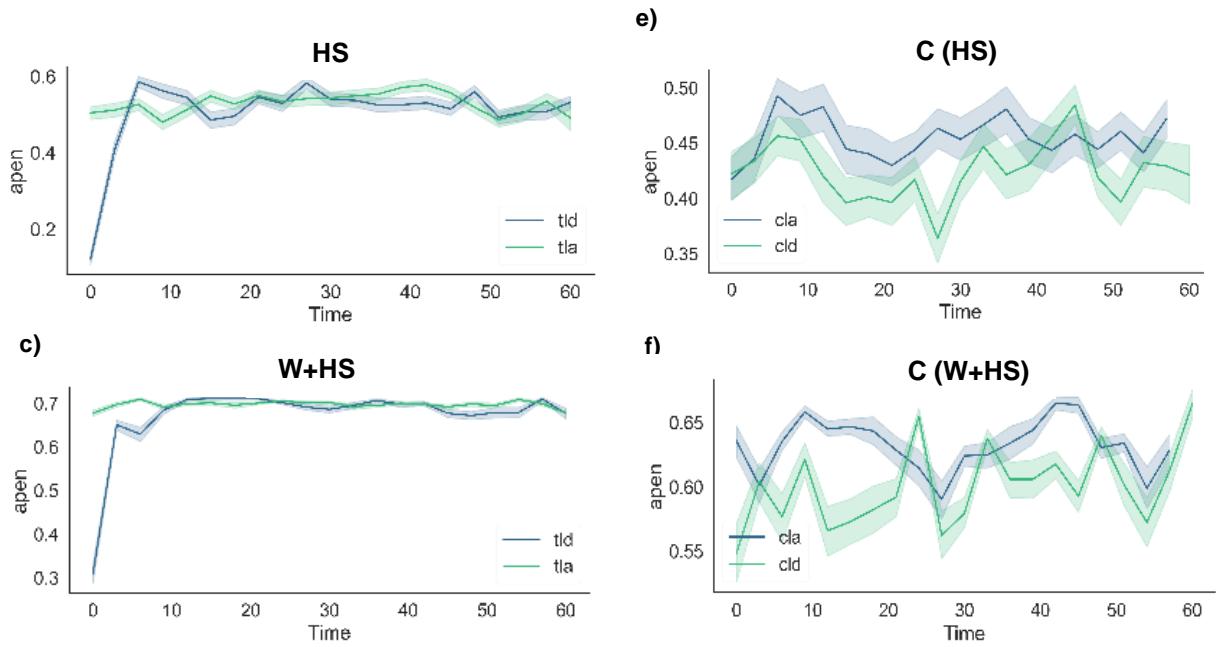


Figura 16 - Gráficos de TDAF para análise de ApEn para as folhas locais. Em (a) resultado para o estímulo de corte (W), (b) choque de calor (HS) e (c) para o estímulo combinado (W+HS). De (d) à (f) temos os resultados para as plantas controles (C) de cada estímulo.

Os resultados da ApEn para a folha sistêmica são apresentados na figura 17, e assim como observado na folha local, os estímulos alteram de forma específica a entropia do sinal, com a diferença de que estas alterações se apresentam numa amplitude menor do que o observado para as folhas locais. Para o corte encontramos uma diferença de 0.1 de complexidade, porém, após os primeiros minutos a complexidade aumenta e permanece maior que a encontrada antes. Já para o fogo, encontramos uma diminuição de 0.3 na complexidade no início da série, e um retorno aos valores pré-estimulação por volta dos 10 minutos. Após a aplicação do estímulo combinado, existe uma diminuição de 0.2 de complexidade, mas diferentemente dos outros, observamos um comportamento bifásico em que no primeiro momento observamos um aumento da complexidade nos primeiros minutos, seguido de uma redução em torno dos 10 minutos, enquanto na segunda fase a complexidade volta a aumentar até retornar aos valores encontrados antes do estímulo, por volta dos 15 minutos. Isso mostra que além do estímulo combinado apresentar uma dinâmica elétrica com um formato específico em relação aos estímulos simples, ele também se diferencia na duração das alterações observadas na folha sistêmica.

As plantas controles para o corte não obtiveram diferença significativa, porém, para o HS e W+HS, encontramos uma alteração na folha sistêmica, um aumento da complexidade nos primeiros minutos. Portanto, avaliando a redução da complexidade do sinal após a aplicação destes estímulos, acreditamos que estes causaram uma reação negativa nas plantas nos instantes iniciais.

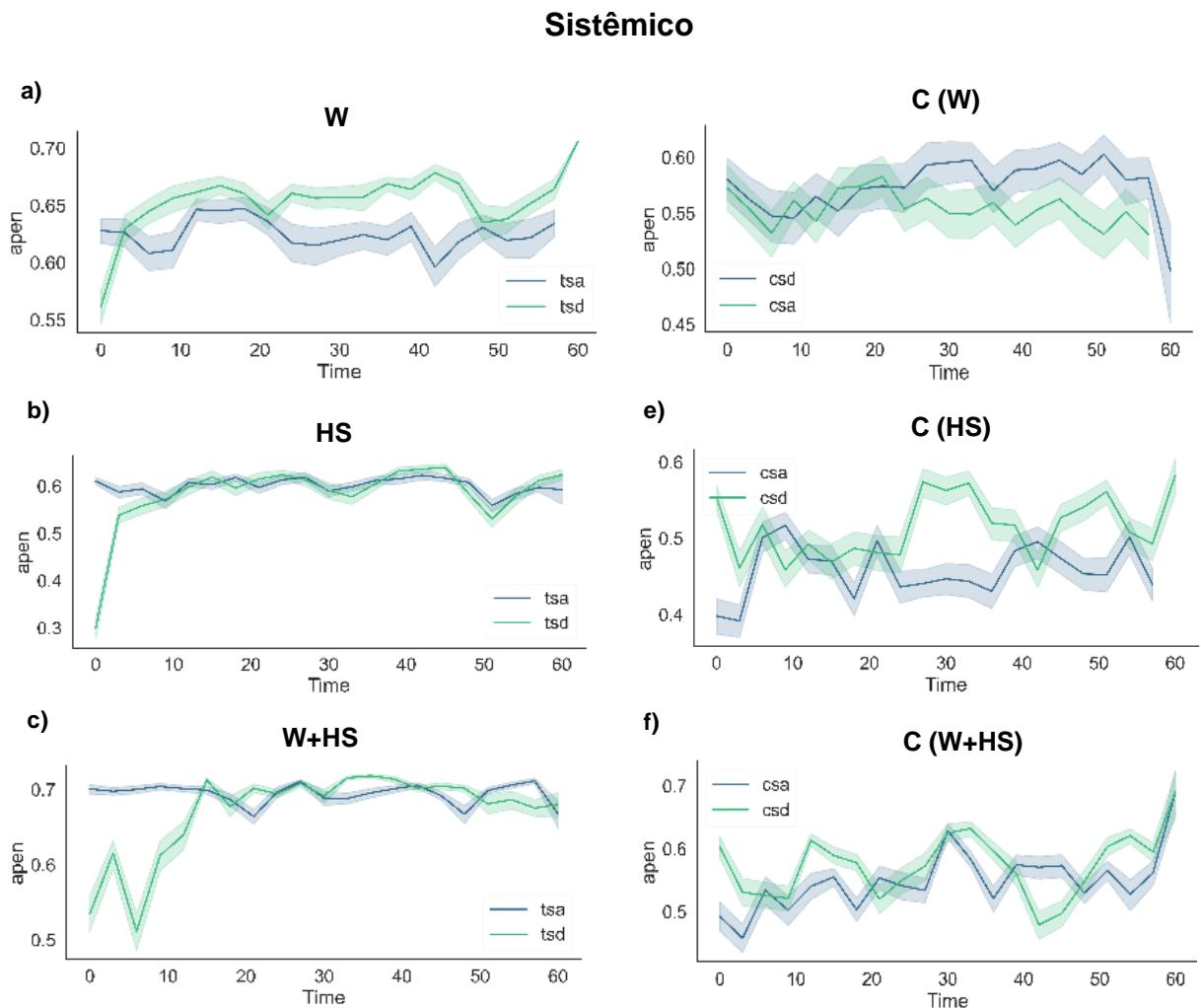


Figura 17- Gráficos de TDAF para análise de ApEn para as frequências nas folhas sistêmicas. Em (a) resultado para o estímulo de corte (W), (b) choque de calor (HS) e (c) para o estímulo combinado (W+HS). De (d) à (f) temos os resultados para as plantas controles de cada estímulo.

Dentrended fluctuation analysis (DFA)

Para o tratamento de luz (HL 5 e 10min) não foram observadas diferenças na DFA das folhas locais em relação ao controle (Fig. 18 – a à d), nem mesmo nas folhas

sistêmicas foram obtidas alterações consistentes entre antes e depois da aplicação dos estímulos (Fig. 18 - e e f).

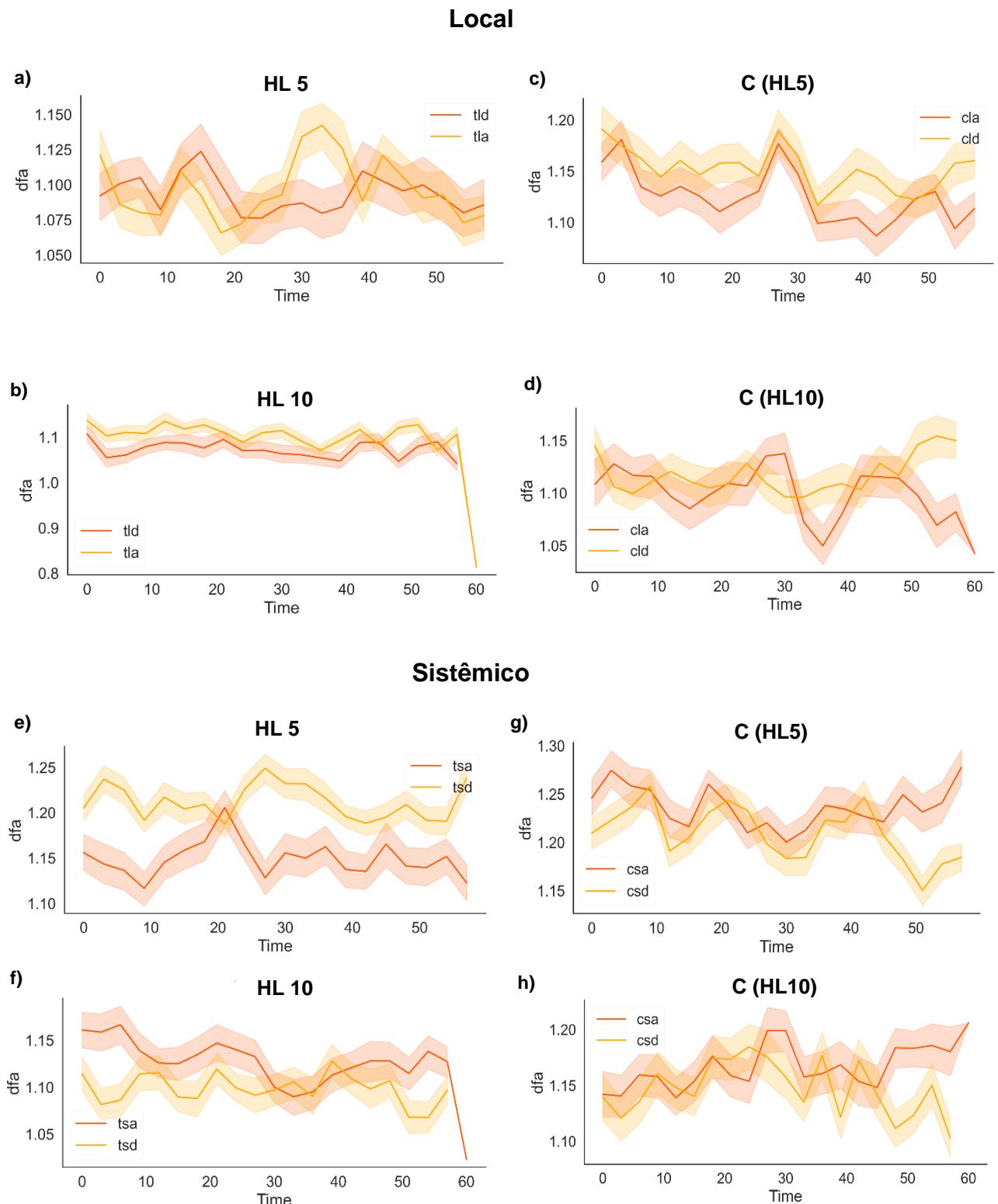


Figura 18 - Gráficos de TDAF para análise de DFA das folhas locais (a à d) e sistêmicas (e à h) antes e depois do tratamento de 5 e 10 minutos de Luz (HL5 e HL10) e seus respectivos grupos controle (C).

