



JÚLIA DE CARVALHO COSTA

**MITIGAÇÃO DO ESTRESSE TÉRMICO EM
TOMATEIRO (SOLANUM LYCOPERSICUM L.)
ATRAVÉS DA APLICAÇÃO FOLIAR DE ÁCIDO GAMA-
AMINOBUTÍRICO (GABA)**

Lavras – MG

2023

JÚLIA DE CARVALHO COSTA

**MITIGAÇÃO DO ESTRESSE TÉRMICO EM
TOMATEIRO (SOLANUM LYCOPERSICUM L.)
ATRAVÉS DA APLICAÇÃO FOLIAR DE ÁCIDO GAMA-
AMINOBUTÍRICO (GABA)**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas, para a obtenção do título de Licenciado.

AVALIAÇÃO DA BANCA

Prof.^a Dr.^o. Antonio Chalfun Junior - Presidente da Banca Examinadora – UFLA

Prof.^o Dr.^o João Domingos Rodrigues - Membro da Banca Examinadora – UFLA

MSc. Lillian Magalhães Azevedo – Membro da Banca Examinadora – UFLA

Prof. Dr. Antônio Chalfun Júnior

Orientador

Dr.^a Kellen Kauanne Pimenta de Oliveira

Coorientadora

Dr. Raphael Ricon de Oliveira

Coorientador

Lavras – MG

2023

Dedico este trabalho a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste estudo. Em especial, dedico aos meus queridos familiares, cujo amor, apoio incondicional e crença em meu potencial me guiaram ao longo desta jornada acadêmica. Aos amigos que caminharam ao meu lado, compartilhando conhecimento e encorajamento, a vocês minha sincera gratidão. E, finalmente, aos meus professores e orientadores, que me inspiraram e ajudaram a moldar o meu conhecimento. Este trabalho é fruto do esforço conjunto de todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família, por seu amor incondicional, encorajamento constante e apoio financeiro que tornaram possível a minha jornada acadêmica. Vocês são a minha fonte de inspiração.

Quero expressar minha sincera gratidão ao Professor Antonio Chalfun Junior, Kellen Kauanne Pimenta de Oliveira e Raphael Ricon de Oliveira, pelo apoio, orientação e paciência durante todo este processo de pesquisa. Suas valiosas contribuições foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

À minha valiosa família científica, proporcionada pelo LFMP, meu mais sincero agradecimento. Suas constantes demonstrações de apoio e incentivo ao longo destes anos foram verdadeiramente fundamentais. As inúmeras discussões e a troca de experiências enriqueceram de maneira significativa o meu percurso.

Aos meus amigos, minha mais profunda gratidão. Seu apoio constante, amizade e encorajamento tornaram cada desafio mais fácil de enfrentar. As risadas compartilhadas, as conversas inspiradoras e os momentos inesquecíveis que vivemos juntos são tesouros que valorizarei para sempre.

Agradeço a todos os professores da educação que têm desempenhado um papel fundamental em minha jornada acadêmica. Em especial ao Professor Antônio Fernandes Nascimento Junior, Professora Marina Battistetti Festozo, Professor Breno Pascal de Lacerda Brito e a todos os professores da Escola Estadual Ramiro de Souza Andrade. Cada um de vocês contribuiu de maneira única para o meu crescimento intelectual e pessoal. Sei que a educação é uma das bases fundamentais para o progresso individual e da sociedade e vocês são os arquitetos desse processo.

Agradeço à UFLA, que proporcionou as instalações e recursos necessários para a realização deste trabalho.

Agradeço ao CNPq, CAPES e FAPEMIG, cujas bolsas e auxílios tornaram minha pesquisa uma realidade. Este trabalho é uma prova da capacidade de realização que o apoio de instituições de fomento pode proporcionar aos estudantes e pesquisadores.

Por fim, dedico um agradecimento especial a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho. Vocês desempenharam um papel importante no meu crescimento acadêmico e profissional. Este trabalho é o resultado do esforço coletivo de muitas pessoas, e sou profundamente grata a todos que fizeram parte desta jornada.

RESUMO

As emissões de gases de efeito estufa estão aumentando consideravelmente nas últimas décadas causando aumento da temperatura média global e graves impactos no crescimento e desenvolvimento das plantas. Compreender como as plantas respondem e se adaptam às variações térmicas é fundamental para o melhoramento de cultivares e garantia da produção de alimentos. Estudos recentes mostram que o ácido gama-aminobutírico (GABA), um aminoácido não proteico de quatro carbonos encontrado em eucariotos e procariotos, está envolvido em diversos processos relacionados à regulação da homeostase térmica. Além disso, estudos mostram que as plantas são capazes de perceber estímulos térmicos e adaptar seu metabolismo por meio de vias moleculares que regulam a biossíntese de GABA. Dentro desse contexto, os microRNAs são responsáveis pela regulação pós-transcricional de importantes processos biológicos, tais como desenvolvimento das folhas, flores e frutos, bem como resposta a estresses ambientais. Dessa forma, entender como essa molécula atua na regulação térmica juntamente com vias moleculares relacionadas pode auxiliar no desenvolvimento de ferramentas para mitigação de estresse em plantas. De acordo com os resultados deste trabalho, o ácido gama-aminobutírico (GABA) demonstrou eficácia ao preservar as taxas fotossintéticas, promovendo o aumento da massa radicular para adaptação em ambientes de estresse térmico, e manteve a integridade dos frutos.

Palavras-chave: Estresse abiótico; Temperatura; Fotossíntese.

ABSTRACT

Greenhouse gas emissions have been significantly increasing in recent decades, leading to a rise in global average temperature and severe impacts on plant growth and development. Understanding how plants respond and adapt to thermal variations is crucial for enhancing cultivars and ensuring food production. Recent studies indicate that gamma-aminobutyric acid (GABA), a non-protein amino acid with four carbons found in eukaryotes and prokaryotes, plays a role in various processes related to thermal homeostasis regulation. Moreover, research demonstrates that plants can perceive thermal stimuli and adjust their metabolism through molecular pathways regulating GABA biosynthesis. In this context, microRNAs are responsible for the post-transcriptional regulation of vital biological processes, such as leaf, flower, and fruit development, as well as responses to environmental stress. Understanding how this molecule acts in thermal regulation alongside related molecular pathways can aid in developing tools for mitigating stress in plants. According to the findings of this study, gamma-aminobutyric acid (GABA) has proven effective in preserving photosynthetic rates, promoting increased root mass for adaptation to thermal stress environments, and maintaining the integrity of fruits.

Keywords: Abiotic stress; Temperature; Photosynthesis.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1	Os Efeitos do Estresse Térmico sobre o Desenvolvimento e Crescimento de Plantas.....	3
2.2	O Impacto Direto do Estresse Térmico no Aparelho Fotossintético das Plantas.....	4
2.3	<i>Solanum lycopersicum cv. Micro-Tom</i> como Planta Modelo na Avaliação de Respostas a Estresses.....	5
2.4	O Papel do Ácido Gama-Amino Butírico (GABA) na Tolerância de Plantas a Condições de Estresse Ambiental.....	6
2.4.1	Rota de Biossíntese do GABA (Ácido Gama Amino Butírico).....	7
2.4.2	O papel do GABA em Resposta a Diferentes Estresses Abióticos e Bióticos.....	9
2.5	Genes Atuantes na Biossíntese e Transporte do GABA em Frutos de Tomate.....	12
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1	Delineamento experimental.....	14
3.1.1	Experimento 1: Determinação da concentração e tempo de coleta de material vegetal.....	14
3.1.2	Experimento 2 – Plantas cultivadas em Ambiente Ideal - 25°.....	15
3.1.3	Experimento 3 – Plantas cultivadas sob Estresse Térmico – 35°C.....	16
3.2	Análises fisiológicas – trocas gasosas.....	17
3.3	Fenotipagem.....	18
3.4	Quantificação de GABA.....	18
3.5	Análise In silico.....	19
3.6	Análise estatística.....	19
4	RESULTADO E DISCUSSÕES.....	20
4.1	Concentração ideal de GABA e tempo de coleta.....	19
4.2	Efeito da aplicação exógena de ácido gama-aminobutírico (GABA) no	

crescimento e desenvolvimento das plantas	22
4.3 Impacto do Método Speed Breeding no Desenvolvimento de Plantas De Tomate.....	26
4.4 Avaliações das trocas gasosas.....	31
4.4.1 Impacto da Elevada Temperatura no Aparelho Fotossintético de Plantas Cultivadas a 35°C.....	31
4.4.2 Análises fisiológicas em plantas cultivadas sob condição ideal.....	33
4.5 Quantificação de GABA endógeno.....	35
4.5.1 Quantificação de GABA endógeno em plantas submetidas ao estresse térmico.....	35
4.5.2 Acúmulo de GABA em plantas cultivadas em condições ideais.....	36
4.6 Genes e miRNAs Chaves da Rota de Biossíntese do Ácido Gama-Aminobutírico.....	37
5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

O cenário climático global tem experimentado notáveis transformações, caracterizadas pelo aumento da temperatura média global, flutuações nos padrões de fenômenos meteorológicos como El Niño e La Niña, bem como modificações nos regimes de precipitação e padrões de correntes de vento. De acordo com o Painel Intergovernamental das Mudanças Climáticas (IPCC, 2022), essas mudanças climáticas são atribuídas a fatores como o aumento da concentração de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera e a emissão de Gases de Efeito Estufa (GEE). O relatório mais recente do IPCC revelou um acréscimo de 1,1°C na temperatura do ar da superfície terrestre no período de 2011 a 2020 em comparação com o período de 1850 a 1900, evidenciando uma intensificação das mudanças climáticas nas últimas décadas (IPCC, 2022).

O aumento de temperatura de 5°C ou mais acima do ideal é experimentado como estresse térmico por todos os organismos vivos (Guan et al., 2013). O estresse térmico devido a altas temperaturas ambientais é um problema que ameaça a produção agrícola em todo o mundo (Hall, 2000). Devido a esse fator limitante, danos irreversíveis para o crescimento e desenvolvimento das plantas podem ocorrer, como as reduções do tamanho (Manivannan et al., 2007), número de folhas (Soliman et al., 2018), taxa fotossintética e conteúdo de clorofila (Alhathloul, 2019), além da perda de turgor e pressão nas células (Sharma et al., 2020). Danos ao sistema da planta podem afetar a produtividade de muitas culturas comerciais, como café, feijão, amendoim, arroz, tomate, entre outros (Fahad et al., 2017).

