

HERBIVORIA NO FRUTO ALTERA O ELECTROMA E PROMOVE INCREMENTO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM PLANTAS DE TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom)

RICARDO PADILHA DE OLIVEIRA¹; LUIS FELIPE BASSO²; THIAGO FRANCISCO DE CARVALHO OLIVEIRA³; DORI EDSON NAVA⁴; GABRIELA NIEMEYER REISSIG⁵ GUSTAVO MAIA SOUZA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – ricardo.padilha69@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – felipestrapazon2409@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fthicar@gmail.com

⁴Embrapa Clima Temperado – dori.edson-nava@embrapa.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – gabriela.niemeyer.reissig@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – gumaia.gms@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A compreensão da interação entre plantas e herbívoros é de vital importância para biologia e para a agronomia, tendo em vista que os maiores desafios da humanidade hoje são produzir alimentos de forma eficaz e com o menor impacto no ambiente possível. Para isso, precisamos elucidar os processos de percepção, sinalização e respostas das plantas sob os mais variados estresses bióticos que as plantas enfrentam no ambiente natural (LEW et al., 2020). Neste trabalho buscamos compreender como plantas de tomateiro respondem ao ataque de herbívoros no fruto. Pressupomos que a sinalização sistêmica também pode partir do fruto predado, de forma que a planta perceba estes sinais e posteriormente elabore seus mecanismos de defesa e resistência ao estresse.

O sinal elétrico aparece como um forte candidato para essa sinalização de longa distância, pois independe do fluxo de massa do sistema vascular para sua transmissão. O sinal elétrico é oriundo de mudanças nos potenciais da membrana celular, levando à modificação dos canais iônicos e transportadores da membrana plasmática, que por sua vez alteram a voltagem da membrana causando um desequilíbrio iônico (CUIN et al., 2018). Recentemente, foi proposto o termo “eletroma vegetal”, considerando a complexidade da rede de sinalização vegetal e sua analogia com algumas características dos neurônios do cérebro humano (de Toledo et al., 2019). O eletroma da planta refere-se à totalidade da atividade elétrica em uma região da planta que corresponde ao contexto ambiental no qual o sistema está imerso (SARAIVA et al., 2017).

O objetivo do nosso trabalho foi avaliar alterações do eletroma de plantas de tomateiro (*Solanum Lycopersicum* cv. Micro-Tom) antes e depois de sofrerem herbivoria nos frutos por larvas de *Helicoverpa armigera*, bem como quantificar a concentração de peróxido de hidrogênio em folhas próximas ao local de ataque para obtermos um indicativo de sinalização e resposta sistêmica.

2. METODOLOGIA

O cultivo dos tomateiros foi realizado conforme procedimentos adotados por Reissig e colaboradores (2020), em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Botânica/UFPel. Quando os frutos estavam totalmente maduros, as plantas foram levadas da casa de vegetação para a sala de eletrofisiologia do LACEV (Laboratório de Cognição e Eletrofisiologia Vegetal),

onde ficaram aclimatando por um dia antes da realização do experimento (temperatura da sala 25,0 °C ± 0,2; fotoperíodo de 12 horas).

O experimento foi realizado no interior de uma gaiola de Faraday, para diminuir a interferência externa de ruídos no sinal elétrico. Foram realizadas quatro repetições por dia, totalizando vinte e quatro. Para captação destes sinais utilizamos o amplificador de sinais MP36 (BIOPAC®), adaptado para captação elétrica em plantas. Os sinais foram captados a partir de eletrodos inseridos no pedúnculo do tomate, onde ficaram aclimatando por 2 horas. Após este período, foi iniciada a coleta de dados do controle (antes da colocação das lagartas). Após dispor as lagartas sobre os frutos, foi iniciada a coleta dos sinais elétricos do fruto sob herbivoria onde foram captadas 24 horas de sinais elétricos. A criação das lagartas de *Helicoverpa armigera* foi realizada na Embrapa Clima Temperado, no laboratório de Entomologia, baseada em metodologia proposta por Vilela et al. (2014), até atingirem o quarto ínstar.

Uma planta controle para a coleta de material para as análises químicas foi colocada juntamente na gaiola de Faraday. A Figura 1 ilustra a execução deste experimento. Após 24 e 48 horas do final da captação dos sinais elétricos, foi realizada a coleta de folhas das plantas controle e das plantas sob herbivoria. Foram coletadas as folhas mais próximas do local de herbivoria para a quantificação de peróxido de hidrogênio, utilizado como um indicador da sinalização sistêmica.



Figura 1 - Fruto de tomate 'Micro-Tom' sob herbivoria.

As séries temporais obtidas foram analisadas através da Transforma Rápida de Fourier (Fast Fourier transform - FFT), Função de Densidade Espectral de Potência (Power Spectrum Density - PSD) e Wavelet, com a finalidade de avaliar as frequências dos sinais (SIMMI et al., 2020). A quantificação de peróxido de hidrogênio foi realizada por espectrofotometria, em triplicata (VELIKOVA et al., 2000). Os dados foram submetidos a análise de variância unilateral (ANOVA). Quando F foi significativo, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$). O programa estatístico utilizado foi o SigmaPlot® 12.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontram-se os dados referentes as análises do sinal elétrico. Podemos observar que houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o controle e a herbivoria em todas as análises realizadas. A FFT consegue expressar uma função em termos de senóides, decompondo a série temporal em frequências dominantes. A PSD, assim como a FFT, também tem o poder de decompor a série temporal em frequências, no entanto, pode-se obter a energia associada a força empregada pela onda em seu deslocamento. Através desta informação podemos inferir não só sobre a frequência, mas também o quão energética estas frequências podem ser. A transformada de Wavelet, diferentemente da FFT e da PSD, que operam apenas no domínio da frequência, consegue obter informação das frequências no domínio do tempo. Assim conseguimos observar em que momento, e por quanto tempo duraram, as frequências dominantes (SARAIVA et al., 2017; SIMMI et al., 2020).