O resultado para o DFA nas folhas locais após W, HS e W+HS mostram um aumento da correlação logo após os estímulos (Fig. 19). No entanto, este valor retorna a uma condição pré-estimulada antes dos primeiros 10 minutos. Os controles mantiveram o comportamento entre as séries antes e depois.

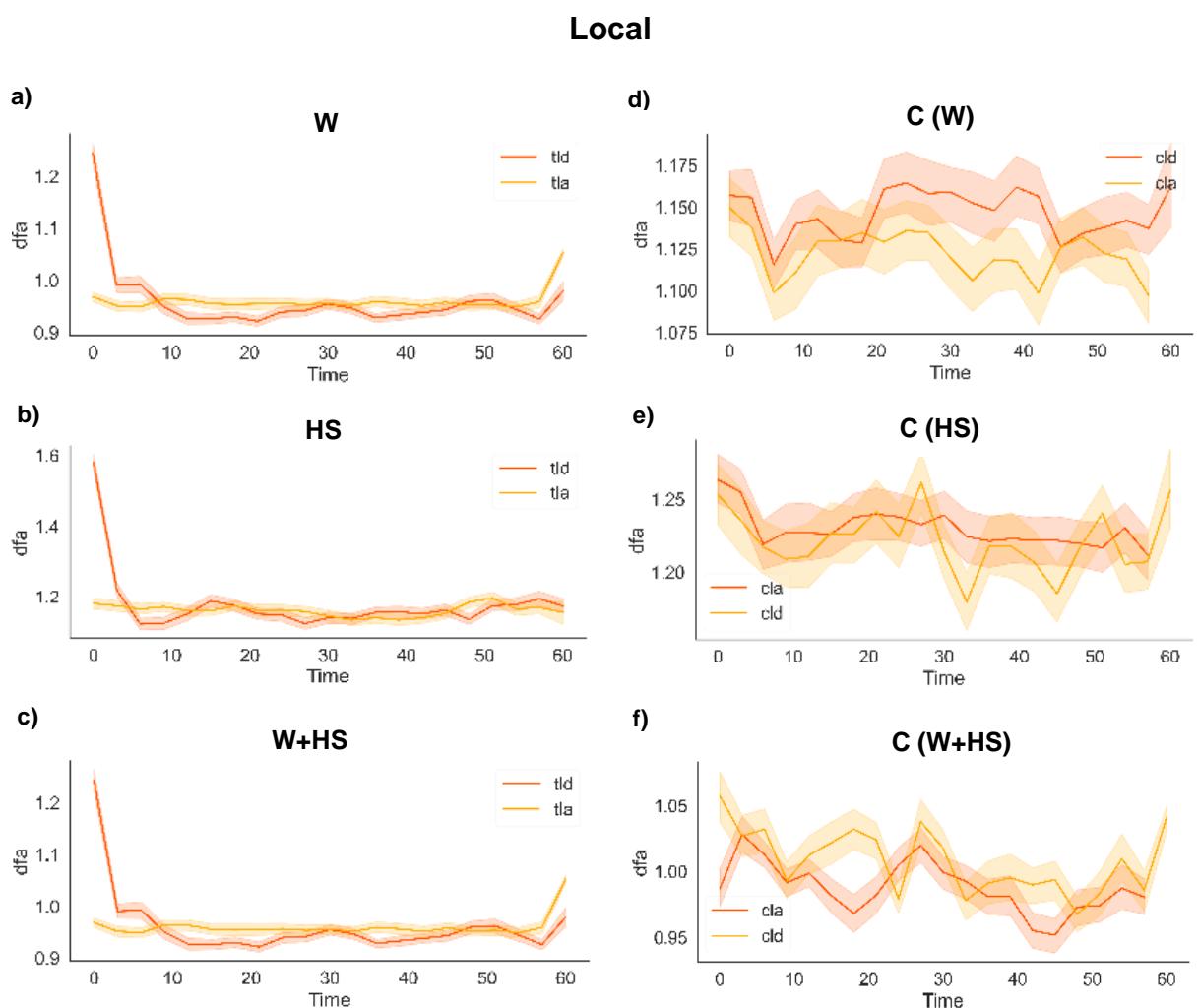


Figura 19 - Gráficos de TDAF para análise de DFA para as folhas locais. Em (a) resultado para o estímulo local corte (W), (b) choque de calor (HS) e (c) para o estímulo combinado (W+HS). De (d) à (f) temos os resultados para as plantas controles de cada estímulo.

Os resultados para análise de DFA para as folhas sistêmicas encontrados na Fig. 20, novamente confirmam as alterações encontradas pela análise de ApEn (Fig. 17), contudo, diferenças entre a duração das alterações observadas no electroma após

a estimulação combinada indicam que a nível sistêmico este estímulo é mais duradouro. Para as plantas controle, o padrão de comportamento das plantas é similar entre as séries antes e depois.