Diante desses desafios, surge a necessidade de estudos com plantas modelo, a fim de entender os mecanismos de respostas a diferentes tipos de estresse. Os estudos com a cultivar de tomateiro Micro-Tom (MT) destacam-se como ferramentas úteis e bastante utilizadas atualmente nesse contexto. Produzida para fins ornamentais através do cruzamento das cultivares Florida Basket e Ohio 4013-3, o Micro-Tom apresenta “dwarf phenotype” (pequeno porte), frutos pequenos e vermelhos quando maduros (Scott e Harbaugh, 1989). Por esta razão, é considerado um modelo conveniente para pesquisa sobre regulação do desenvolvimento, por apresentar rápido crescimento e fácil transformação (Meissner et al., 1997; Eyal e Levy, 2002). Além de conter um genoma conhecido, ciclo de vida curto e ser um ótimo representante para se entender crops com fruto carnoso.

Estudos mostram que a cultura do tomateiro sofre frequentemente com altas

temperaturas em algumas partes do mundo, o que afeta sua reprodução extremamente sensível a estresse por calor (Nankishore e Farrell, 2016). Compreender como as plantas respondem e se adaptam a tal estresse nos níveis fisiológico, molecular e bioquímico irá fornecer subsídios para o melhoramento de cultivares, garantindo a sobrevivência das plantas em condições adversas e a produção de alimentos. (Li et al., 2021).

Essa compreensão torna-se ainda mais crucial considerando estudos recentes que revelam o papel do ácido gama-aminobutírico (GABA), um aminoácido não proteico de quatro carbonos encontrado em eucariotos e procariontos, em diversos processos relacionados à regulação da homeostase térmica. Em plantas, pesquisas com com diferentes espécies mostram que o GABA apresenta um efeito regulatório, como observado no algodão submetido a condições de seca (Hanower e Brzozowska, 1975), células de feijão-frade em temperaturas elevadas (Mayer et al., 1990) e a soja em condições de frio e danos mecânicos (Wallace et al., 1984). A conexão entre esses estudos ressalta a importância de investigar não apenas os impactos do estresse térmico, mas também as estratégias adaptativas, como a influência do GABA, que podem ser fundamentais para o desenvolvimento de abordagens mais eficazes no manejo do cultivo de tomateiro em condições desafiadoras.

O GABA foi identificado pela primeira vez, há mais de 70 anos, em tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) (Li et al., 2021). Desde então, seu papel fisiológico tem sido amplamente estudado, e até o momento, tem sido confirmado não apenas como metabólito, mas também como molécula sinalizadora em plantas (Carillo, 2018). Sua versatilidade funcional inclui responder a fatores de estresse abióticos e bióticos, manter o equilíbrio carbono/nitrogênio (C/N) e regular o desenvolvimento das plantas (Li et al., 2021). Dessa forma, entender como essa molécula atua na regulação térmica utilizando uma planta modelo como o tomateiro MT, pode auxiliar no desenvolvimento de ferramentas para mitigar os efeitos desse estresse em outras espécies de interesse agrônomico, tais como o cafeeiro.

Além disso, outras moléculas são conhecidas por desempenhar importante ação regulatória pós-transcricional em organismos eucarióticos, destacando-se os microRNAs (miRNAs) (Voinnet, 2009). Essas pequenas moléculas, de 20 a 24 nucleotídeos pertencentes à classe de pequenos RNAs (sRNAs), são reconhecidas por sua relevância em processos biológicos fundamentais, como o desenvolvimento de folhas, flores e frutos, além de desempenharem um papel crucial na resposta ao estresse biótico e abiótico em várias espécies (Ketao et al., 2018; Li et al., 2017; Lopez et al., 2012; Ori et al., 2007; Pan

et al., 2017).

Os MicroRNAs são moléculas que exibem comportamento conservado na questão evolutiva (Molnár et al., 2007), alguns miRNAs como, por exemplo, miR156, miR164, miR168, miR171, miR393, miR396 e miR398 estão associados a uma ampla gama de respostas de defesa das plantas a estresses, incluindo estresses hídrico, salino e térmico. No entanto, com base na tecnologia de sequenciamento de alto rendimento, foram identificados muitos microRNAs conservados e novos que respondem ao estresse térmico em tomateiro (Pan et al., 2017). No entanto, ainda existem lacunas sobre o papel desses sRNAs na regulação de moléculas envolvidas nos mecanismos de resposta ao estresse, como o GABA.

Com base no apresentado, o objetivo deste trabalho é investigar o papel do GABA como potencial mitigador dos efeitos do aumento de temperatura, utilizando inicialmente o tomateiro MT, e identificar quais microRNAs e como eles podem atuar na regulação dessa molécula de forma endógena. Assim, este estudo contribuirá para o entendimento do estresse térmico nas plantas e desenvolvimento de novos produtos que podem ser aplicados em campo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Os efeitos do estresse térmico sobre o desenvolvimento e crescimento de plantas

A temperatura constitui um dos fatores ambientais de maior relevância para as plantas, impondo perdas significativas em termos econômicos, pois ela afeta negativamente o crescimento e desenvolvimento das plantas, podendo causar retardamento da floração e amadurecimento dos frutos e até mesmo necrose dos tecidos (Ahn et al., 1999).

Segundo Cao et al., (2008) todas as espécies de plantas têm uma faixa de temperatura ideal para funções fisiológicas eficientes, como crescimento, desenvolvimento e reprodução. Temperaturas elevadas acima dessa faixa, caracterizadas como estresse térmico, têm o potencial de impactar o desempenho das culturas em todas as fases do seu ciclo, é a fase reprodutiva a mais sensível a esses efeitos (Cao et al., 2008, Tenorio et al., 2013).

É importante destacar que a previsão de aumento na temperatura atmosférica, estimado entre 1,5 e 11°C até o ano de 2100 (IPCC, 2022), tem o potencial de causar impactos severos na produtividade das culturas (Reddy e Kakani, 2007; Stainforth et al.,

2005). Diante desse cenário de mudanças climáticas, a compreensão dos efeitos do estresse térmico nas diferentes fases do ciclo das plantas torna-se crucial para o desenvolvimento de estratégias de mitigação que garantam a sustentabilidade da agricultura diante desses desafios.

O arroz (*Oryza sativa L.*), um cereal fundamental que representa a principal fonte de alimento para quase metade da população global, é uma das plantas suscetíveis aos efeitos da alta temperatura (Zhao Et al., 2018). O impacto do estresse térmico no desempenho da planta está condicionado, principalmente, à intensidade, à duração e ao momento em relação ao desenvolvimento da planta em que ocorre o estresse, mas é notadamente mais danoso durante os estágios reprodutivos e de enchimento de grãos (Cao et al., 2008; Tenorio et al., 2013).

O feijão mungo (*Vigna radiata L.*), uma leguminosa alimentar de verão que se destaca por sua riqueza em proteínas, vitaminas e minerais (HanumanthaRao et al., 2016), demonstra um ótimo crescimento a uma temperatura ideal de aproximadamente 35 °C durante o dia e 25 °C durante a noite. No entanto, frequentemente se depara com condições de estresse térmico, caracterizadas por temperaturas que excedem 36 °C durante o dia e 28 °C durante a noite, especialmente durante sua fase reprodutiva (Kaur et al., 2015). Esse cenário resulta em consequências adversas, incluindo uma notável perda de flores, uma deficiente formação de vagens e uma redução significativa no tamanho, número e produção de sementes, afetando drasticamente o rendimento final de sementes.

Portanto, é fundamental a realização de uma investigação extensa acerca do comportamento das plantas em cenários de ambientes extremos, como o aumento da temperatura (Karapanos et al., 2010).

2.2 O impacto direto do estresse térmico no aparelho fotossintético das plantas.

A fotossíntese é o alicerce do crescimento e da produção vegetal, dessa forma, otimizar a eficiência fotossintética pode desempenhar um papel crucial na promoção da segurança alimentar nas próximas décadas (Ullah et al., 2022).

O cloroplasto desempenha um papel central nos processos metabólicos relacionados à fotossíntese, assumindo um papel crítico na detecção e resposta ao estresse térmico, utilizando sinalização retrógrada como um meio de orquestrar respostas adaptativas apropriadas (Chen et al., 2017; Hu et al., 2020; Pollastri et al., 2021a).

Componentes vitais dos processos fotossintéticos, tais como a fotofosforilação, o metabolismo do ciclo de Calvin, o transporte de elétrons, as reações fotoquímicas e a fluidez da membrana tilacoidal, são sensíveis ao estresse térmico (Crafts-Brandner e Salvucci, 2000, 2002; Wang et al., 2018; Cai et al., 2020; Chen et al., 2022; Lakshmi et al., 2022; Viljevac et al., 2022).

O dano provocado pelo estresse térmico nos cloroplastos resulta na inativação da rubisco ativase (RCA) (Scafaro et al., 2016) e na regulação negativa de componentes críticos do cloroplasto (Wang et al., 2017, 2018), levando a uma redução da eficiência fotossintética (Fatma et al., 2021; Mustafa et al., 2021), desequilíbrio redox (Mustafa et al., 2021) e, em situações graves, pode culminar em morte celular (Distefano et al., 2017).

Condições térmicas adversas também geram uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) e desencadeia respostas associadas ao estresse oxidativo (Xu et al., 2017). Isso resulta na redução da taxa de transporte de elétrons, inativação do fotossistema II (PSII) e do fotossistema I (PSI), bem como na degradação de proteínas e pigmentos. Esses efeitos, em última instância, contribuem para a diminuição da produção agrícola (Iqbal et al., 2021). A redução da eficiência fotossintética das folhas em condições de estresse térmico ocasiona um aumento na demanda por carboidratos, o que, conseqüentemente, intensifica a taxa de respiração escura e de fotorrespiração (Kumar et al., 2012).

Essa interação complexa entre o estresse térmico e os processos fotossintéticos destaca a necessidade de compreender até que ponto a eficiência fotossintética se recupera após esse desafio. Este aspecto, raramente considerado, poderia fornecer uma compreensão mais completa da tolerância térmica das plantas (Yordanov et al., 2000). Além disso, compreender os mecanismos de resistência das plantas em condições de estresse pode fornecer subsídios para o melhoramento de plantas cultivadas, visando manter a segurança alimentar da população mundial.

2.3 *Solanum lycopersicum* cv. *Micro-Tom* como Planta Modelo na Avaliação de Respostas a Estresses

O tomateiro *Solanum lycopersicum* representa uma das culturas hortícolas mais significativas globalmente e tem sido adotado como um sistema modelo dentro da família Solanaceae para investigações nas esferas da genética, tanto clássica quanto molecular (Knapp, 2002). A bem-sucedida conclusão do Projeto Genoma do Tomateiro (Sato et al., 2012) desencadeou o desenvolvimento de variedades que exibem um desempenho

superior em termos de produção e qualidades nutricionais, seja através de métodos tradicionais de melhoramento ou abordagens moleculares avançadas, incluindo transformação genética.

Paralelamente a essas conquistas, de maneira análoga à planta modelo *Arabidopsis thaliana*, a variedade Micro-Tom (cv MT) emergiu como um organismo vegetal de estudo altamente viável em ambientes de laboratório compactos. Desde a sua proposição como um organismo modelo, a cv MT tem sido amplamente explorada para pesquisas nas áreas de genética e fisiologia (David-Schwartz et al., 2001; Li et al., 2004; Tieman et al., 2001; Isaaccson et al., 2002; Vogg et al., 2004; Wang et al., 2005).