Tabela 1 – FFT, PSD e Wavelet dos sinais elétricos obtidos no pedúnculo de frutos de tomate submetidos a herbivoria por lagartas de *Helicoverpa armigera*.

Análises	Controle	Tratamento
FFT	$0.00002970 \pm 0.00002351^*$	$0.00000815 \pm 0.00000796$
PSD	$0.00000194 \pm 0.00000183$	$0.00003252 \pm 0.00027860^*$
Wavelet	$0.00004201 \pm 0.00010509^*$	$0.00001153 \pm 0.00001955$

Valores representam a média \pm DP ($n = 24$). Médias seguidas por * na mesma linha diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) pelo teste *t* de Student. Controle: antes da herbivoria; Tratamento: depois da herbivoria.

Utilizamos a análise de peróxido de hidrogênio como um marcador para observar como as plantas respondiam ao longo do tempo durante a herbivoria (Tab. 2). Após 48 h de herbivoria no fruto houve um aumento significativo ($p \leq 0,05$) da concentração em comparação com a planta controle (aumento de 21%). Comparando os tempos 24 h e 48 h após herbivoria, observamos uma maior concentração no período mais longo (aumento de 15%). O peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa de oxigênio amplamente relacionada aos mecanismos de sinalização e defesa da planta à estresses bióticos, tendo papel fundamental na sinalização de longa distância e respostas de defesa (Lew et al., 2020).

Tabela 1 - Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em folhas de tomate 'Micro-Tom' durante 24 e 48 horas de herbivoria no fruto.

	$H_2O_2^*$	
	24 horas	48 horas
Controle	$1,395 \pm 0,152^{Aa}$	$1,489 \pm 0,088^{Ba}$
Herbivoria	$1,565 \pm 0,111^{Ab}$	$1,797 \pm 0,088^{Aa}$

Valores representam a média + DP ($n=6$). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e pela mesma letra minúscula na linha não diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) pelo teste *t* de Student. $^*\mu\text{mol g}^{-1}$ massa fresca.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos até o momento indicam que fatores ambientais de estresse, como ataque de herbívoros, são percebidos pelo fruto e geram sinais elétricos que podem ser transmitidos para outros órgãos da parte aérea da planta, induzindo respostas à distância como a produção peróxido de hidrogênio. Para dar maior consistência à hipótese da sinalização fruto-parté aérea, estamos conduzindo análises químicas com outras moléculas envolvidas na sinalização e respostas sistêmicas, além de outras ferramentas para a análise do eletroma, como técnicas de classificação por *Machine Learning*, que estão se mostrando muito adequadas para complementar as análises de séries temporais dos sinais elétricos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CUIN, T. A.; DREYER, I.; MICHARD, E. The Role of Potassium Channels in *Arabidopsis thaliana* Long Distance Electrical Signalling: AKT2 Modulates Tissue Excitability While GORK Shapes Action Potentials. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 926, p. 1-17, 2018.
- LEW, T.T.S., KOMAN, V.B., SILMORE, K.S. et al. Real-time detection of wound-induced H₂O₂ signalling waves in plants with optical nanosensors. **Nature Plants**, Londres, 6, 404–415, 2020.
- REISSIG, G. N.; POSSO, D. A.; BORELLA, J.; SILVEIRA, R. D. V.; ROMBALDI, C. V.; BACARIN, M. A. High MT-sHSP23.6 expression and moderate water deficit influence the antioxidant system in 'Micro-Tom' tomato fruit under hypoxia. **Fruits**, v. 75, n. 2, p. 55-70, 2020.
- 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.
- SIMMI, F. Z., DALLAGNOL, L. J., FERREIRA, A. S., PEREIRA, D. R., & SOUZA, G. M. Electrome alterations in a plant-pathogen system: toward early diagnosis. **Bioelectrochemistry**, Volume 133, June 2020.
- TOLEDO, G. R. A., PARISEP, A. G., SIMMI, F. Z., COSTA, A. V. L., SENKO, L. G. S., DEBONO, M. W., & SOUZA, G. M. Plant electrome: the electrical dimension of plant life. Theoretical and Experimental **Plant Physiology**, 31(1), 21–46, 2019
- VELIKOVA, V., YORDANOV, I., EDREVA, A.. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. **Plant Sci.** 151, 59–66. 2000.
- VILELA, M.; MENDES, S. M.; VALICENTE, F. H.; CARVALHO, S. S. S.; SANTOS, A. E.; SANTOS, C. A.; BARBOSA, T. A. N.; CARVALHO, E. A. R.; COSTA, V. H. D. Metodologia para criação e manutenção de *Helicoverpa armigera* em laboratório. **Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo (Circular técnica)** 203, 2014.