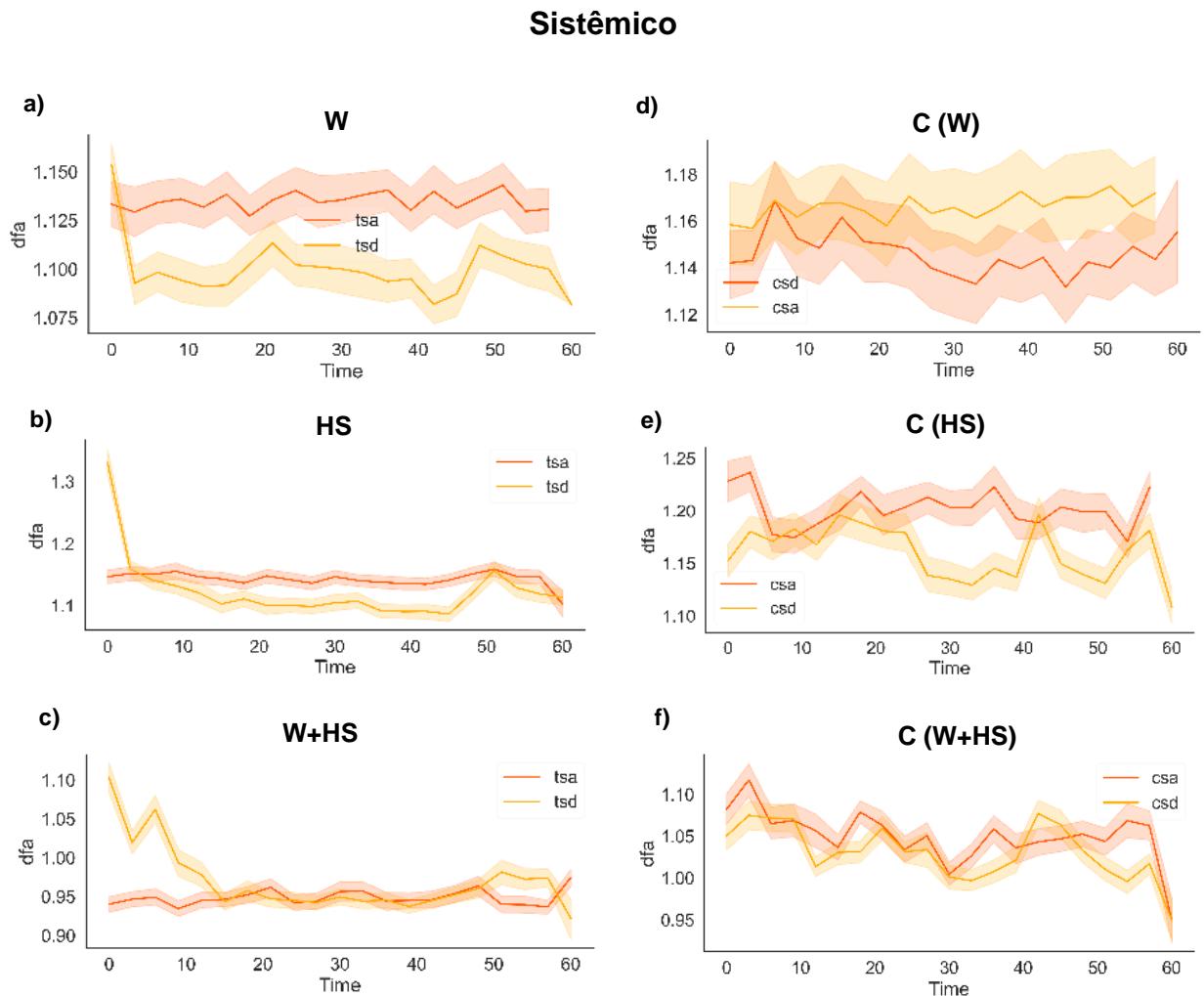


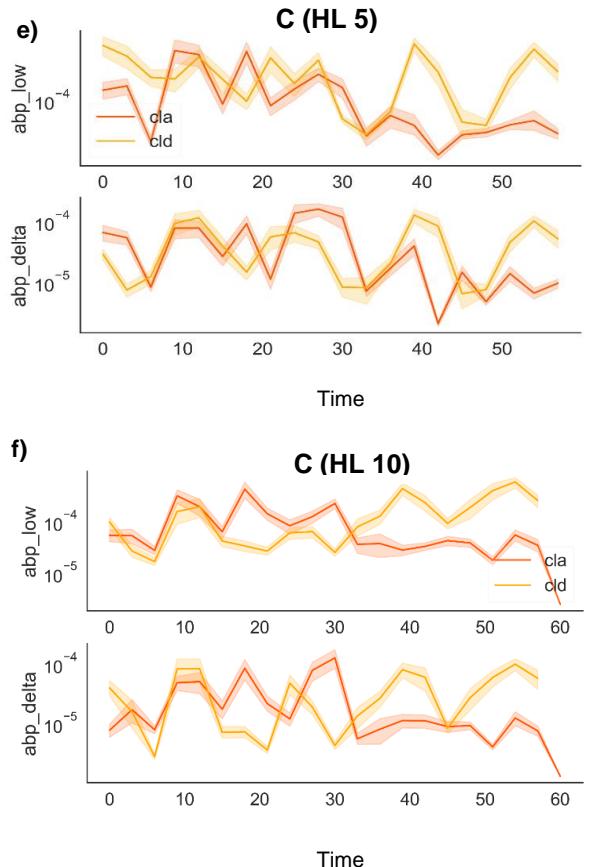
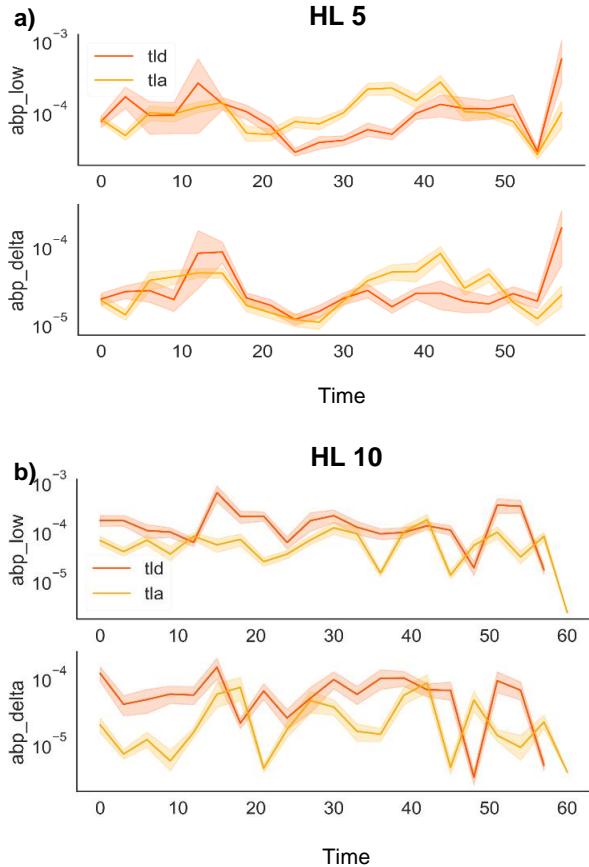
Figura 20 - Gráficos de TDAF para análise de DFA para as frequências nas folhas sistêmicas. Em (a) resultado para o estímulo local corte (W), (b) choque de calor (HS) e (c) para o estímulo combinado (W+HS). De (d) à (f) temos os resultados para as plantas controles de cada estímulo.

Potência média da banda (Average Band Power – ABP)

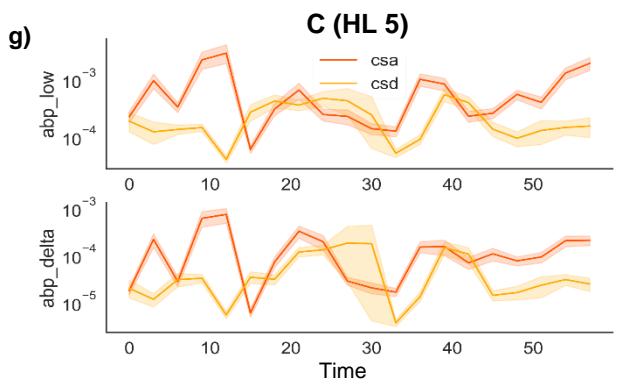
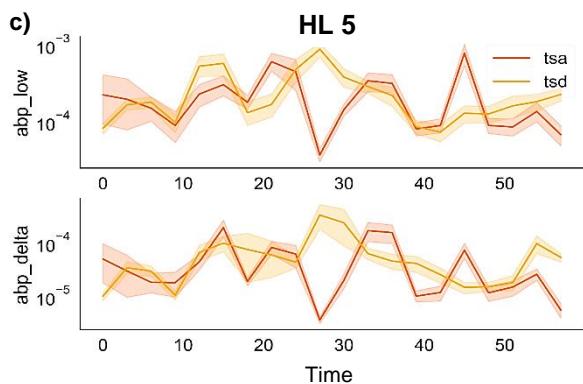
Na fig. 21 se encontram os valores de ABP low e ABP Delta, as menores frequências aqui calculadas. Para os estímulos de luz a nível local e sistêmica, não foi possível observar alterações consistentes após 5 e 10 minutos de luz para as

frequências avaliadas. As plantas controles não apresentaram alterações nas séries antes e depois.

Local



Sistêmico



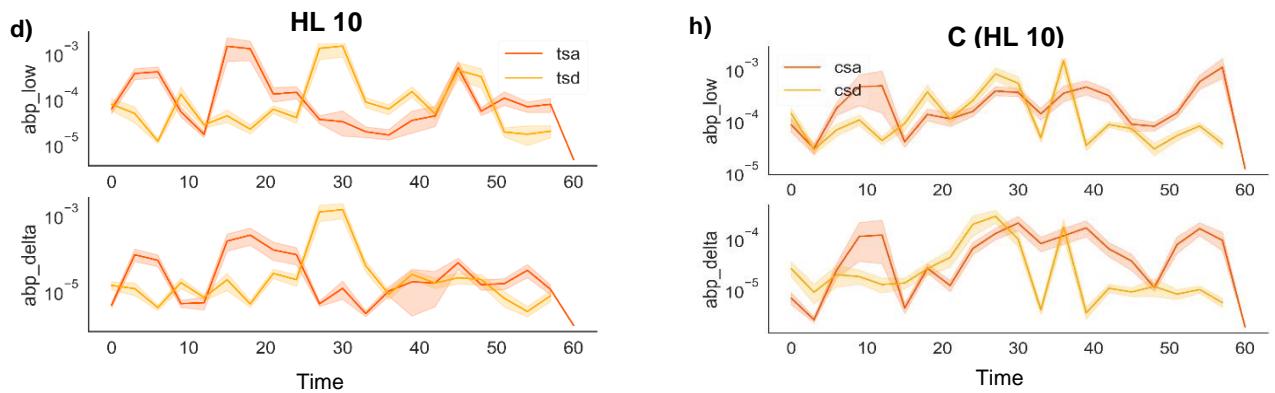
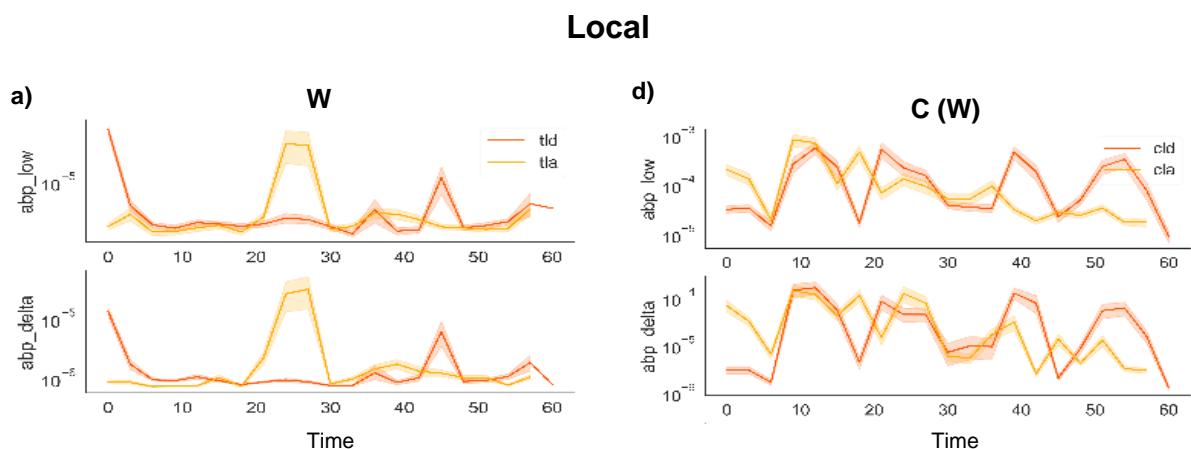


Figura 21 - Gráficos de TDAF para análise de ABP para as frequências low e Delta das folhas locais (a à d) e sistêmicas (e à h) antes e depois do tratamento de 5 e 10 minutos de Luz (HL5 e HL10) e seus respectivos grupos controle (C).

Para os outros estímulos (Fig 22), obtemos um aumento na energia das pequenas freqüências, e este aumento retorna para os valores anteriores após os primeiros 6 minutos. No entanto, para W+HS, esse aumento da energia das freqüências é observado em dois momentos: no primeiro é observado um aumento da energia das freqüências no início da série que se mantém por até 10 minutos, seguida de uma redução dessa energia; e o segundo momento, onde a energia volta a aumentar próximo dos 50 minutos e depois volta a diminuir. As diferenças nos controles encontradas nos primeiros momentos são menores que a média global, por isso, não consideramos que exista diferença nestes casos. No entanto, o controle para o W+HS manteve um aumento estável por mais de 16 minutos.



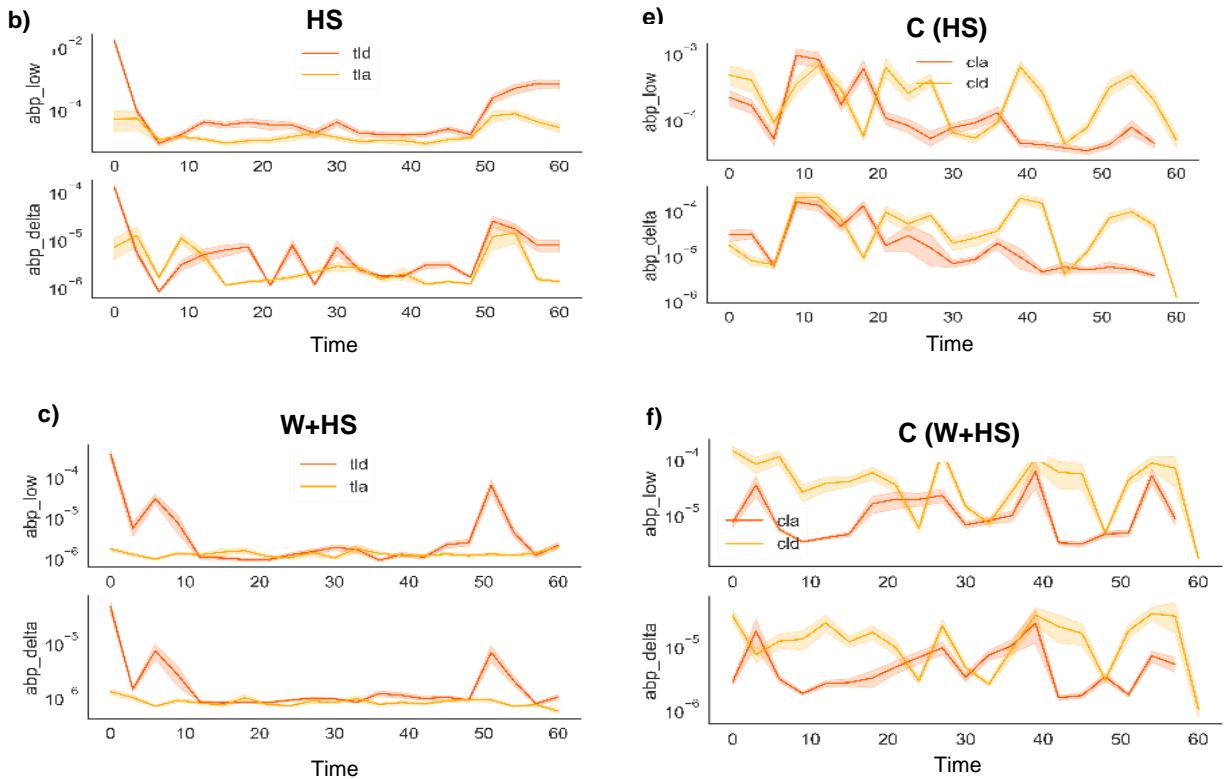
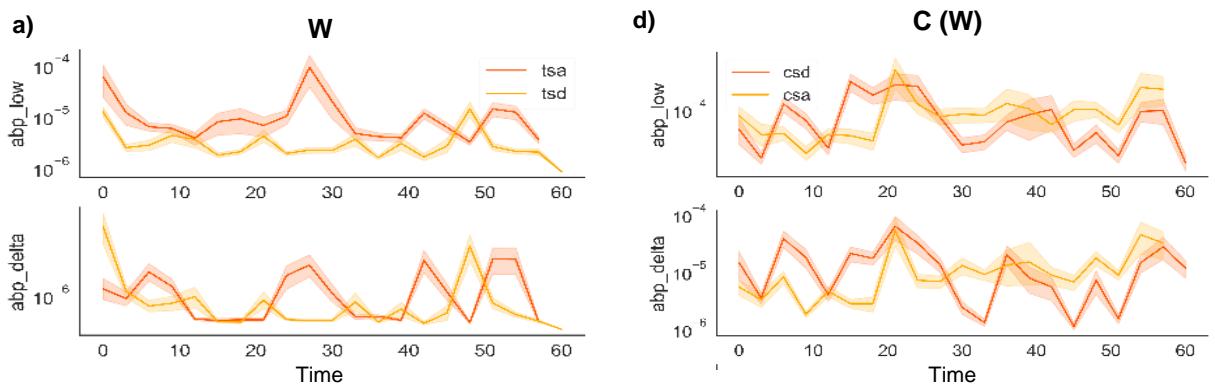