O Micro-Tom é capaz de produzir frutos e sementes em recipientes contendo menos de 50 mL de substrato, com um ciclo de crescimento que oscila entre 80 a 90 dias (Peres et al., 2001). Além disso, possui um genoma de tamanho reduzido (350 mbp) (Meissner et al., 2000; Matsukura et al., 2008; Pino et al., 2010). Portanto, a utilização da cultivar Micro-Tom como organismo modelo se torna uma ferramenta de grande relevância para a validação de novos genes.

Em tomateiros submetidos a condições de estresse térmico, observam-se alterações significativas no desenvolvimento fisiológico e bioquímico. O calor é um elemento desencadeador de uma sensibilidade marcante nas plantas de tomate, podendo resultar na abscisão prematura das flores (Camejo et al., 2005), com consequente impacto limitante na produção de frutos (Driedonks, 2018). Além disso, o aumento da temperatura exerce um efeito particularmente adverso sobre o grão de pólen, especialmente durante suas fases iniciais, resultando em uma germinação insatisfatória e prejudicando o desenvolvimento do tubo polínico (Raja et al., 2019).

2.4 O papel do ácido gama-amino butírico (GABA) na resistência de plantas a condições de estresse ambiental

Conforme destacado por Nayyar et al., (2014), uma estratégia eficaz e simples para aumentar a resistência ao calor em espécies de plantas sensíveis a altas temperaturas, envolve a aplicação de biomoléculas com funções protetoras em plantas submetidas a condições de estresse. Os aminoácidos desempenham um papel de grande relevância nas operações das plantas, principalmente quando estas enfrentam situações estressantes, devido à sua importância na regulação osmótica, na proteção contra danos oxidativos e na função como moléculas de sinalização (Nayyar et al., 2014; Priya et al., 2019).

Dentre essas moléculas, destaca-se o Ácido Gama Amino Butírico (GABA), um

aminoácido não proteico, que teve sua primeira identificação em tubérculos de batata relatada por Thompson e colaboradores em 1953. O GABA opera como uma molécula sinalizadora endógena crucial nos processos de crescimento e desenvolvimento de plantas, acumulando-se de forma significativa nos tecidos vegetais em resposta a diversos tipos de estresses, sejam eles de origem abiótica ou biótica (Roberts, 2007).

Muitas pesquisas evidenciaram a participação do GABA na promoção da resistência a diversos estresses de natureza abiótica, tais como variações de temperatura, escassez de água, salinidade, condições de baixa luminosidade e deficiência de nitrogênio (Nayyar et al., 2014; Priya et al., 2019; Cheng et al., 2018, Kinnersley e Lin 2000). Além disso, sua influência se estende à promoção do crescimento vegetal e ao alívio do estresse, atuando através da regulação positiva do sistema de defesa antioxidante. Isso, por sua vez, resulta no prolongamento da vida útil das plantas, devido ao aumento da atividade antioxidante, bem como na melhoria da qualidade das colheitas durante o período de armazenamento (Ramos-Ruiz et al., 2019).

2.4.1 Rota de Biossíntese do GABA

Em plantas, o GABA é predominantemente metabolizado através de uma via denominada "GABA shunt", a qual se conecta com várias outras rotas metabólicas, incluindo o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) (Bouché e Fromm, 2004; Shelp et al., 2017) (figura 1). No citosol, o GABA é produzido irreversivelmente a partir de L-glutamato pela ação da enzima glutamato descarboxilase (GAD), a qual é dependente de H^+ , ou, alternativamente, por meio da degradação de poliaminas (putrescina e espermidina) ou até mesmo por uma reação não enzimática a partir da prolina em situações de estresse oxidativo (Shelp et al., 2012; Signorelli et al., 2015; Yang et al., 2015).

Diversas cópias de *GAD*, expressas de maneira diferencial em relação aos tipos de órgãos, estágios de crescimento e condições ambientais, foram identificadas em várias espécies de plantas (Bouché and Fromm, 2004; Ruiz et al., 2019). É importante mencionar que a *GAD* geralmente apresenta um domínio de ligação ao cálcio-calmodulina (Ca^{2+}/CaM) na extremidade C-terminal, o qual modula a sua atividade na presença de Ca^{2+} em um ambiente de pH ácido (Snedden et al., 1996; Gut et al., 2009). Sob condições fisiológicas normais da célula (pH 7.0), o CaMBD inibe a atividade da GAD, ao bloquear o seu sítio ativo. Contudo, em situações de resposta ao estresse, caracterizadas pelo aumento nos níveis de íons de Ca^{+2} citosólico e H^+ , ocorre o desdobraimento e a ligação

com o CaMBD, liberando o sítio ativo da GAD e estimulando a sua atividade (Snedden et al., 1995).

A via do GABA e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) estão conectados por meio de uma proteína transmembrana, a GABA permease (GABA-P), que possibilita o fluxo do GABA do citosol para as mitocôndrias (Michaeli et al., 2011). Em seguida, o GABA é catabolizado em semialdeído succínico (SSA) pela ação da enzima transaminase GABA-T. Dependendo da afinidade pelo substrato, duas enzimas GABA-T podem catalisar essa reação: a GABA-TK, que é dependente do alfa-cetoglutarato, ou a GABA-TP, que é dependente do piruvato. A GABA-TK recebe um grupo amino do alfa-cetoglutarato e gera o SSA e o glutamato como produtos, enquanto a GABA-TP requer o piruvato ou o glicolato, que são convertidos em alanina ou glicina (Shimajiri et al., 2013; Trobacher et al., 2013). É importante ressaltar que a última enzima é encontrada exclusivamente em plantas, normalmente apresentando uma atividade mais elevada em comparação à GABA-TK, utilizada principalmente por outros organismos (Narayan e Nair, 1990; Van et al., 2002; Bartyzel et al., 2003).

Por fim, o SSA é catabolizado em succinato, que é um componente do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), e, durante esse processo, NADH e um íon hidrogênio são gerados a partir do NAD^+ pela enzima succinato semialdeído desidrogenase (SSADH) (Bouché et al., 2003). O succinato e o NADH atuam como doadores de elétrons na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, que tem como resultado final a produção de ATP (Ruiz et al., 2019). A enzima succinato semialdeído redutase (SSR) possui isoformas que se distribuem tanto no citosol quanto no cloroplasto. A conversão do succinato semialdeído (SSA) para ácido gama-hidroxi-butírico (GHB) ocorre de maneira específica à isoforma de SSR presente na célula. Em resposta ao estresse, essa conversão é catalisada pela ação da SSR, podendo ocorrer tanto no citosol quanto no cloroplasto (Simpson et al., 2008; Hildebrandt et al., 2015). Quando a relação $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ é reduzida, a rota do succinato semialdeído desidrogenase (SSADH) é inibida, devido à sua dependência do equilíbrio energético mitocondrial. Isso resulta no acúmulo de SSA, uma vez que a GABA-T é subsequentemente inibida (Van e Shelp, 1999; Podlešáková et al., 2019). Essa regulação representa um mecanismo pelo qual a célula ajusta seu metabolismo em resposta às condições redox e de energia.

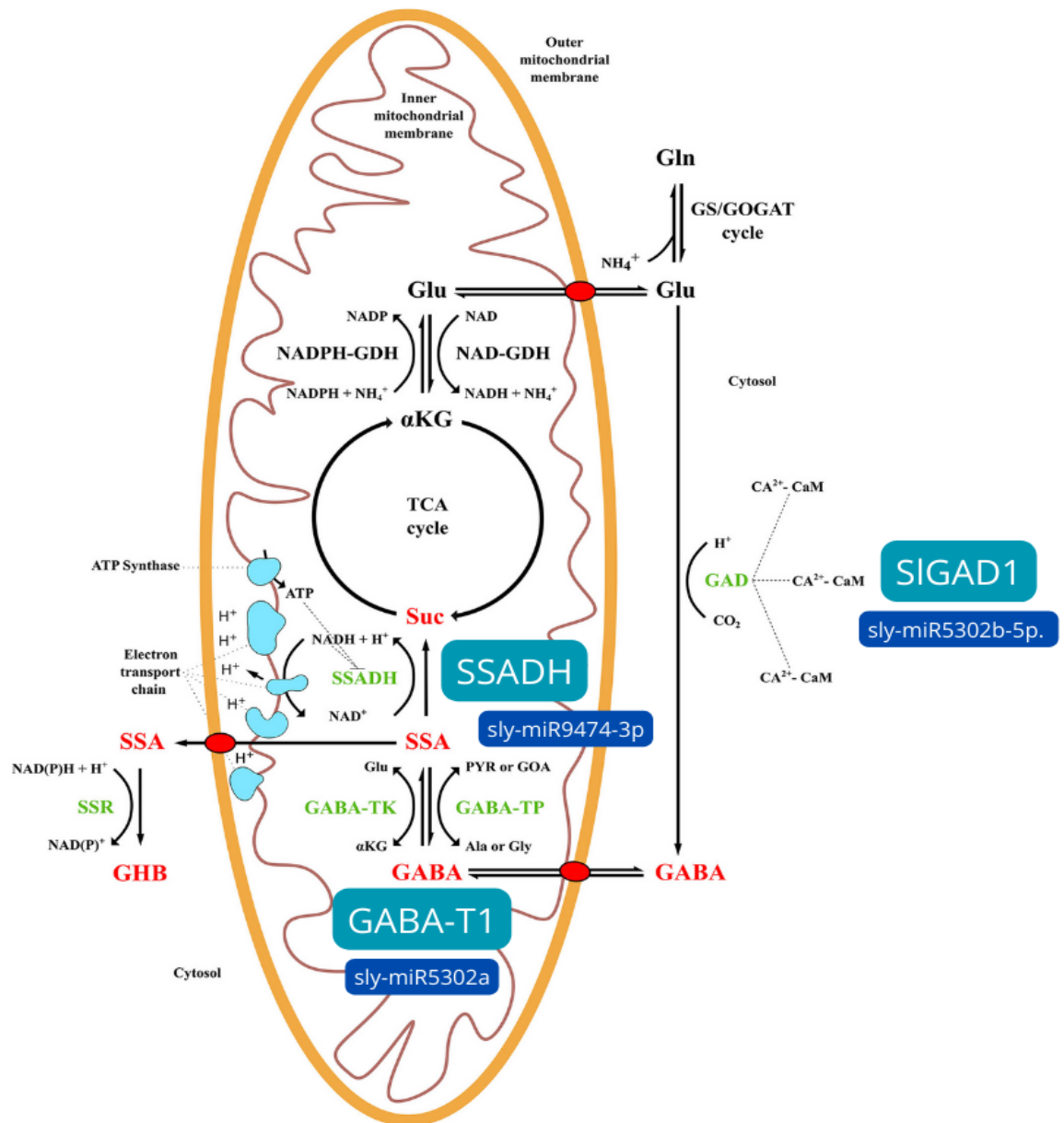


Figura 1: Metabolismo derivado do ácido g-aminobutírico (GABA) e vias relacionadas em espécies vegetais. TCA, ciclo do ácido tricarboxílico; GS/GOGAT, ciclo glutamina-sintetase/glutamato-sintase; GAD, glutamato descarboxilase; GABA-TK, GABA transaminase dependente de α -cetoglutarato; GABA-TP, GABA transaminase dependente de piruvato; SSADH, semialdeído succínico desidrogenase; SSR, semialdeído succínico redutase; GDH, glutamato desidrogenase; SSA, semialdeído succínico; Suc, succinato; GHB, ácido g-hidroxi-butírico; α KG, α -cetoglutarato; Glu, glutamato; Ala, alanina; Gly, glicina, PYR, piruvato, GOA, ácido glioxílico. Em azul: genes que regulam a biossíntese de GABA e possíveis miRNAs envolvidos no processo. Fonte: Gramazio P, Takayama M e Ezura H (2020) com pequenas modificações.

2.4.2 O papel do GABA em Resposta a Diferentes Estresses Abióticos

O estresse abiótico promove o acúmulo de GABA por meio de dois mecanismos distintos. Este tipo de estresse desencadeia alterações metabólicas e mecânicas que resultam em acidificação do citosol, o que, por sua vez, induz a ativação da glutamato descarboxilase de pH ácido e a subsequente síntese de GABA. Um estudo realizado por Mei et al., (2016) observou uma significativa redução no pH citosólico em condições de solo encharcado, associado à hipóxia, o que, por conseguinte, resultou em um aumento na acumulação de GABA. O segundo mecanismo envolve a síntese de GABA dependente de cálcio, que é desencadeada em resposta a vários tipos de estresses abióticos, tais como calor, frio, salinidade, seca e variações ambientais ligeiras. Esses estresses provocam um rápido aumento nos níveis de cálcio intracelular, e esse aumento de cálcio citosólico estimula a atividade da glutamato descarboxilase, que é dependente de calmodulina, culminando na síntese de GABA (Bhattacharya et al., 2018).

O GABA demonstrou ter um papel significativo na proteção e aclimatação das plantas a diferentes tipos de estresse ambiental, incluindo o estresse térmico (por calor e frio), hídrico, salino e por metais pesados. Os estudos disponíveis destacam seu potencial para melhorar a resistência e a produtividade das culturas, embora haja a necessidade de pesquisas adicionais, especialmente em leguminosas, para entender melhor os mecanismos subjacentes e otimizar sua aplicação.

Estresse Térmico

A acumulação de GABA durante o estresse térmico é desencadeada pela ativação das enzimas glutamato descarboxilase, como evidenciado em *Arabidopsis* (Locy et al., 2000; Priya et al., 2019). A aplicação exógena de GABA em plantas sob estresse térmico demonstrou melhorar significativamente o crescimento, a sobrevivência e reduzir os danos celulares, preservando a viabilidade, a clorofila e a eficiência fotoquímica das folhas (Nayyar et al., 2014). Isso resultou na melhoria das atividades de enzimas antioxidantes, como CAT, SOD, APX e glutatona redutase nas folhas de arroz, após exposição ao estresse térmico de curto prazo (Nayyar et al., 2014).

A aplicação de GABA também aprimorou vários parâmetros fisiológicos, morfológicos e bioquímicos em plantas de leguminosas submetidas a altas temperaturas (Ali et al., 2019). Estudos demonstraram que a suplementação com GABA tem benefícios nas funções reprodutivas, como a germinação do pólen, viabilidade do estigma, viabilidade dos óvulos, redução de danos na membrana e melhoria na maquinaria

fotossintética, assimilação de carbono e acumulação de osmólitos (Priya et al., 2019).

Estresse Hídrico

O estresse hídrico é prejudicial ao crescimento e desenvolvimento de muitas espécies vegetais (Sehgal et al., 2018). Pesquisas indicam que a aplicação exógena de GABA é uma estratégia eficaz para melhorar a resistência das plantas a esse tipo de estresse (Yong et al., 2017). A suplementação com GABA reduz os danos causados pela seca, promovendo maior tolerância, manutenção da água nas folhas, menor peroxidação lipídica das folhas (Vijayakumari e Puthur 2016). Além disso, a aplicação de GABA aumenta a resistência à seca em várias espécies vegetais, estimulando a acumulação de aminoácidos, ácidos orgânicos e outras substâncias osmóticas relacionadas ao metabolismo secundário (Li et al., 2016a). Estudos mostraram que a aplicação de GABA induz mudanças nas atividades de enzimas relacionadas ao metabolismo do GABA, como a transaminase GABA e a alfa-cetoglutarato desidrogenase, resultando em um aumento na concentração de glutamato (Glu) e GABA em plantas sob estresse hídrico (Yong et al., 2017).

Estresse pelo Frio

O estresse causado por baixas temperaturas prejudica o crescimento e o desenvolvimento das plantas. A aplicação de GABA foi relatada como uma forma eficaz de atenuar os danos causados por esse tipo de estresse, melhorando as atividades de enzimas antioxidantes, aumentando a carga de energia nas plantas e inibindo a peroxidação lipídica (Yang et al., 2011). Estudos realizados por Malekzadeh e colaboradores (2014) demonstraram que plântulas de tomateiro tratadas com GABA exógeno tiveram efeitos benéficos na redução do estresse por frio, tendo um aumento da atividade de enzimas antioxidantes, aumento de osmólitos como prolina e teor de açúcares solúveis, e perda de integridade da membrana.

Estresse Salino

A salinidade do solo, causada principalmente por NaCl, é um problema significativo que afeta a produtividade agrícola. A aplicação de GABA reduz a acumulação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e aumenta a atividade de enzimas antioxidantes, preservando a morfologia celular e a função celular sob estresse salino (Wang et al., 2017). Pesquisas com feijão-preto revelaram que a aplicação de GABA

aumenta a altura, o peso seco e o número de vagens por planta, resultando em uma produção de sementes significativamente maior em comparação com plantas sob estresse salino (Kumar et al., 2017).

Estresse por Metais Pesados

A contaminação do solo por metais pesados é uma preocupação ambiental crescente. Apesar de alguns elementos metálicos serem micronutrientes essenciais, desempenhando papéis fundamentais no crescimento e metabolismo das plantas (Mani e Sankaranarayanan, 2018), o acúmulo excessivo desses metais nas estruturas vegetais compromete, direta ou indiretamente, diversas funções bioquímicas, fisiológicas e morfológicas.

Song et al. (2010) descreveram que a aplicação de GABA atenua o dano oxidativo causado pela toxicidade de H_2 e alumínio em plântulas de cevada. Isso ocorre pela ativação de enzimas antioxidantes como uma resposta defensiva, resultando na redução dos níveis elevados de proteínas carboniladas causadas por EROs.

Embora não haja relatos sobre o uso de GABA para mitigar os efeitos do estresse por metais em leguminosas, estudos realizados em outras culturas indicam o papel do GABA na mitigação dos impactos adversos causado por metais. Por exemplo, pesquisas abordam a capacidade do GABA em reduzir a toxicidade de cádmio no milho (Seifikalhor et al., 2020), a toxicidade de cromo na brassica (Mahmud et al., 2017) e a toxicidade de arsênico no arroz (Kumar et al., 2019).

Em síntese, o GABA mostra potencial promissor como ferramenta versátil nas respostas das plantas a estresses abióticos. As pesquisas destacam seu impacto na promoção da tolerância e produtividade das plantas nesses cenários. Contudo, a necessidade de pesquisas, especialmente em leguminosas, é ressaltada para aprofundar a compreensão dos mecanismos envolvidos e otimizar sua aplicação em diferentes contextos, visando contribuir para estratégias sustentáveis diante dos desafios ambientais.

2.5 Genes Atuantes na Biossíntese e Transporte do GABA em Frutos de Tomate

Na versão mais atualizada do genoma de referência do tomate (Heinz 1706, versão SL 4.0, Hosmani et al., 2019), foram identificados cinco genes *GAD* (*Solyc11g011920*, *Solyc04g025530*, *Solyc05g054050*, *Solyc01g005000* e *Solyc03g098240*). O primeiro destes genes *GAD*, conhecido como *ERT D1*

(*Solyc03g098240*), foi previamente previsto em 1995 a partir da análise da biblioteca de cDNA de frutos de tomate da variedade "Ailsa Craig". Esse gene atingiu seu pico de expressão no estágio de rompimento do fruto, seguido por uma gradual diminuição durante o processo de amadurecimento (Gallego et al., 1995).

Posteriormente, em frutos imaturos da variedade "MicroTom", três genes *GAD* foram caracterizados durante o desenvolvimento do fruto: *SIGAD1* (*Solyc03g098240*, considerado alélico a *ERTD1*), cuja expressão alcança seu ponto máximo nos estágios de fruto maduro, enquanto *SIGAD2* (*Solyc11g011920*) e *SIGAD3* (*Solyc01g005000*) apresentam um aumento em seus níveis de expressão durante o desenvolvimento do fruto, seguido por uma rápida diminuição durante o amadurecimento (Akihiro et al., 2008). No entanto, enquanto *SIGAD1* não mostrou uma correlação clara com o teor de GABA durante o amadurecimento do fruto, *SIGAD2* e *SIGAD3* demonstraram uma correlação positiva, sugerindo um papel mais proeminente deste último na biossíntese de GABA. Esta hipótese foi confirmada por Takayama et al., (2015) ao suprimirem os três genes *SIGAD* através da abordagem RNAi, resultando em uma significativa redução nos níveis de GABA nas linhagens onde *SIGAD2* e *SIGAD3* foram suprimidos, enquanto os níveis de GABA nas linhagens com supressão de *SIGAD1* se assemelhavam aos do tipo selvagem (WT).

No caso do tomate, três genes *GABA-TP* foram sugeridos para o GABA em SSA: *SIGABA-T1* (*Solyc07g043310*), localizado nas mitocôndrias, *SIGABA-T2* (*Solyc12g006470*), presente no citosol, e *SIGABA-T3* (*Solyc12g006450*), encontrado nos plastos (Akihiro et al., 2008; Clark et al., 2009). Através de análises de perda de função utilizando RNAi, Koike et al., (2013) suprimiram os três genes *SIGABA-T*, observando um aumento de até nove vezes nos níveis de GABA em frutos vermelhos maduros das linhagens em que *SIGABA-T1* foi suprimido. No entanto, nenhuma correlação significativa foi observada entre o teor de GABA e a expressão de *SIGABA-T2* e *SIGABA-T3*. Com base nesses resultados, e considerando que *SIGABA-T1* é expresso em níveis mais elevados do que *SIGABA-T2* e *SIGABA-T3* durante o amadurecimento do fruto (Clark et al., 2009), sugere-se que *SIGABA-T1* desempenha o papel principal na via de catabolismo do GABA. Essas descobertas foram posteriormente corroboradas por Li et al., (2018) por meio do uso de um sistema CRISPR/Cas9 multiplex direcionado aos três genes *SIGABA-T*.