Figura 22 - Gráficos de TDAF para análise de ABP para as frequências low e Delta das folhas locais. Em (a) resultado para corte (W), em (b) choque de calor (HS), em (c) Corte+choque de calor (W+HS). Para (d), (e) e (f) temos o resultado para as plantas controles do corte C(W), choque de calor C(HS) e corte+choque de calor C(W+HS) respectivamente.

Na Fig. 23, os resultados para ABP low e Delta para as folhas sistêmicas indicam que houve alteração para as plantas que sofrem as injúrias, mas não foi encontrado alteração substancial para as plantas controle.



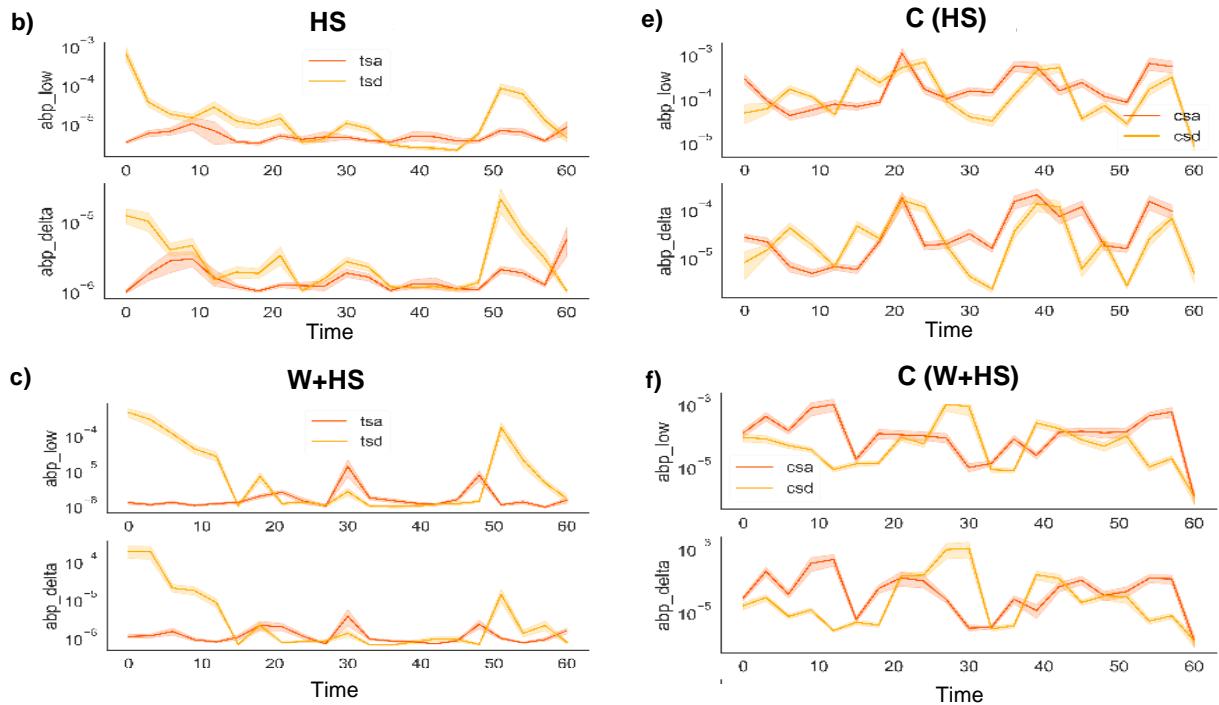
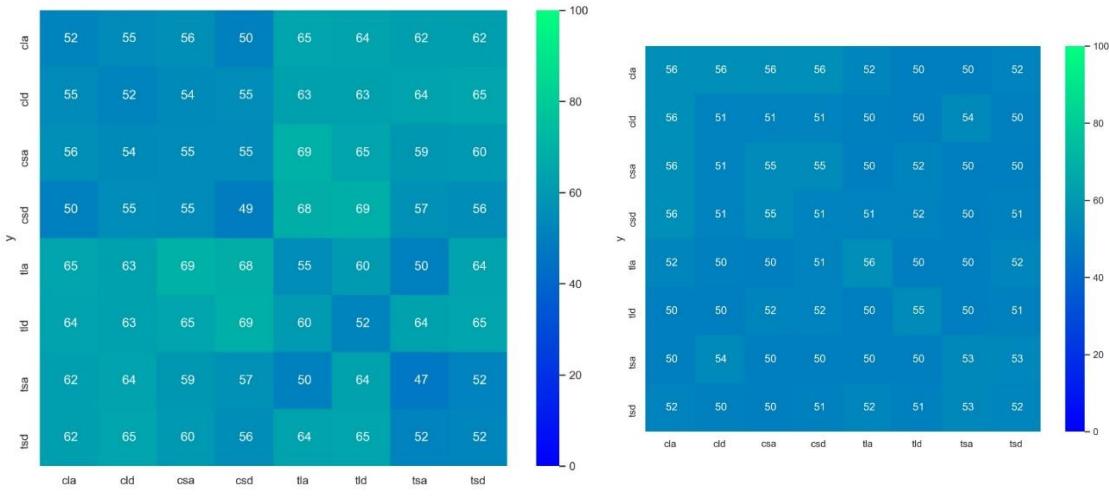


Figura 23 - Gráficos de TDAF para análise de ABP para as frequências low e Delta sistêmicas. Em (a) resultado para corte (W), em (b) Fogo (HS), em (c) Corte+choque de calor (W+HS). Para (d), (e) e (f) temos o resultado para as plantas controles do corte C(W), fogo C(HS) e corte+choque de calor C(W+HS) respectivamente.

Classificação por ML

Para o tratamento de 5 e 10 minutos de HL (Fig. 24 – a e c), não foram observados valores de acurácia significativos entre os grupos tla x tld e tsa x tsd que indicassem uma classificação, sendo que os valores de acurácia se mantiveram entorno de 60%, valores próximos ao Dummy.

HL 5



HL 10

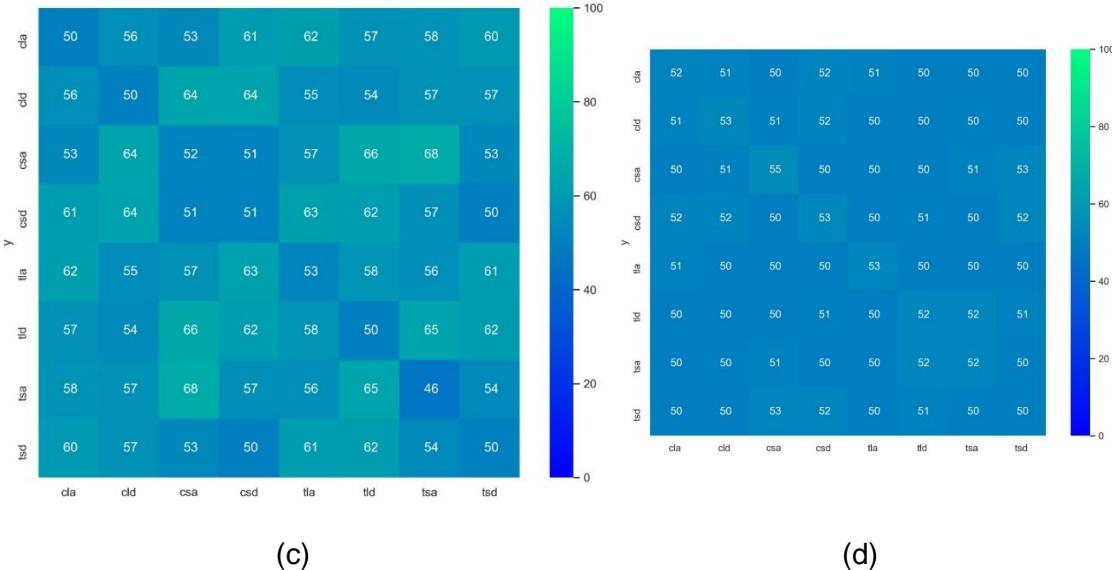


Figura 24 - Na matriz de confusão (a e c) encontramos os maiores valores de acurácia obtidos para classificação de x vs y para os grupos tla, tld, tsa, tsd, cla, cld, csa e csd. Na matriz de confusão (b e d) encontramos os maiores valores de acurácia obtidos pelo método Dummy para x vs y para os grupos tla, tld, tsa, tsd, cla, cld, csa e csd. A escala de cores vai de 0% a 100% de acurácia.

Para o tratamento corte, a classificação por ML retornou uma acurácia não significativa para os tratamentos tla x tld e tsa x tsd. Valores acima de 70% foram encontrados para esses grupos x controle (Fig. 25 - a). Na Fig. 25-b a matriz de confusão para os resultados para o Dummy retorna valores entorno de 50% indicando a fidedignidade dos dados.