As etapas finais do desvio metabólico do GABA no tomate ainda necessitam de uma caracterização abrangente. Até o momento, foi identificado um gene *SSADH*

(*SISSADH*, provavelmente *Solyc09g090700*) como o responsável pelo catabolismo do SSA em succinato. Este gene demonstrou estar expresso nos frutos em todos os estágios de desenvolvimento, embora sua expressão tenha apresentado uma correlação fraca com o teor de GABA (Akihiro et al., 2008). Por outro lado, foram isolados dois genes *SSR* no tomate (*SISSR1* e *SISSR2*, provavelmente *Solyc09g018790* e *Solyc03g121720*) (Akihiro et al., 2008). A expressão de *SISSR1* foi ligeiramente mais elevada em frutos vermelhos maduros do que em frutos no estágio de rompimento, enquanto *SISSR2* apresentou o padrão oposto de expressão (Deewatthanawong et al., 2010a). Estudos adicionais são necessários para uma caracterização completa das duas rotas alternativas de catabolismo do SSA na via do GABA no tomate e para entender como essas rotas se relacionam com a biossíntese de GABA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

3.1.1 Experimento 1: Determinação da concentração e tempo de coleta de material vegetal

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas no Setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. Sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) foram germinadas em câmara de crescimento (CMP6050 – Conviron®) a 25°C com fotoperíodo 16/8 h (claro/escuro). Folhas completamente expandidas (vinte e dois dias de idade) foram expostas a três tratamentos diferentes: aplicação exógena de GABA a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, aplicação de 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$, as concentrações foram realizadas com a diluição do GABA puro em água destilada de acordo com experimentos prévios descritos por (Malekzadeh et al., 2014) e água (controle). Foram aplicados 5 mL por planta com auxílio de um borrifador.

Cada tratamento foi exposto a uma rampa de temperatura, na qual houve um aumento a cada quatro dias. As temperaturas foram: ótima (25°C), estresse térmico moderado (35°C) e estresse térmico elevado (40°C) (figura 1). Cada tratamento foi composto por quatro réplicas biológicas, fatorial 3x3 (3 tratamentos de aplicação e 3 temperaturas) totalizando 36 plantas em todo experimento. As plantas foram irrigadas mantendo a capacidade de campo. Ao final de cada ciclo de temperatura, folhas totalmente expandidas foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas

em ultrafreezer -80 °C.

Adicionalmente, a fim de traçar uma curva e identificar o momento de maior concentração de GABA nas plantas, foram coletadas amostras em temperatura ótima (25°C), com intervalos de 2, 6, 12, 24 e 72 horas após a aplicação do produto.

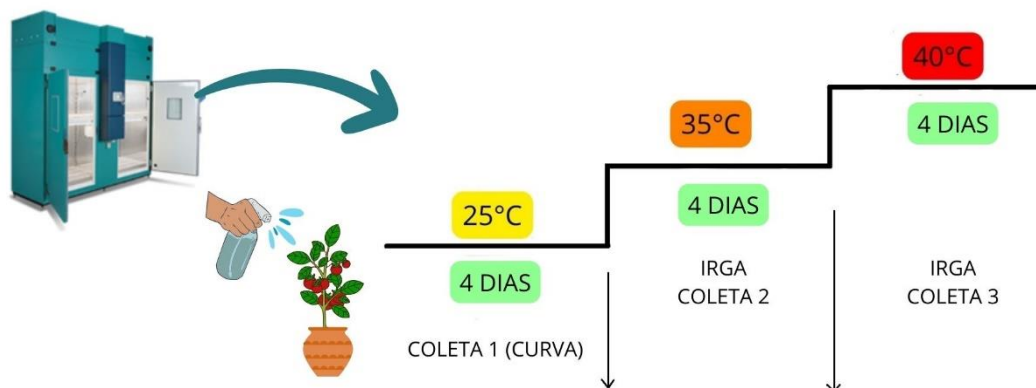


Figura 1: Esquema demonstrativo dos tratamentos térmicos aplicados ao longo do experimento 1 em câmara de crescimento, em tomateiro Micro-Tom, evidenciando as variações ao longo do tempo.

3.1.2 Experimento 2 – Plantas cultivadas em Ambiente Ideal – 25 °C

Sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) foram cultivadas sob condições controladas em uma sala de crescimento, mantida a uma temperatura de 25 °C com fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro). Mudas com folhas completamente expandidas (vinte e oito dias de idade) foram expostas a dois tratamentos diferentes, um grupo recebeu a aplicação exógena de GABA a uma concentração de 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto o outro grupo, utilizado como controle, recebeu a aplicação de água. Sete dias após o primeiro tratamento, uma segunda aplicação de GABA foi realizada em plantas com 35 dias de idade.

Folhas totalmente expandidas foram coletadas 2 e 12 horas após a primeira e a segunda aplicação, congeladas em N_2 líquido e armazenadas em ultrafreezer -80 °C. As análises de trocas gasosas foram realizadas 24 horas após as duas aplicações, com 28 e 35 dias de idade da planta. Cada tratamento foi composto por quatro réplicas biológicas, fatorial 2x2x2 (tabela 1) totalizando 32 plantas. As plantas foram irrigadas mantendo a capacidade de campo.

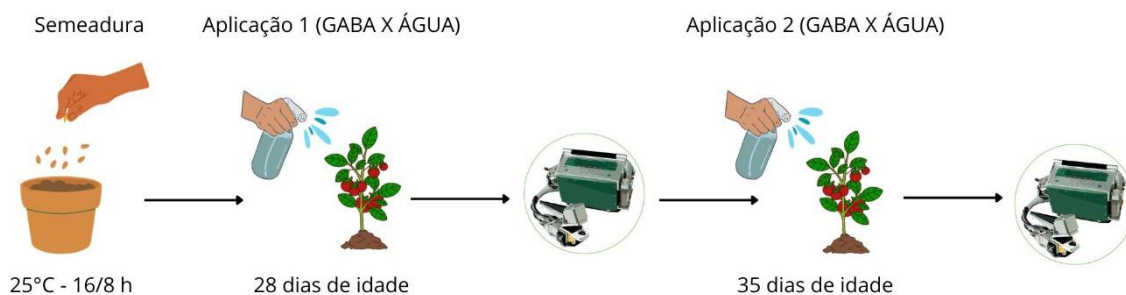


Figura 2: Esquema demonstrativo dos tratamentos utilizados ao longo do tempo, em condições favoráveis na câmara de crescimento, em tomateiro cv. Micro-tom durante o experimento 2.

3.1.3 Experimento 3 – Plantas cultivadas em Estresse Térmico – 35 °C

Sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) foram cultivadas em condições controladas na sala de crescimento, a uma temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 16/8h (claro/escuro). Mudas com folhas completamente desenvolvidas (vinte e oito dias de idade) foram expostas a dois tratamentos diferentes, um com a aplicação exógena de GABA a 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e outro com aplicação de água (controle).

Imediatamente, as plantas foram expostas ao estresse térmico elevado de 35°C, em um fotoperíodo de 22h de luz, reduzindo o tempo que a planta permanece no escuro. Essa abordagem foi aplicada com o propósito de examinar o impacto do fotoperíodo nas plantas de *Solanum lycopersicum* e investigar a teoria da transição precoce para a fase reprodutiva, conhecida como "Speed Breeding".

Após o período de 7 dias, visando compreender as respostas das plantas em um estágio avançado no estresse térmico, aquelas expostas a 35°C foram submetidas novamente ao tratamento com GABA. Cada tratamento foi composto por quatro réplicas biológicas, fatorial 2x2x2 (tabela 1) totalizando 32 plantas. As plantas foram irrigadas mantendo a capacidade de campo. Folhas totalmente expandidas foram coletadas 2 e 12 horas após a primeira e a segunda aplicação, congeladas em N₂ líquido e armazenadas em ultrafreezer -80 °C.

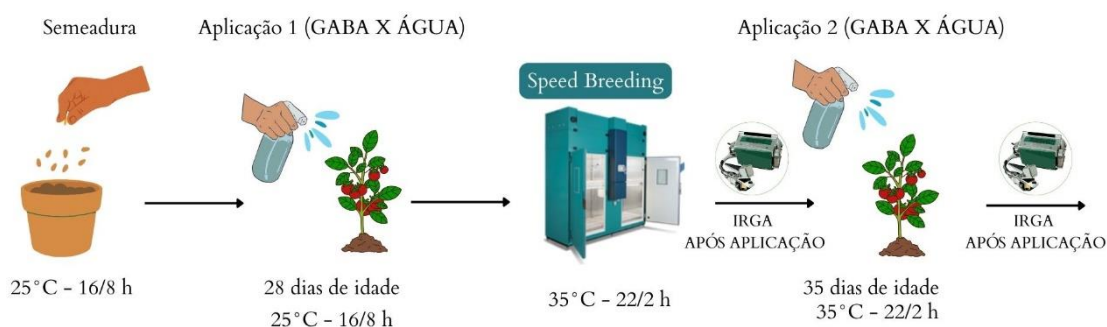


Figura 3: Esquema demonstrativo dos tratamentos aplicados ao longo do tempo em câmara de crescimento, utilizando tomateiro cv. Micro-Tom durante o experimento 3.

Temperatura ideal - 25°C		Temperatura de estresse - 35°C	
APLICAÇÃO 1	APLICAÇÃO 2	APLICAÇÃO 1	APLICAÇÃO 2
GABA 2 horas	GABA 2 horas	GABA 2 horas	GABA 2 horas
GABA 12 horas	GABA 12 horas	GABA 12 horas	GABA 12 horas
CONTROLE 2 horas	CONTROLE 2 horas	CONTROLE 2 horas	CONTROLE 2 horas
CONTROLE 12 horas	CONTROLE 12 horas	CONTROLE 12 horas	CONTROLE 12 horas

Tabela 1: Arranjo dos tratamentos em um fatorial 2x2x2, envolvendo 2 aplicações, 2 tratamentos, 2 tempos e 4 réplicas biológicas.

3.2 Fenotipagem

As avaliações fenotípicas foram conduzidas semanalmente após a completa expansão das folhas, visando quantificar o número de folhas, botões florais, flores, estágio inicial do desenvolvimento dos frutos (EIDF) e frutos. Essas contagens foram executadas tanto em condições ideais para o crescimento das plantas, com uma temperatura de 25°C, como em condições de estresse, com uma temperatura de 35°C (experimento 2 e 3). O período total abrangeu 4 semanas (T1, T2, T3 e T4). Adicionalmente, ao término do

experimento, procedeu-se à pesagem das plantas para avaliação de sua massa fresca, contemplando os seguintes parâmetros: peso total, massa fresca e tamanho da parte aérea, bem como massa fresca e tamanhoda raízes.

3.3 Análises fisiológicas – trocas gasosas

As avaliações de trocas gasosas foram realizadas com um analisador de gás por infravermelho (LI-6400XT Portable Photosynthesis System, LI-COR, Lincoln, USA).

Para o experimento 1, as medições foram realizadas ao final de cada ciclo de temperatura (35 °C e 40 °C) em todas as plantas. Já para os experimentos 2 e 3, foram realizadas as medições em duas ocasiões distintas: um dia antes e um dia após as aplicações, tanto a primeira quanto a segunda. As características avaliadas foram: fotossíntese líquida (A ; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração (E ; $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s ; $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e E_i/UA (A/E ; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$). Todas as avaliações foram realizadas entre 9 e 10 horas com utilização de fonte artificial de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) em câmara fechada fixada em 1200 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Blue + Red LED LI-6400-02B, LI-COR, Lincoln, USA). Foram designadas quatro réplicas biológicas para as medições em ambas as temperaturas.

Um teste prévio foi realizado para determinar a quantidade ideal de fótons para atingir a máxima taxa de fotossíntese nas plantas. Com base nesse teste, observou-se que as plantas apresentaram uma maior taxa de fotossíntese líquida quando expostas a uma intensidade de 1200 μmol de fótons.

3.4 Quantificação de GABA

A quantificação de GABA endógeno foi feita de acordo com Komatsuzaki et al., (2005) com pequenas alterações. Para isso, foi adicionado 1ml de etanol 70% (V/V) a 100 mg de tecido foliar congelado e macerado, a mistura foi homogeneizada com auxílio de um agitador vortex por 1 minuto e, em seguida, centrifugada a 8000 g por 5 minuto a 4 °C. O sobrenadante foi coletado, e a lavagem com etanol foi realizada novamente, obtendo-se um volume final de 2ml que foi evaporado no speedvac a 45°C. O precipitado foi dissolvido em 500 uL de H₂O milliQ. Em seguida, foram adicionados 100 uL do extrato em tubos de 2mL, mais 200 uL de tampão borato (0,2 M de ácido bórico + 0,2 M de borato de sódio, com pH 9) seguido por 1 mL de fenol (6%). O composto formado foi incubado em gelo e, posteriormente, foram adicionados 400 uL de hipoclorito de sódio

7,5%. A mistura foi novamente incubada em gelo por 5 minutos, seguida de banho-maria em água fervente por 10 minutos e, novamente, incubado em gelo por 5 minutos. Por fim, a absorbância foi medida á 630 nm.

3.5 Análise *In silico*

Para análise de expressão gênica, foram identificados genes que fazem parte da rota de biossíntese do GABA, além de transportadores envolvidos nesse processo. As buscas foram realizadas no banco de dados Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>) e na literatura. Além disso, também foram realizadas buscas por possíveis microRNAs que estejam regulando a expressão de GABA, cuja função é proteger o tomateiro de danos extremos, ocasionados pelo estresse térmico, utilizando a ferramenta psRNATarget (<https://www.zhaolab.org/psRNATarget/>).

3.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA $p \leq 0,05$) e em seguida ao teste de normalidade (Scott-Knott, $p \geq 0,05$). Todas as análises foram realizadas no software R versão 3.6.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4 Concentração ideal de GABA 700umol e tempo de coleta

A elevação substancial e transitória na concentração de GABA atingiu seu ponto máximo nas amostras colhidas 12 horas após a aplicação (Figura 4). Com base nesse resultado, os momentos de coleta para os experimentos subsequentes foram definidos como 2 e 12 horas após a aplicação. Normalmente, o acúmulo de GABA ocorre em resposta a situações estressantes, seja de natureza biótica ou abiótica (Li et al., 2021). Contudo, registrou-se um incremento endógeno mesmo em plantas cultivadas em condições ideais de crescimento, possivelmente atribuído à aplicação exógena, que contribuiu para o aumento de sua concentração interna. Vale destacar que o conteúdo de GABA nas culturas varia entre espécies e variedades e depende de uma infinidade de fatores, como o estágio de desenvolvimento da planta, condições ambientais, resposta a estresses bióticos e abióticos e tratamentos pós-colheita (Ham et al., 2012; Kim et al., 2013; Chalorchaoenyng et al., 2017).

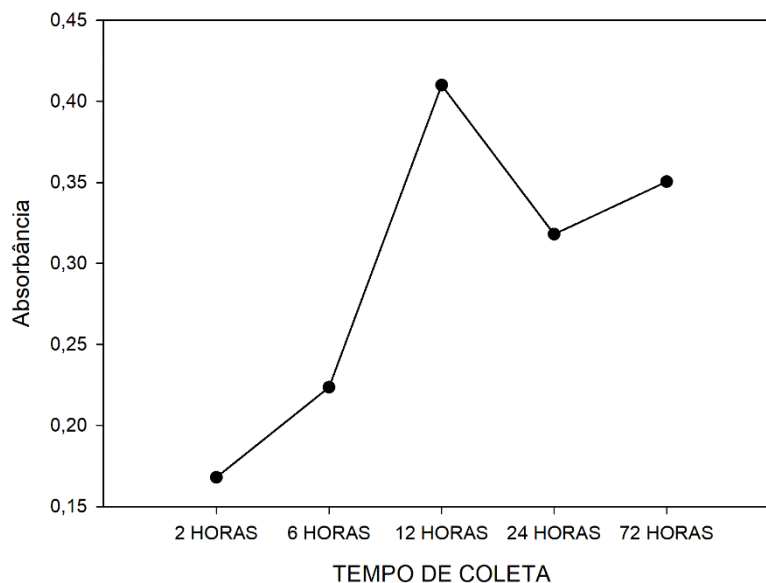


Figura 4: Absorbância do GABA ao longo do tempo de coleta.

No que tange à concentração ótima de aplicação, conduziu-se um experimento com duas concentrações distintas, sendo uma previamente utilizada por Malekzadeh et al., 2014, reconhecida como mais eficaz ($700 \mu\text{mol L}^{-1}$), e a outra configurada com um aumento na dosagem para investigar seus efeitos em plantas de tomate submetidas a condições de estresse térmico ($1000 \mu\text{mol L}^{-1}$). Os resultados das análises fisiológicas revelaram que as plantas tratadas com $700 \mu\text{mol L}^{-1}$ apresentaram uma taxa de fotossíntese significativamente superior a 40°C em comparação com os demais tratamentos. Entretanto, a 35°C , a fotossíntese líquida nas plantas submetidas a $700 \mu\text{mol L}^{-1}$, não apresentou diferenças em relação ao controle, embora tenha sido superior àquelas tratadas com a concentração de $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, todas as plantas, tanto as tratadas quanto as do grupo controle, demonstraram maior taxa fotossintética à 35°C (Figura 5A), o que confirma que essa temperatura é menos prejudicial ao sistema fotossintético da planta em comparação com 40°C , configurando assim um estresse moderado.

Em relação à condutância estomática, observou-se uma maior abertura estomática em plantas tratadas com GABA a $700 \mu\text{mol L}^{-1}$ à 35°C e 40°C (Figura 5B). Em decorrência dessa maior condutância, observou-se um aumento correspondente na taxa de transpiração, indicando uma provável elevação na perda de água por essas plantas. Conforme observado, a condutância demonstra uma correlação direta com a fotossíntese e a transpiração em todas as temperaturas e tratamentos de concentração. À medida que a

abertura estomática se intensifica, há um aumento na perda de água por transpiração. No entanto, como aspecto benéfico, esse aumento na abertura estomática resulta em uma maior produção de energia pela fotossíntese. Essa dinâmica está intrinsecamente ligada ao desempenho das funções vitais nas plantas.

A condutância estomática nas plantas tratadas com $700 \mu\text{mol L}^{-1}$, não foi maior apenas na temperatura de 35°C , mas na temperatura de 40°C também, o que resultou na maior transpiração em ambas as temperaturas, quando comparadas aos demais tratamentos (controle e $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$). Isso pode ter contribuído para manutenção da temperatura interna e proteção do aparato fotossintético, indicado pela maior taxa de fotossíntese líquida nas plantas submetidas a temperatura de 40°C . No entanto, a 35°C , a taxa de fotossíntese líquida das plantas tratadas com $700 \mu\text{mol L}^{-1}$, não diferiu das plantas controle, sugerindo que a aplicação de GABA a $700 \mu\text{mol L}^{-1}$ pode ser mais eficiente em condições de temperaturas que configuram estresse severo para as plantas de tomateiro, como a de 40°C .

A transpiração está diretamente associada à regulação da temperatura interna da planta. Uma taxa de transpiração mais elevada pode desempenhar um papel crucial na manutenção do funcionamento eficiente do aparato fotossintético, especialmente em condições de temperaturas elevadas para as plantas.

No entanto, no contexto da eficiência instântanea do uso da água (EiUA), não se observou disparidade entre as diferentes concentrações de GABA, sendo as diferenças significativas apenas em relação às temperaturas. Em condições de estresse a 40°C , as plantas demonstraram uma maior eficiência instantânea no uso da água (Figura 5D). É relevante destacar que EiUA está intrinsecamente ligada à relação entre a fotossíntese e a transpiração, conforme descrito por Jaimez et al., (2005). Nesse contexto, os valores registrados refletem a quantidade de carbono fixada pela planta para cada unidade de água perdida.