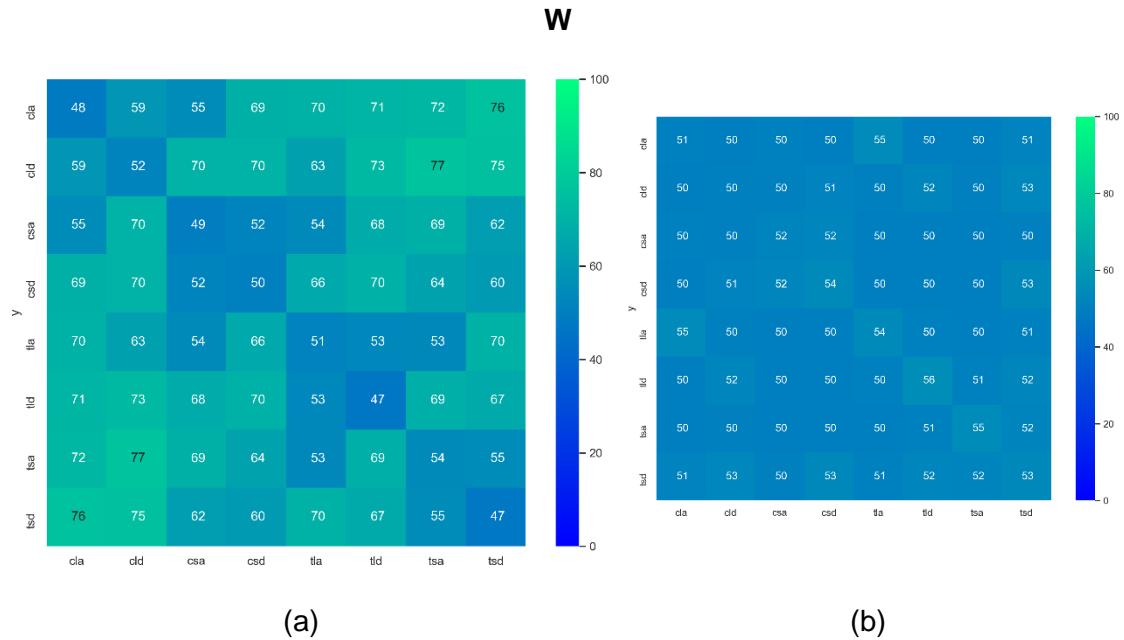


Figura 25 - Na matriz de confusão (a) encontramos os maiores valores de acurácia obtidos para classificação de x vs y para os grupos tla, tld, tsa, tsd, cla, cld, csa e csd. Na matriz de confusão (b) encontramos os maiores valores de acurácia obtidos pelo método Dummy para x vs y para os grupos tla, tld, tsa, tsd, cla, cld, csa e csd. A escala de cores vai de 0% a 100% de acurácia.

Na Fig. 26-a se encontram os maiores valores de acurácia obtido para classificação comparando entre todas as classes. Devido aos valores obtidos serem muito próximos ao do Dummy, não foi possível classificar as STs entre antes e depois o estímulo nos tecidos locais e sistêmicos usando esta estratégia de divisão de amostra. Na Fig. 26-b encontramos os resultados para o Dummy, todos retornaram valores próximos a 50% indicando boa distribuição de dados entre as classes.

HS

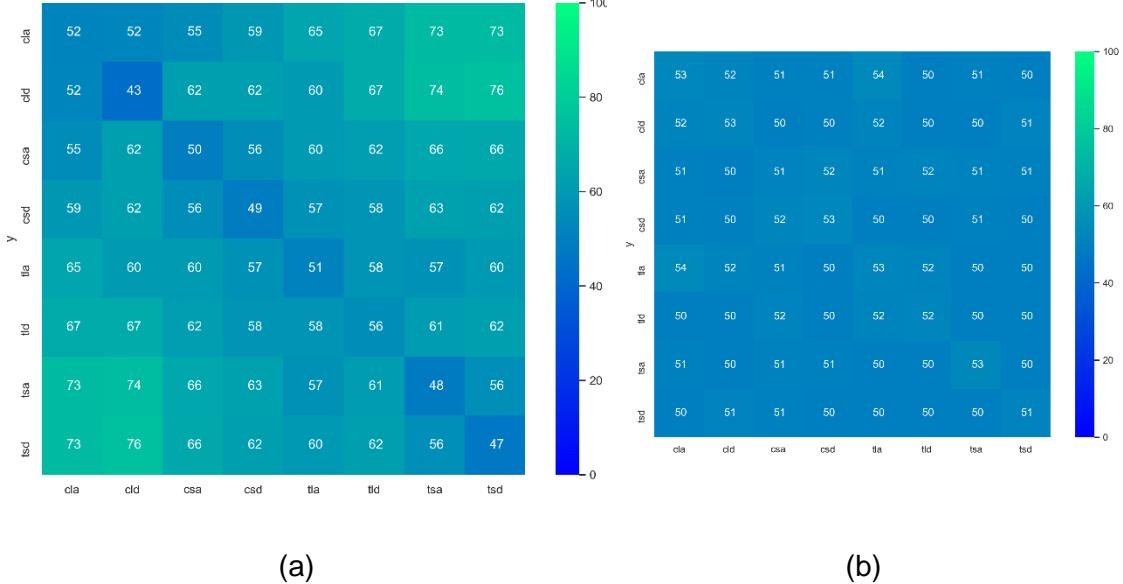


Figura 26 - Na matriz de confusão (a) encontramos os maiores valores de acurácia obtidos para classificação de x vs y para os grupos tla, tld, tsa, tsd, cla, cld, csa e csd, para o tratamento de choque de calor (HS). Na matriz de confusão (b) encontramos os maiores valores de acurácia obtidos pelo método Dummy para x vs y para os grupos tla, tld, tsa, tsd, cla, cld, csa e csd. A escala de cores vai de 0% a 100% de acurácia.

Na Fig. 27-a foi possível encontrar valores de acurácia acima de 90% obtido para classificação dos grupos controle x tratamento. Também foi possível classificar as STs entre antes e após os estímulos combinados nos tecidos locais e sistêmicos. Na Fig. 27-b encontramos os resultados para o Dummy, retornando valores próximos a 50%.

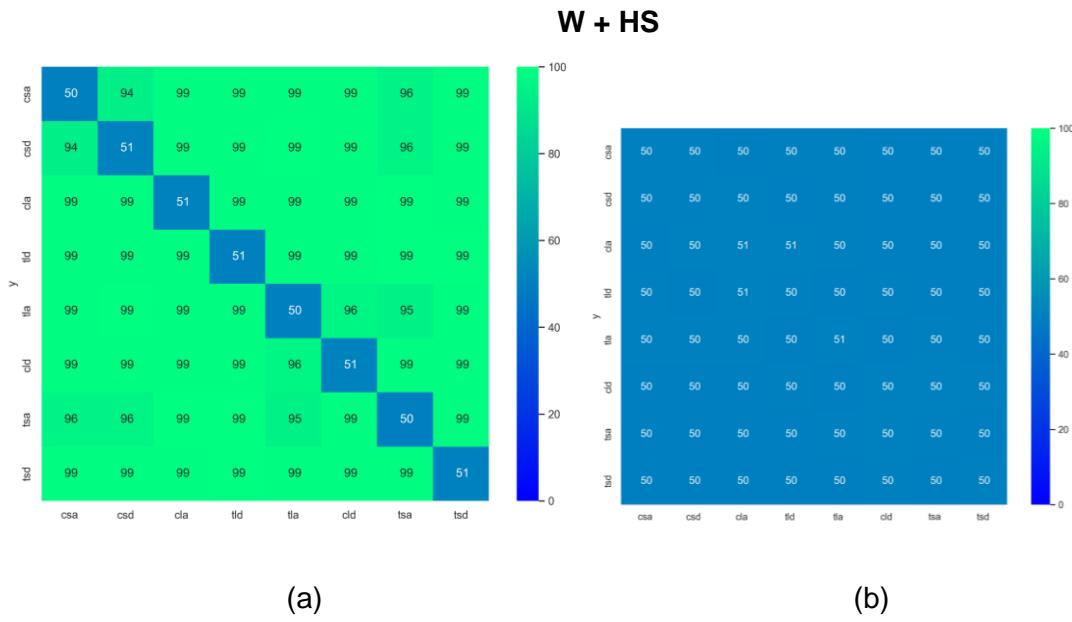


Figura 27 - Na matriz de confusão (a) encontramos os maiores valores de acurácia obtidos para classificação de x vs y para os grupos tla, tld, tsa, tsd, cla, cld, csa e csd, para o tratamento combinado de ferimento + choque de calor (W+HS). Na matriz de confusão (b) encontramos os maiores valores de acurácia obtidos pelo método Dummy para x vs y para os grupos tla, tld, tsa, tsd, cla, cld, csa e csd. A escala de cores vai de 0% a 100% de acurácia.

Medidas de variação de turgor

As medidas de mudança sistêmica na pressão hidráulica em plantas de feijão em resposta a uma aplicação local de HL5, HL10, HS, W e W+HS (Figura 28) foram obtidas usando sondas de pressão de turgor desenvolvidas para monitorar a variação da pressão hidráulica foliar em tempo real. Em resposta a um tratamento local de 5 e 10 min de Luz o sinal de pressão hidráulica iniciou alguns minutos após a aplicação do estímulo com um comportamento decrescente sem um pico correspondente a perda de turgor após os 5 minutos de exposição de luz (Figura 28 – b), e um comportamento ascendente do turgor após 10 minutos de luz com um pico 5 minutos após o estímulo (Figura 28 – c).

Em contraste, os estímulos de fogo, corte e estímulos combinados exibiram um sinal de pressão hidráulica sistêmica mais intensa que iniciaram quase imediatamente após a aplicação desses estímulos (Figuras 28 - c, d), sendo as alterações mais evidentes após a aplicação do choque de calor e dos estímulos combinados (W+HS).

Contudo, após a aplicação do choque térmico, foi observado um comportamento oscilatório que começa com uma queda rápida da pressão hidráulica, seguida de um rápido ganho de turgor 5 minutos após o estímulo, e assim

permanecendo por cerca de 10 minutos seguida de uma perda de turgor e um aumento da pressão 30 minutos após o estímulo (Figura 28 – c). Em relação ao ferimento, foi observado um rápido aumento do turgor foliar que atingiu um pico em torno de 5 minutos após o estímulo e um rápido retorno a pressão hidráulica a valores similares aos observados antes do estímulo (Figura 28 – d). Os dados de pressão hidráulica do grupo controle não apresentaram alterações consistentes 1 hora depois quando comparadas as plantas que sofreram os estímulos.

Outro detalhe, é a mudança do comportamento da dinâmica hidráulica dado pelo coeficiente de variação médio após a aplicação de cada estímulo, indicando que principalmente para os estímulos de HS e W+HS, as amostras mantêm um comportamento semelhante antes da aplicação dos estímulos, mas após a estimulação a individualidade se sobressai.