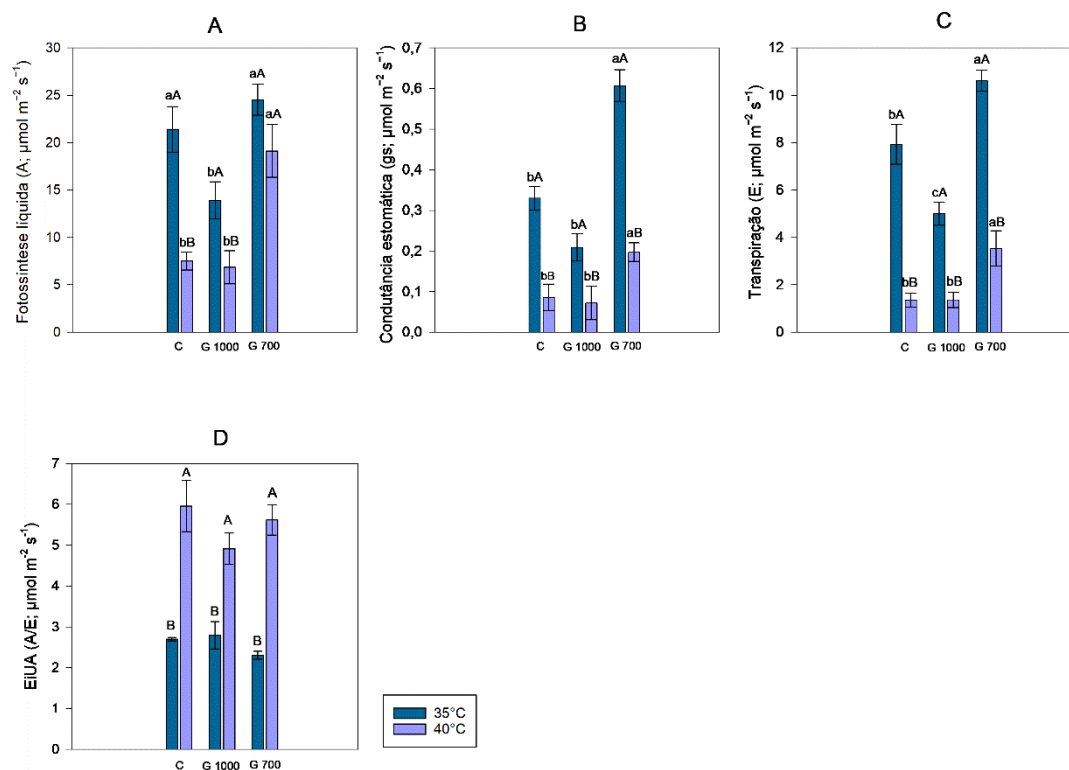


Figura 5: Análise dos parâmetros fotossintéticos de plantas cultivadas em diferentes estresses: temperatura e concentração de GABA. Letras maiúsculas comparam as temperaturas dentro da concentração individualmente e letras minúsculas comparam concentrações dentro de cada temperatura. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$)

4.2 Papel do Ácido Gama-Aminobutírico (GABA) no Crescimento e Desenvolvimento das Plantas

Segundo Radford (1967) as análises de crescimento proporcionam a compreensão das disparidades funcionais e estruturais entre as plantas, permitindo a identificação de respostas a diversos tratamentos e/ou a seleção de genótipos mais eficazes. Com base nisso, foram feitas análises de crescimento, que se estenderam por um período de quatro semanas, cobrindo todo o experimento. Isso permitiu fazer a avaliação do crescimento das plantas e comparações entre os tratamentos sob condições de estresse térmico (35 °C), como também sob condições ideais de crescimento e desenvolvimento (25 °C). Para esse fim, foram avaliados quatro características fenotípicas nas plantas, que incluíram a contagem do número de folhas, botões florais, número de flores e estágio inicial de desenvolvimento do fruto (EIDF) (Figura 6).



Figura 6: Características fenotípicas avaliadas durante a condução do experimento.

Como resultado, as folhas das plantas submetidas ao estresse (Figura 7A), a comparação entre os diferentes períodos (T1, T2, T3, T4) indica que os tratamentos mantiveram uma média constante de folhas por planta, evidenciando uma quantidade estável de folhas disponíveis para o processo fotossintético. Contudo, no último período (T4), após 22 dias de estresse, observou-se um aumento no número de folhas nas plantas tratadas com GABA em comparação com o grupo controle. Apesar da redução no número de folhas em ambos os tratamentos ao longo do período de exposição à temperatura elevada, o GABA demonstrou a capacidade de manter um maior número de folhas em comparação com o grupo controle após 22 dias, sugerindo seu papel benéfico na preservação do número de folhas e, por conseguinte, na manutenção das taxas fotossintéticas em plantas sob estresse térmico.

A mesma tendência foi percebida em plantas em condições ideais de crescimento (figura 8A). No entanto, a diminuição foi atribuída à poda de limpeza realizada para eliminar ramos laterais em excesso, que foram realizadas somente em plantas em temperatura de 25°C.

Prosseguindo com a análise, a média de botões florais nas plantas submetidas ao estresse (Figura 7B) ao longo dos diferentes períodos revelou uma diferença estatística no tempo 1. No T1 e T3, observou-se que as plantas do grupo controle apresentaram um número superior de botões florais em comparação com as plantas tratadas com GABA. Isso pode indicar uma resposta adaptativa das plantas ao estresse, levando a uma transição acelerada para o estágio reprodutivo. A maior incidência de botões florais, flores (T2 e T4) e EIDF (T3 e T4) nas plantas controle sugere uma possível relação com níveis mais elevados de estresse, enquanto as plantas tratadas com GABA parecem ter atenuado esse efeito, evidenciando mais uma vez, seu papel benéfico em condições de temperaturas elevadas.

Em plantas cultivadas em condições ideais de temperatura, não foram identificadas diferenças estatísticas significativas no número de botões florais ao longo dos períodos de contagem, quando comparadas entre os diferentes tratamentos (figura 8 B). Entretanto, ao considerar o fator tempo dentro do grupo tratado com GABA, os valores mais elevados foram registrados nos tempos 1 e 2. Essa mesma tendência foi observada nas plantas do grupo controle.

Em relação à média de flores por tratamento (Figura 7 e 8 C), destaca-se o período T2, em ambas as temperaturas. As plantas que receberam a aplicação de GABA exógeno apresentaram uma média mais elevada de flores em temperatura ideal. Essa média refletiu na quantidade de EIDF (Estágio Inicial de Desenvolvimento de Fruto) nessas plantas (Figura 8 D), conforme demonstrado no gráfico, onde as plantas do grupo de GABA revelaram uma média superior de EIDF por planta. Contudo, em plantas estressadas, a média de flores e EIDFs foi maior no tratamento controle, evidenciando novamente uma transição acelerada das flores para o EIDF. (figura 7 D).

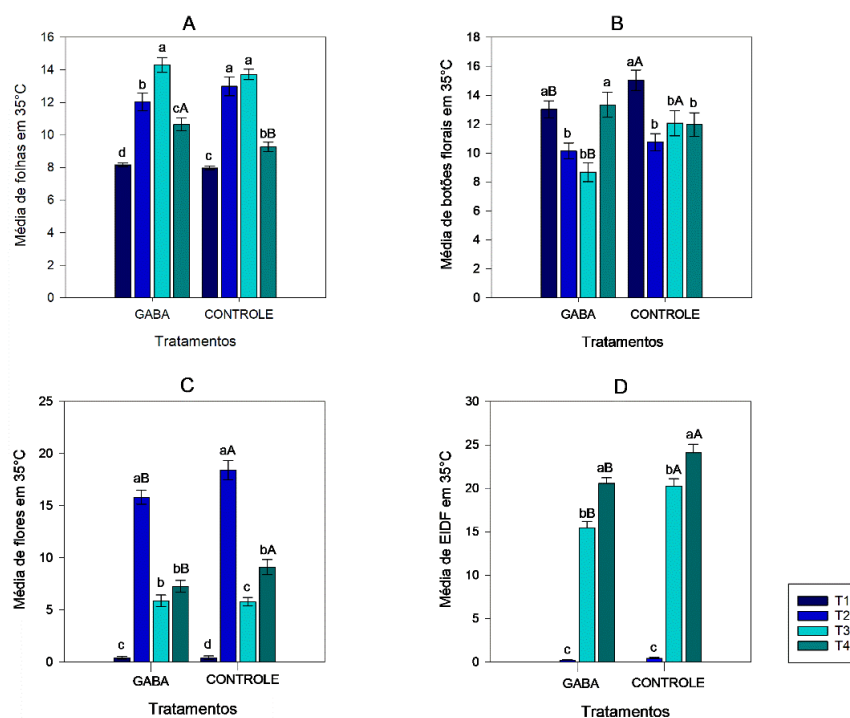


Figura 7: Características fenotípicas avaliadas em plantas sob estresse térmico. A: média de folhas; B: média de botões florais; C: média de flores; D: média de EIDF. Estatística realizada pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$), letras maiúsculas comparam entre os tratamentos dentro do tempo relacionado (CONTROLE X GABA) e minúsculas entre os tempos (T1, T2, T3 e T4) dentro do tratamento específico GABA e CONTROLE.

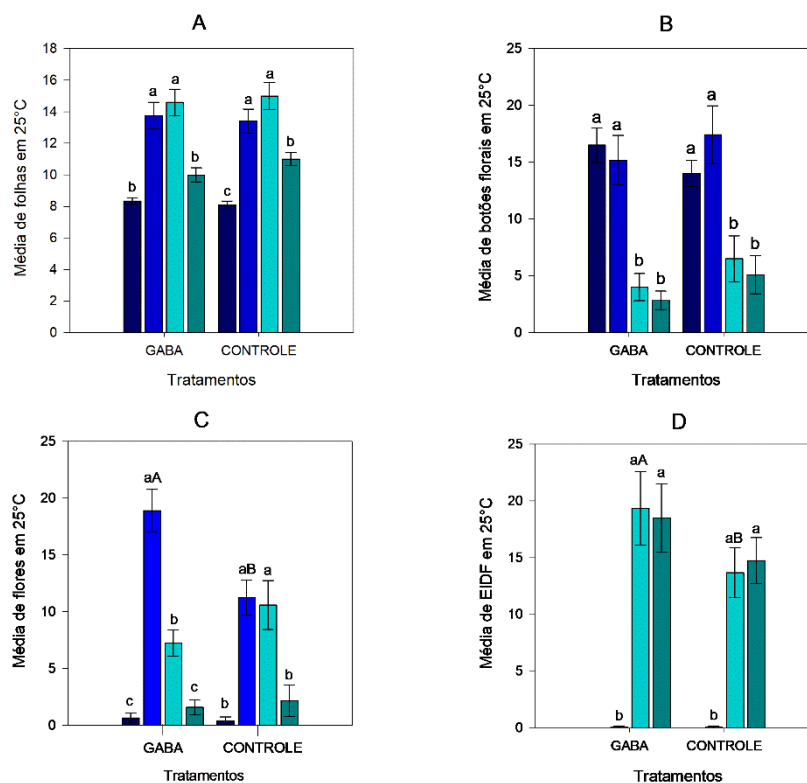


Figura 8: Características fenotípicas avaliadas em plantas sob condição ideal.

A: média de folhas; B: média de botões florais; C: média de flores; D: média de EIDF. Estatística realizada pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$), letras maiúsculas comparam entre os tratamentos dentro do tempo relacionado (CONTROLE X GABA) e minúsculas entre os tempos (T1, T2, T3 e T4) dentro do tratamento específico GABA e CONTROLE.

O impacto no crescimento das plantas tratadas com GABA em comparação com as plantas controle pode ser atribuído ao acúmulo de GABA no citosol, que não foi convertido em succinato na mitocôndria da célula. Esse acúmulo excessivo de GABA pode retardar o crescimento das plantas, como evidenciado por estudos anteriores (Yamaguchi, 1998). A elevação nos níveis de GABA pode levar à redução de glutamato, uma vez que o glutamato é um precursor do GABA. Koike et al., (2013) conseguiram aumentar os níveis de GABA com sucesso, suprimindo SIGABA-T1 por meio de interferência de RNA. No entanto, as plantas transgênicas exibiram fenótipos anões, com altura inferior à metade da variedade selvagem (WT), e mostraram infertilidade combinada com abscisão severa de flores.