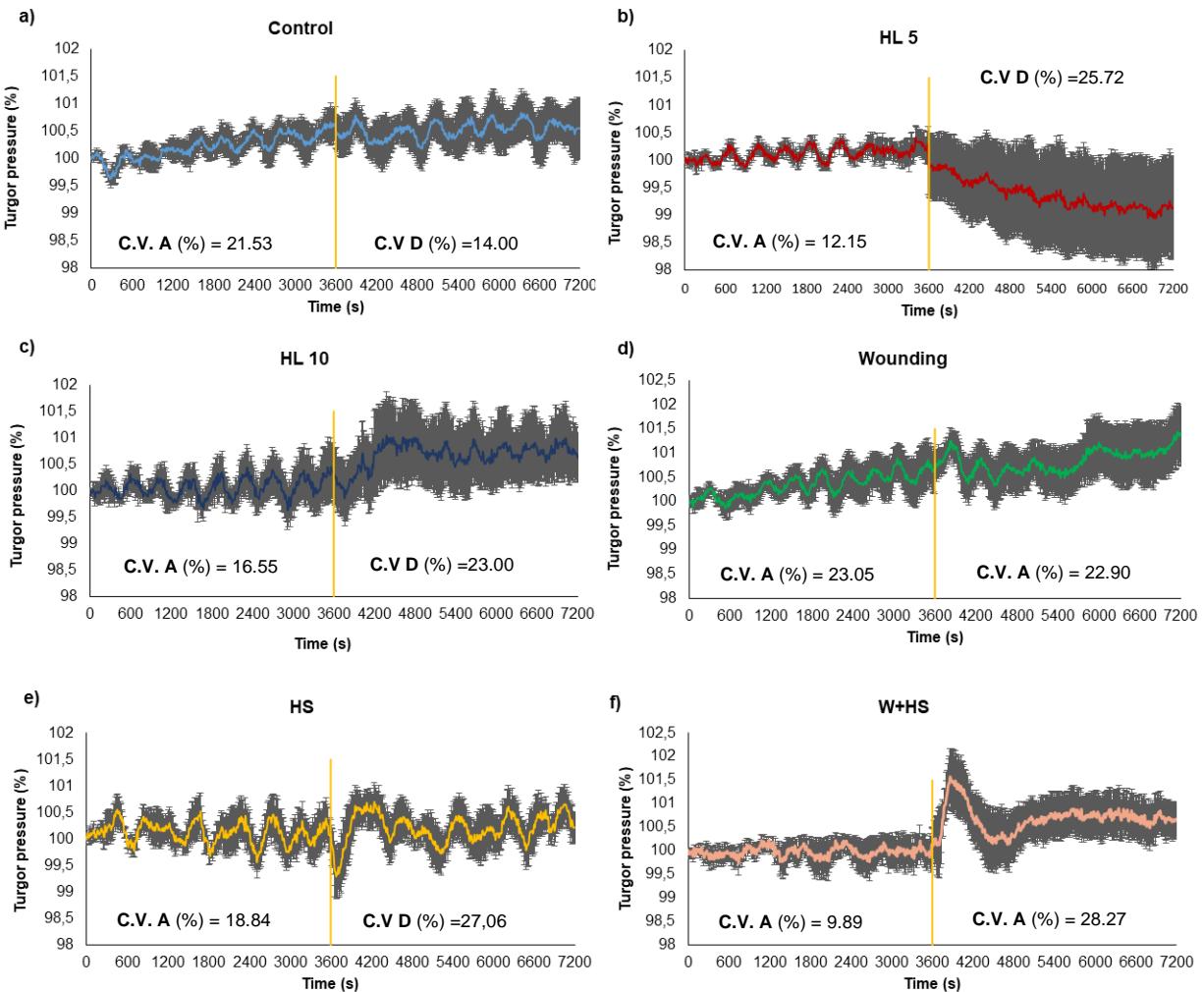


Figura 28 - Medidas de variação de pressão de turgor das folhas sistêmicas ao longo de 2h. A pressão hidráulica é representada como uma porcentagem da pressão de turgência inicial aos 0s. Os estímulos (a, b, c, d, e, f) foram aplicados após 1h de medida (representado por uma reta tracejada em laranja). Em cada gráfico, constam a média de 6 repetições biológicas ($n=6$) para os estímulos de alta luminosidade (HL em inglês) por 5, e 10 minutos, choque térmico (HS em inglês), ferimento (Wounding) e estímulos combinados (W+HS). Os coeficientes de variação médios foram obtidos para os dados antes (C.V.A) e depois (C.V.D).

8 DISCUSSÃO

Sabendo que os fatores ambientais atuam de forma espacialmente heterogênea nas plantas, os sistemas de sinalização desempenham um papel importante na formação das adaptações vegetais, possibilitando que sinais distantes gerados localmente se propaguem por todas as partes do organismo das plantas (ALFAGON et al., 2021; MUDRILOV et al., 2021; KOLLIST et al., 2019).

Além disso, cada estímulo pode afetar a planta de forma específica e desencadear respostas diferentes em cada módulo (BALFAGON et al., 2021). Logo,

entender como as plantas podem responder a diferentes estímulos, quais sinais são ativados e se há um padrão que possa ser identificado, tem sido o foco de pesquisas recentes (SIMMI et al., 2020, FICHMAN e MITTLER, 2021, PARISE et al., 2021; REISSIG et al., 2021).

A combinação de estresse é um termo usado para descrever a situação na qual uma planta é submetida simultaneamente a dois ou mais estímulos abióticos (MITTLER, 2006). Embora a combinação de estímulos tenha sido reconhecida como uma das principais causas de perda de safra em todo o mundo (MITTLER 2006; Suzuki et al 20014), só mais recentemente esta foi abordada em estudos de laboratório a nível molecular (RIZHSKY et al., 2002, 2004, SUZUKI et al 2016), enquanto são pouquíssimos os trabalhos que avaliam a dinâmica dos sinais após/durante a aplicação de estímulos combinados (ver MUDRILOV et al., 2021; VURALHAN-ECKERT et al., 2018).

Dada a complexidade dos sinais sistêmicos envolvidos, em particular do electroma das plantas, as técnicas de aprendizado de máquinas tornaram-se ferramentas poderosas utilizadas em diversos estudos no campo da fisiologia vegetal para auxiliar no reconhecimento de padrões (SIMMI et al., 2020, PARISE et al., 2021; REISSIG et al., 2021). Neste trabalho, com o auxílio destas técnicas e outras análises de séries temporais do electroma de folhas de feijão, identificamos que os estímulos de ferimento (W), choque de calor (HS) e sua combinação (W+HS) provocaram mudanças locais e sistêmicas rápidas, uma vez que esses são estímulos mecânicos e mais danosos em comparação aos níveis de irradiação testados, e que o padrão da dinâmica observada para os estímulos simples é diferente daqueles aplicados de forma combinada.

Frequências com maior amplitude e com mais energia, como mostrado pelos gráficos da ABP e expoente DFA, encontram-se nos primeiros trechos das séries, que juntamente com a redução dos valores de ApEn nestes mesmos instantes, indicam maior regularidade, que pode estar associada ao efeito de estresse nas plantas, como observado no trabalho de Saraiva et al. (2017). Os estudos de Souza et al. (2017) e Saraiva et al. (2017) avaliaram o expoente β (um indicador de energia das frequências), após submeterem plantas de soja a diferentes condições de estresse resultando num aumento do expoente em relação ao tratamento controle. Condições estressantes

demandam mais energia do sistema, e é possível que essa energia esteja por trás do desencadeamento da mudança sistêmica no electroma, tendo em vista que após o corte, as frequências do electroma da folha local e sistêmica apresentaram um aumento da amplitude para W e W+HS, mas numa intensidade menor do que o observado em HS local e sistêmico. Portanto, é aparente a necessidade de frequências com energia suficiente para desencadear mudança sistêmica consistentes no electroma.

Diferentemente dos outros estímulos, a combinação (W+HS) promoveu um comportamento bifásico do electroma, indicando uma possível integração dos sinais desencadeados por estes estímulos. Um comportamento semelhante foi observado quando uma combinação de calor + reirrigação foi aplicado em plantas de milho, gerando um potencial de variação induzido pelo calor, seguido por uma despolarização transitória induzida por reirrigação (VURALHAN-ECKERT et al., 2018).

Os resultados da variação de pressão de turgor das folhas sistêmicas indicam que o sinal hidráulico acompanha o sinal elétrico na indução de uma resposta sistêmica específica aos estímulos, assim como as alterações nos níveis de ROS. Dentre as alterações na dinâmica hidráulica, as mais evidentes foram observadas após os estímulos HS e W+HS. No trabalho de Vuralhan-Eckert et al. (2018), em que a condutividade estomática e a fotossíntese foram avaliadas, a aplicação de ambos os estímulos ao mesmo tempo mostrou que as plantas de milho respondem primeiro aos eventos de ferimento e depois aos processos induzidos pela reirrigação. Essa observação condiz com nosso resultado para a variação da pressão de turgor, em que a dinâmica hidráulica após W+HS apresenta um padrão semelhante ao W, mas com maior amplitude e duração possivelmente associadas ao efeito aditivo das ondas hidráulicas induzidas pelo estímulo combinado.

Quando os folíolos são danificados por queima ou ferida, ocorre a perda direta do conteúdo de água das plantas e, em muitas ocasiões, podem perturbar a vasculatura da planta, o que tem efeito direto sobre a pressão de turgência das células epidérmicas das plantas (MALONE e STANKOVIC, 1991; MALONE, 1994). Segundo Johns et al. (2021), o dano físico que rompe a integridade do xilema deve liberar a tensão nesses vasos e, devido à natureza relativamente incompressível da água, essa mudança de pressão será transmitida quase que instantaneamente através dos tecidos vasculares.

Por este motivo é possível observar as alterações na dinâmica hidráulica instantaneamente após os estímulos.

O estímulo de luz (HL 5 e 10) não desencadeou uma mudança no electroma que indicasse uma condição de estresse nas folhas locais e sistêmicas. De acordo com Zandalinas et al. (2020), que avaliou a resposta estomática sistêmica em plantas de soja, enquanto para *Arabidopsis* uma intensidade de luz de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ é um estresse luminoso que exigiria uma resposta estomática imediata (por exemplo, DEVIREDDY et al., 2018, BALFAGÓN et al. 2019), para soja uma intensidade de luz semelhante está dentro de sua faixa de luz fotossintética normal (por exemplo, WANG et al., 2020), e exigiria abertura estomática para aumentar a fotossíntese em condições de boa hidratação.

Essas observações condizem com os resultados de variação de turgor onde, após a estimulação com 5 min de HL, as folhas sistêmicas apresentaram uma perda de turgor lenta, mas consistente, provavelmente associada a abertura estomática e, consequentemente, induzindo aumento da fotossíntese da folha local. Segundo Zimmerman et al (2013), as oscilações na abertura estomática são refletidas nas taxas transpiratórias e na pressão de turgor que, por sua vez, influenciam a fotossíntese. Contudo, uma resposta semelhante não foi observada após os 10 minutos de HL com um período de aumento do turgor seguida de uma estabilização, indicando que o tempo de exposição à luz também pode induzir uma resposta hidráulica diferente na folha sistêmica. Além disso, a fotossíntese é uma das fontes de produção de EROS, o que pode explicar o aumento no conteúdo de EROs após 5 minutos de HL tanto na folha local quanto na folha sistêmica, e peroxidação lipídica na folha local. Por outro lado, após 10 min de HL a redução no conteúdo de EROs e ausência de peroxidação lipídica podem estar associados a ação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que podem levar algum tempo para atuarem. Portanto, a intensidade de luz usada aqui não induziu um estresse severo nas plantas avaliadas que tenha sido suficiente para sustentar respostas sistêmicas mais robustas.

Estudos mostraram que os níveis de EROs, a expressão de diferentes enzimas de eliminação de EROs e o nível de diferentes antioxidantes exibem um padrão único durante a combinação de estresse que é diferente daquele encontrado para ser induzido por cada uma das diferentes tensões aplicadas separadamente (FEROZA et

al., 2016; ZANDALINAS et al., 2018). Neste estudo, um aumento no conteúdo de peróxido de hidrogênio e superóxido após W e HS foram observados tanto nas folhas locais quanto nas folhas sistêmicas. Logo, os estímulos desencadearam um aumento da produção de EROs na folha local que, por sua vez, sinalizou para uma produção de EROs nas folhas sistêmicas.

Estudos avaliando respostas estomáticas sistêmicas em *Arabidopsis* mostraram dependência de sinais sistêmicos de espécies reativas de oxigênio (EROs), e incluem respostas de fechamento estomático sistêmico à luz ou ferimento, bem como respostas de abertura sistêmica ao calor (DEVIREDDY et al., 2018, 2020; KOLLIST et al., 2019; ZANDALINAS et al., 2020). Em plantas de soja, respostas estomáticas sistêmicas também foram associadas a uma dependência da sinalização sistêmica de ROS (FICHTMAN e MITTLER, 2020; ZANDALINAS et al., 2020). É possível associar os resultados citados acima àqueles observados neste estudo, em que obtivemos um aumento de EROs após W e um aumento do turgor resultante do fechamento estomático, enquanto para HS é possível ver um aumento significativo de EROs e uma diminuição do turgor relacionado a abertura estomática.

A redução no nível de peroxidação lipídica observado apenas para a combinação dos estímulos pode indicar uma rápida ativação dos mecanismos de defesa que poderiam ser mais bem esclarecidos por meio da avaliação dos mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos, não explorados aqui. Segundo Devorák e tal. (2021), de forma geral, a produção aumentada de ROS causada por vários estímulos ambientais desencadeia rapidamente a defesa antioxidante por vários mecanismos, incluindo sinalização retrógrada, controle transcricional, regulação pós-transcricional, modificações redox pós-tradicionais ou fosforilação e interações proteína-proteína.

Embora a estimulação provoque alterações na dinâmica hidráulica e elétrica por alguns instantes, é notório o retorno do comportamento destes sinais às condições de pré-estimulação minutos após a retirada do estímulo. Segundo Kranner et al. (2010), a resposta de uma planta ao estresse irá variar dependendo da duração (curto e longo prazo) e da severidade do estresse, e que “eventos de menor estresse” podem ser parcialmente compensados por aclimatação, adaptação e reparo, enquanto eventos de estresse severo ou crônico causam danos consideráveis e pode levar à morte de

células e tecidos. A aplicação de estímulos localmente pontuais e por um período curto (em alguns minutos), não levaram a um “colapso” de toda a planta, o que permitiu que esta retornasse a uma condição não estimulada minutos após a aplicação dos estímulos.

Além da participação dos sinais elétricos, sinal hidráulico e de ROS, associados às respostas de variação de turgor e ROS analisados aqui, não descartamos outros sinais sistêmicos como o óxido nítrico (NO), RNAs, hormônios e compostos orgânicos voláteis (VOCs) (BAUDOUIN e HANCOCK, 2014; WINTER e KRAGLER, 2018; BARBIER et al., 2019; ZEBELO et al., 2012), atuando em conjunto e auxiliando na ativação das respostas sistêmicas, tendo em vista os resultados da ML indicando que mesmo as plantas controle do estímulo combinado se diferenciam entre antes e depois com alto grau de acurácia, sugerindo a influência de uma sinalização planta-planta que precisa ser melhor avaliada, como observado no trabalho de Parise et al. (2021). Portanto, sinais de EROs atuam em conjunto com os sinais hidráulicos e elétricos na indução de respostas sistêmicas desencadeadas por estímulos locais simples e combinados.

9 CONCLUSÃO

Embora a transmissão de sinais elétricos seja claramente muito importante na forma como as plantas respondem ao seu ambiente, ainda não se sabe como as plantas lidam com uma situação em que estímulos externos agem de forma simultânea, nem como os diferentes sinais se comportam sob estas condições. O presente trabalho, portanto, tenta dar um passo adiante na compreensão deste ponto pouco explorado da fisiologia vegetal. Nossos resultados mostraram que as alterações no eletroctroma são diferentes entre os tipos de estímulos, incluindo a combinação destes, e que estes sinais elétricos são acompanhados por mudanças sistêmicas na dinâmica hidráulica e oxidativa. É possível que a combinação de estímulos neste estudo tenha promovido um efeito aditivo induzindo a ativação dos mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos de forma mais rápida, bem como induzindo uma onda hidráulica mais intensa e uma assinatura elétrica resultante dos sinais desencadeados por cada um dos estímulos que foram combinados. São necessários outros estudos que abordem a interdependência desses sinais quando a combinação de outros estímulos ou mesmo

a aplicação de inibidores ou mutantes que indiquem a influência do sinal na expressão de uma resposta complexa.

10 REFERÊNCIAS

- ADAGBASA, E. G.; ADELABU, S. A.; OKELLO, T. W. Application of deep learning with stratified K-fold for vegetation species discrimination in a protected mountainous region using Sentinel-2 image. **Geocarto Int.**, p. 1–21, 2019.
- AMIEN, S. et al. Defensin-like ZmES4 mediates pollen tube burst in maize via opening of the potassium channel KZM1. **PLoS biology**, v. 8, n. 6, p. e1000388, 2010.
- BAI, L. et al. Plasma membrane-associated proline-rich extensin-like receptor kinase 4, a novel regulator of Ca²⁺ signalling, is required for abscisic acid responses in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 60, n. 2, p. 314-327, 2009.
- BALFAGÓN, D. et al. Jasmonic acid is required for plant acclimation to a combination of high light and heat stress. **Plant Physiology**, v. 181, p. 1668-1682, 2019.
- BALFAGÓN, D. et al. Citrus rootstocks modify scion antioxidant system under drought and heat stress combination. **Plant Cell Reports**, p. 1-10, 2021.
- BALUSKA, F. **Communication in plants**. 2006.
- BAUER, H. et al. The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis. **Current Biology**, v. 23, p. 53-57, 2013.
- BAUDOUIN, E.; HANCOCK, J. Nitric oxide signaling in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 553, 2014.
- BARBIER, F. et al. An update on the signals controlling shoot branching. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 3, p. 220-236, 2019.
- BRAMLEY, H. et al. Water flow in the roots of crop species: the influence of root structure, aquaporin activity, and waterlogging. **Advances in agronomy**, v. 96, p. 133-196, 2007.
- BRÉDA, N. et al. Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. **Annals of Forest Science**, v. 63, n. 6, p. 625-644, 2006.
- CARMODY, M. et al. ROS signalling in a destabilised world: A molecular understanding of climate change. **Journal of plant physiology**, v. 203, p. 69-83, 2016.
- CASTRO, B. et al. Stress-induced reactive oxygen species compartmentalization, perception and signalling. **Nature plants**, v. 7, n. 4, p. 403-412, 2021.

CHOI, Won-Gyu 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**, v. 111, n. 17, p. 6497-6502, 2014.

CHOI, W. et al. Orchestrating rapid long-distance signaling in plants with Ca²⁺, ROS and electrical signals. **The Plant Journal**, v. 90, n. 4, p. 698-707, 2017.

CHOI, Won-Gyu et al. Rapid, long-distance electrical and calcium signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 67, p. 287-307, 2016.

CHRISTMANN, A; GRILL, E; HUANG, J. Hydraulic signals in long-distance signaling. **Current opinion in plant biology**, v. 16, n. 3, p. 293-300, 2013.

CRAESEN, M.; DE MOOR, B. **Hyperparameter Search in Machine Learning**, 2015

CONSIDINE, J.; FOYER, C. Oxygen and reactive oxygen species-dependent regulation of plant growth and development. **Plant Physiology**, v. 186, n. 1, p. 79-92, 2021.

COSTA, M.; GOLDBERGER, A. L.; PENG, C.-K. Multiscale entropy analysis of biological signals. **Physical review E**, v. 71, n. 2, p. 021906, 2005.

DAVIES, W. J.; ZHANG, J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. **Annual review of plant biology**, v. 42, n. 1, p. 55-76, 1991.

DEVIREDDY, A. R. et al. Coordinating the overall stomatal response of plants: rapid leaf-to-leaf communication during light stress. **Science Signaling**, v. 11, p. 1126, 2018.

DEVIREDDY, A. et al. Coordinated and rapid whole-plant systemic stomatal responses. **New Phytologist**, v. 225, p. 21-25, 2020.

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. et al. Plant electrome: the electrical dimension of plant life. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 31, n. 1, p. 21-46, 2019.

DVOŘÁK, P. et al. Signaling toward reactive oxygen species-scavenging enzymes in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 2178, 2021.

FICHMAN, Y. et al. Whole-plant live imaging of reactive oxygen species. **Mol. Plant**, v. 12, p. 1203-1210, 2019.

FICHMAN, Y.; MITTLER, R. Rapid systemic signaling during abiotic and biotic stresses: is the ROS wave master of all trades? **The plant journal**, v. 2020, p. 887-896, 2020.

FICHMAN, Y. et al. Plasmodesmata-localized proteins and ROS orchestrate light-induced rapid systemic signaling in Arabidopsis. **Science Signaling**, v. 14, n. 671, 2021.

FICHMAN, Y.; MITTLER, R. Integration of electric, calcium, reactive oxygen species and hydraulic signals during rapid systemic signaling in plants. **The Plant Journal**, 2021.

FORMAN, G.; SCHOLZ, M. Apples-to-Apples in Cross-Validation Studies: Pitfalls in Classifier Performance Measurement. **HP labs**, v. 12, p. 49–57, 2009.

FREUND, Y.; SCHAPIRE, R. E. A Decision-Theoretic Generalization of On-Line Learning and an Application to Boosting. **J. Comput. Syst. Sci.** v. 55, p. 119–139, 1997.

FROMM, J.; BAUER, T. Action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 4, p. 463-469, 1994.

FROMM, J. Long-distance electrical signaling and physiological functions in higher plants. In: **Plant electrophysiology**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 269-285, 2006.

FROMM, J.; LAUTNER, S. Electrical signals and their physiological significance in plants. **Plant, cell & environment**, v. 30, n. 3, p. 249-257, 2007.

FROMM, J. et al. Electrical signaling along the phloem and its physiological responses in the maize leaf. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 239, 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. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. **Trends in plant science**, v. 19, n. 10, p. 623-630, 2014.

GILROY, S. et al. ROS, Calcium, and Electric Signals: Key Mediators of Rapid Systemic Signaling in Plants, *Plant Physiology*, v. 171, p. 1606–1615, 2016.

GUNAR, I. I.; SINYKHIN, A. M. A spreading wave of excitation in higher plants. **Proc Acad Sci USSR (Botany)**, v. 142, p. 214-215, 1962.

GUO, H. et al. Three related receptor-like kinases are required for optimal cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 18, p. 7648-7653, 2009.

GUO, H. et al. Systemic induction of photosynthesis via illumination of the shoot apex is mediated sequentially by phytochrome b, auxin and hydrogen peroxide in tomato. **Plant Physiol.**, v. 172, p. 1259-1272, 2016.

GUROVICH, L. A. Electrophysiology of woody plants. In: **Electrophysiology-From Plants to Heart**. InTech, 2012.

HARRIS, C. R. et al. Array programming with NumPy. **Nature**, v. 585, p. 357–362, 2020.

HASWELL, E.; PHILLIPS, R; REES, D. Mechanosensitive channels: what can they do and how do they do it?. **Structure**, v. 19, n. 10, p. 1356-1369, 2011.

HSU, W.; CHANG, C.; LIN, C. A Practical Guide to Support Vector Classification. *Dep. Comput. Sci. Natl. Taiwan Univ*, 2016.

HUBER, A.; BAUERLE, T. Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge, *Journal of Experimental Botany*, v. 67, p. 2063–2079, 2016.

HUNTER, J. D. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Comput. Sci. Eng.* v. 9, p. 90–95, 2007.

IAC, Cultivares, 2016. Disponível em: <http://oagronomico.iac.sp.gov.br/?p=14>. Acesso em: 30/05/2022.

JOHNS S. et al. The fast and the furious: rapid long-range signaling in plants, *Plant Physiology*, v. 185, p. 694–706, 2021.

KADOTA, Y.; SHIRASU, K.; ZIPFEL, C. Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity. *Plant and Cell Physiology*, v. 56, n. 8, p. 1472-1480, 2015.

KIEP, V. et al. Systemic cytosolic Ca²⁺ elevation is activated upon wounding and herbivory in Arabidopsis. *New Phytologist*, v. 207, n. 4, p. 996-1004, 2015.

KOLLIST, H. et al. Rapid responses to abiotic stress: Priming the landscape for the signal transduction network. *Trends in Plant Science*, v. 24, n. 1, p. 25-37, 2019.

KOZIOLEK, C. et al. Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals. *New Phytologist*, v. 161, n. 3, p. 715-722, 2004.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytologist*, v. 188, n. 3, p. 655-673, 2010.

LAUTNER, S. et al. Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis. *Plant Physiology*, v. 138, n. 4, p. 2200-2209, 2005.

LEW, S. et al. Real-time detection of wound-induced H₂O₂ signalling waves in plants with optical nanosensors. *Nature plants*, v. 6, n. 4, p. 404-415, 2020.

LI, C. et al. Hypoxia tolerance and adaptation of anaerobic respiration to hypoxia stress in two Malus species. *Scientia Horticulturae*, v.124, p. 274–279, 2010.

LOPEZ, R. et al. Tree shoot bending generates hydraulic pressure pulses: a new long-distance signal?. *Journal of experimental botany*, v. 65, n. 8, p. 1997-2008, 2014.

LUJAN-MORENO, G. et al. Design of experiments and response surface methodology to tune machine learning hyperparameters, with a random forest case-study. *Expert Syst. Appl.* v. 109, p. 195–205, 2018.

Mackay, D. J. C., and Gibbs, M. N. Variational Gaussian process classifiers. *IEEE Trans. Neural Networks*, v. 11, p. 1458–1464, 2000.

MALONE, M.; STANKOVIĆ, B. Surface potentials and hydraulic signals in wheat leaves

following localized wounding by heat. **Plant, Cell & Environment**, v. 14, n. 4, p. 431-436, 1991.

MALONE, M. Hydraulic signals. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 341, n. 1295, p. 33-39, 1993.

MALONE, M. Rapid, long-distance signal transmission in higher plants. **Advances in botanical research**, v. 22, p. 163-228, 1996.

MARCEC, M. J. et al. Mutual interplay of Ca^{2+} and ROS signaling in plant immune response. **Plant Sci.** v. 283, p. 343-354, 2019.

MCKINNEY, W. Data Structures for Statistical Computing in Python, p. 56–61, 2010. doi:10.25080/Majora-92bf1922-00a.

SUZUKI, N; MITTLER, R. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. **Physiologia plantarum**, v. 126, n. 1, p. 45-51, 2006.

MITTLER, R.; BLUMWALD, E. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspective. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 61, p. 443-462, 2010.

MITTLER, R. et al. ROS signaling: the new wave?. **Trends in plant science**, v. 16, n. 6, p. 300-309, 2011.

MORETTIN, P. A.; TELOI, C. M. C. **Análise de Séries Temporais**. Editora Blucher, 2004.

NAKAGAWA, Y. et al. Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca^{2+} influx and touch sensing in roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 9, p. 3639-3644, 2007.

NGUYEN, C. et al. Identification of cell populations necessary for leaf-to-leaf electrical signaling in a wounded plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 40, p. 10178-10183, 2018.

NOCTOR, G.; REICHHELD, J.; FOYER, C. ROS-related redox regulation and signaling in plants. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, p. 3 – 12, 2018.

OCAK, H. Automatic detection of epileptic seizures in EEG using discrete wavelet transform and approximate entropy. **Expert Systems with Applications**, v. 36, p. 2027–2036, 2009.

PASSIOURA, J. B. The effect of root geometry on the yield of wheat growing on stored water. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 23, n. 5, p. 745-752, 1972.

PARISE, A. et al. Detection of different hosts from a distance alters the behaviour and bioelectrical activity of *Cuscuta racemosa*. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 409, 2021.

Pedregosa, F. et al. Scikit-learn: Machine Learning in Python. **J. Mach. Learn. Res.** v. 12, p. 2825–2830, 2020.

PICKARD, B. G. Action potentials in higher plants. **The Botanical Review**, v. 39, n. 2, p. 172-201, 1973.

PINCUS, S. Approximate Entropy as a measure of system complexity. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, 88: 2297–2301, 1991.

PINCUS, S.; GOLDBERGER, A.L. Physiological time-series analysis: What does regularity quantify? **American Journal of Physiology**, 266: 1643–1656, 1994.

PINCUS, S. Approximate entropy (ApEn) as a complexity measure. **Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science**, v. 5, n. 1, p. 110-117, 1995.

PROBST, P.; BISCHL, B. **Tunability: Importance of Hyperparameters of Machine Learning Algorithms**, 2019.

REISER, V.; RAITT, D.; SAITO, H. Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. **The Journal of cell biology**, v. 161, n. 6, p. 1035-1040, 2003.

REISSIG, G. et al. Fruit Herbivory Alters Plant Electrome: Evidence for Fruit-Shoot Long-Distance Electrical Signaling in Tomato Plants. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, p. 244, 2021.

RIZHSKY, L. et al. When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. **Plant physiology**, v. 134, n. 4, p. 1683-1696, 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.

SCHROEDER, J. I.; HEDRICH, R.; FERNANDEZ, J. M. Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of Vicia faba. **Nature**, v. 312, n. 5992, p. 361-362, 1984.

SIBAOKA, T. Action potentials in plant organs. In: **Symp. Soc. Exp. Biol.** 1966. p. 49-74.

SIMMI, F. Z. et al. Electrome alterations in a plant-pathogen system: Toward early diagnosis. **Bioelectrochemistry**, v. 133, p. 107493, 2020.

sklearn.dummy.DummyClassifier (2020). Available at: <https://scikit-learn.org/stable/modules/generated/sklearn.dummy.DummyClassifier.html>.

SHAO, Q. et al. Two glutamate-and pH-regulated Ca²⁺ channels are required for systemic wound signaling in Arabidopsis. **Science Signaling**, v. 13, n. 640, 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.

STAHLBERG, R; COSGROVE, D. The propagation of slow wave potentials in pea epicotyls. **Plant Physiology**, v. 113, n. 1, p. 209-217, 1997.

STAHLBERG, R.; CLELAND, R. E.; VAN VOLKENBURGH, E. **Communication in plants: Neuronal aspects of plant life**. 2006.

STEUDLE, E. The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant roots. **Annual review of plant biology**, v. 52, n. 1, p. 847-875, 2001.

SUKHOV, V. Electrical signals as mechanism of photosynthesis regulation in plants. **Photosynthesis Research**, v. 130, n. 1-3, p. 373-387, 2016.

SUKHOV, V.; SUKHOVA, E.; VODENEYEV, Vladimir. 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.; SUKHOV, V. Electrical Signals, Plant Tolerance to Actions of Stressors, and Programmed Cell Death: Is Interaction Possible?. **Plants**, v. 10, n. 8, p. 1704, 2021.

SUKHOVA, E.; AKINCHITS, E.; SUKHOV, V. Mathematical models of electrical activity in plants. **J. Membr. Biol.**, v. 250, p. 407–423, 2017.

SUZUKI, N. et al. Temporal-spatial interaction between reactive oxygen species and abscisic acid regulates rapid systemic acclimation in plants. **The Plant Cell**, v. 25, n. 9, p. 3553-3569, 2013.

SUZUKI, N. et al. Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytol.**, v. 203, p. 32-43, 2014.

TORRES-RUIZ, J. et al. Role of hydraulic and chemical signals in leaves, stems and roots in the stomatal behaviour of olive trees under water stress and recovery conditions. **Tree Physiology**, v. 35, n. 4, p. 415-424, 2015.

TOYOTA, M. et al. Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. **Science**, v. 361, n. 6407, p. 1112-1115, 2018.

TUTEJA, N; SOPORY, K. Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 3, n. 8, p. 525-536, 2008.

TYREE, M.; YANG, S. Water-storage capacity of Thuja, Tsuga and Acer stems measured by dehydration isotherms. **Planta**, v. 182, n. 3, p. 420-426, 1990.

VAN, G.; DRAKE, F. L. **Python 3 Reference Manual; CreateSpace**. Scotts Valley, CA: CreateSpace, 2009.

- VEGA-MUÑOZ, I. et al. Breaking Bad News: Dynamic molecular mechanisms of wound response in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1959, 2020.
- VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. **Plant Science**, v. 151, p. 59–66, 2000.
- VIRTANEN, P. et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. **Nat. Methods**, v. 17, p. 261–272, 2020.
- VODENEV, V.; AKINCHITS, E.; SUKHOV, V. Variation potential in higher plants: mechanisms of generation and propagation. **Plant Signaling & Behavior**, v. 10, n. 9, p. e1057365, 2015.
- VOLKOV, A.; HAACK, R. A. Insect-induced bioelectrochemical signals in potato plants. **Bioelectrochemistry and bioenergetics**, v. 37, n. 1, p. 55-60, 1995.
- VOLKOV, A.; 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. **Plant electrophysiology**. Berlin: Springer, 2006.
- VOLKOV, A. **Plant electrophysiology: methods and cell electrophysiology**. Springer Science & Business Media, 2012.
- VURALHAN-ECKERT, J; LAUTNER, S; FROMM, J. Effect of simultaneously induced environmental stimuli on electrical signalling and gas exchange in maize plants. **Journal of plant physiology**, v. 223, p. 32-36, 2018.
- WANG, Z et al. Monitoring system for electrical signals in plants in the greenhouse and its applications. **Biosystems engineering**, v. 103, n. 1, p. 1-11, 2009.
- WHEELER, G.; BROWNLEE, C. Ca²⁺ signalling in plants and green algae—changing channels. **Trends in plant science**, v. 13, p. 506-514, 2008.
- WILDON, D. C. et al. Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. **Nature**, v. 360, p. 62, 1992.
- WINTER, N.; KRAGLER, F. Conceptual and methodological considerations on mRNA and proteins as intercellular and long-distance signals. **Plant and Cell Physiology**, v. 59, n. 9, p. 1700-1713, 2018.
- ZANDALINAS, S. et al. Activation of secondary metabolism in citrus plants is associated to sensitivity to combined drought and high temperatures. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1954, 2017.
- ZANDALINAS, S.; MITTLER, R. ROS-induced ROS release in plant and animal cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 122, p. 21-27, 2018.

ZANDALINAS, S. et al. Identification and characterization of a core set of ROS wave-associated transcripts involved in the systemic acquired acclimation response of *Arabidopsis* to excess light. **The Plant Journal**, v. 98, p. 126-141, 2019.

ZANDALINAS, S. I. et al. Systemic signaling during abiotic stress combination in plants. **PNAS**, v. 117, p. 13810-13820, 2020.

ZEBELO, S. et al. Plasma membrane potential depolarization and cytosolic calcium flux are early events involved in tomato (*Solanum lycopersicum*) plant-to-plant communication. **Plant Science**, v. 196, p. 93-100, 2012.

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.