Essa mesma tendência foi observada ao finalizar o experimento, onde se evidenciou uma diminuição na biomassa da parte aérea nas plantas de tomate tratadas com GABA em comparação com as plantas controle (Figura 7).



Figura 9: Imagem destacando a disparidade no desenvolvimento entre plantas tratadas com GABA e plantas CONTROLE. Plantas CONTROLE posicionadas à esquerda nas imagens, enquanto as plantas tratadas com GABA ocupam o lado direito.

Embora o papel do GABA nas plantas não seja completamente claro, o glutamato (Glu) desempenha uma função essencial na biossíntese de aminoácidos (Oaks e Hirel, 1985; Lea et al., 1990; Lam et al., 1995), purinas (Oaks e Hirel, 1985; Kim et al., 1995), pirimidinas (Doremus, 1986) e clorofila (Wettstein et al., 1995). A ligação entre os baixos níveis de Glu e a falta de alongação celular pode ser explicada pelo fato de que o 2-oxoglutarato, produzido pela desaminação do Glu (Lea et al., 1990), é um co-substrato necessário para dioxigenases envolvidas na biossíntese de giberelinas e modificações pós-traducionais de proteínas da parede celular, influenciando a extensibilidade da parede celular (Hedden, 1992).

Além disso, os efeitos da diminuição do porte aéreo das plantas, podem ter sido causados pela liberação da Calmodulina (CaM) e sua associação com a GAD. A liberação de CaM pode afetar sua localização celular e sua interação com outras proteínas. A regulação da atividade da GAD parece estar integrada a uma rede modulada por Ca^{2+} , sugerindo seu envolvimento no controle do crescimento celular. Essa regulação pode ser particularmente relevante, considerando que estresses externos que aumentam a atividade da GAD estão associados a sinais celulares de Ca^{2+} (Wallace et al., 1984; Trewavas e Knight, 1994). Assim, essas observações levantam a possibilidade de que a regulação da atividade da GAD faça parte de uma rede modulada por Ca^{2+} envolvida no controle do crescimento.

O peso fresco e o tamanho em altura da parte aérea, bem como o peso e o tamanho das raízes foram avaliados ao término do experimento. Apenas no que diz respeito ao tamanho das raízes, não foram observadas diferenças estatísticas, enquanto nos outros parâmetros avaliados, as plantas do grupo controle apresentaram uma média superior em comparação com as plantas tratadas com GABA (tabela 2). É relevante destacar que as plantas que receberam aplicação de GABA demonstraram um peso de

raiz maior, indicando um investimento significativo no aumento da massa radicular como estratégia de aclimação às condições de alta temperatura, visando uma maior absorção de água para aumentar a transpiração, contribuindo para a regulação da temperatura interna da planta. Além disso, nota-se uma diminuição da parte aérea de plantas tratadas com GABA exógeno (Figura 7). Foi evidenciado que o GABA influencia o desenvolvimento em diferentes espécies vegetais, incluindo lentilhas-d'água (Kinnersley e Lin, 2000) e tabaco (Baum et al., 1996). Além disso, observou-se impacto no crescimento do caule em *Stellaria longipes* (Kathiresan et al., 1998) e no desenvolvimento das raízes em *Arabidopsis* (Locy, 1997). Li et al., (2018) em um experimento com o intuito de aumentar os níveis de GABA, utilizaram o sistema CRISPR/Cas9 multiplex direcionado aos três SIGABA-Ts e SISSADHs, como resultado, conseguiram aumentar em até 19 vezes o conteúdo de GABA endógeno. Entretanto, as plantas editadas apresentaram uma frutificação deficiente, sendo algumas delas teratogênicas, caracterizadas por nanismo severo, folhas compostas pálidas e enroladas, além de exibir necrose em folhas e botões. Mostrando assim, que o acúmulo elevado de GABA poderia provocar um desequilíbrio grave de aminoácidos nas células, levando a fenótipos aberrantes (Koike et al., 2013).

Com base nos resultados obtidos em condições ideais, pode-se inferir que a aplicação de GABA em plantas não submetidas a estresse pode ter desencadeado um efeito considerado tóxico. Essa resposta sugere a possibilidade da aplicação de GABA ter influenciado adversamente as rotas de biossíntese de aminoácidos cruciais para o desenvolvimento vegetal, desviando-as de suas trajetórias normais.

MASSA FRESCA					
	PESO TOTAL	PESO RAIZ	TAMANHO RAIZ	PESO DA PARTE AÉREA	ALTURA DA PARTE AÉREA
PLANTAS SOB ESTRESSE TÉRMICO					
	PLANTAS TRATADAS COM GABA				
g/cm	19,769 b	4,500 a	25,769 ns	15,346 b	11,280 b
	PLANTAS CONTROLE				
g/cm	21,576 a	3,846 b	24,423 ns	17,730 a	13,038 a
PLANTAS SOB CONDIÇÕES IDEIAS					
PLANTAS TRATADAS COM GABA					

g/cm	21,594 b	4,281 ns	22 b	17,281 b	13,093 b
PLANTAS CONTROLE					
g/cm	25,459 a	4,968 ns	24,359 a	20,531 a	14,937 a

Tabela 2: Peso da massa fresca das raízes e da parte aérea, além das dimensões em centímetros das raízes e da parte aérea de plantas de tomate, sujeitas a estresse térmico ou crescimento ideal. A análise estatística foi conduzida por meio do teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$), em que as letras indicam diferenças entre o controle e aplicação de GABA em cada condição.

4.3 Efeitos do “*Speed Breeding*” no desenvolvimento de plantas de tomate

O Speed Breeding, ou melhoramento rápido, é uma técnica que visa acelerar o desenvolvimento de plantas em ambientes controlados, onde as condições de luz e temperatura são cuidadosamente ajustadas. Essa tecnologia permite encurtar significativamente o ciclo de melhoramento genético para o desenvolvimento de novas variedades de plantas e agiliza a pesquisa em agricultura, impulsionando a rápida progressão das gerações (Watson et al., 2018).

Diante desse contexto, observou-se, ao longo do acompanhamento do crescimento, que as plantas de tomate, submetidas ao fotoérido longo (experimento 3) não apresentaram diferenciação significativa em relação ao crescimento quando comparadas às plantas que cresceram sob o fotoperíodo e temperatura ideais (experimento 2) (Figura 10).

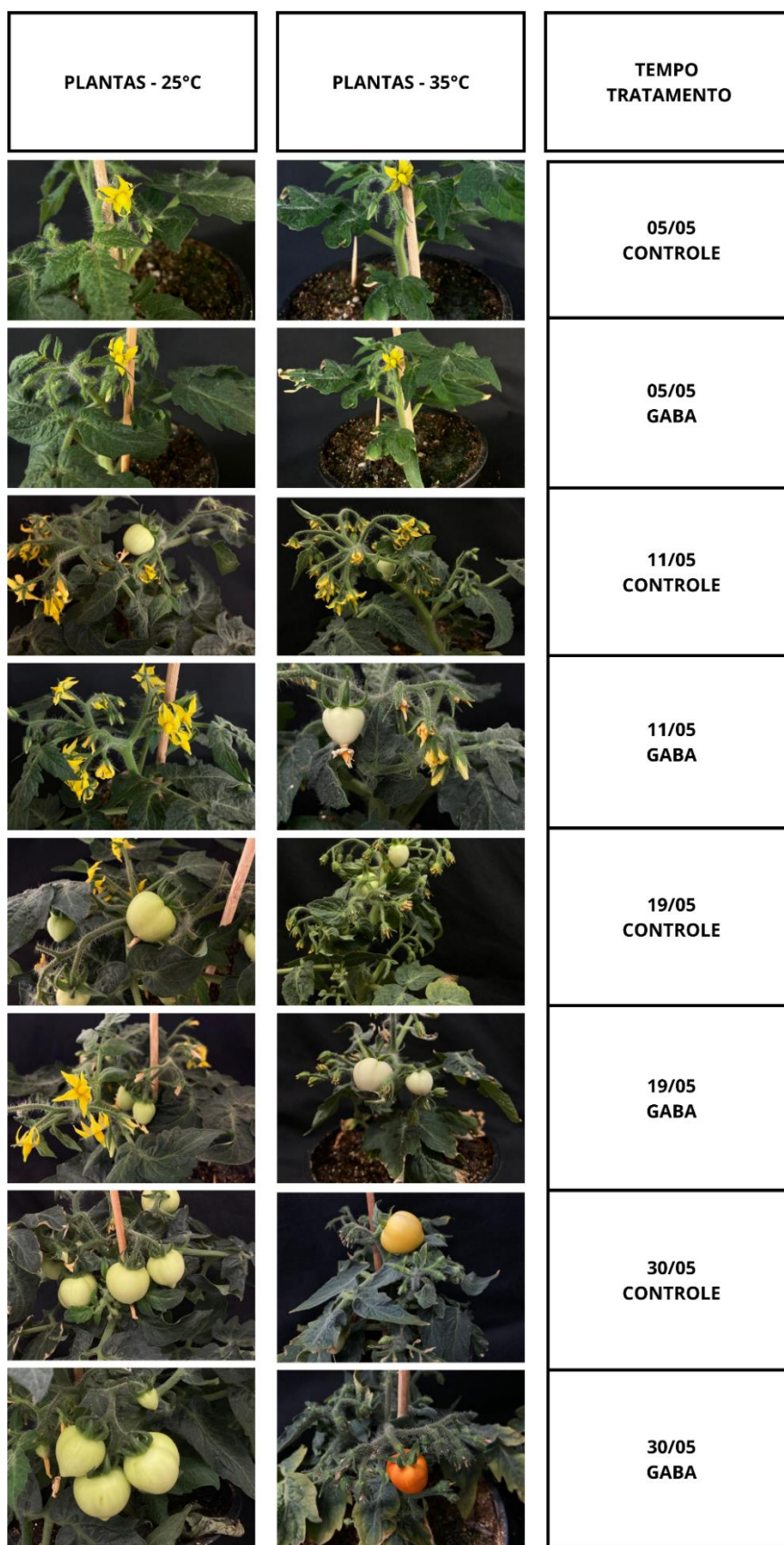


Figura 10: Fotografias documentando o desenvolvimento das plantas de tomate ao longo do tempo, sob ambas as condições, permitindo comparações entre o grupo controle e o grupo tratado com GABA.

Uma disparidade identificada relaciona-se aos frutos deformados e com aparência de podridão observados nos tomates que cresceram em condições de estresse e com fotoperíodo longo. O aspecto de podridão foi observado somente nas plantas controle, enquanto as plantas tratadas com GABA não exibiram essa distinção (figura 11 e 12). Altas temperaturas podem causar danos nas membranas celulares das células dos frutos. Isso leva à perda de integridade da membrana, resultando na liberação compostos intracelulares para o citoplasma, o que pode causar danos e necrose dos frutos. Paralelamente, a exposição a elevadas temperaturas pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio nas células dos frutos. O acúmulo de EROs pode causar danos às biomoléculas, incluindo lipídios, proteínas e DNA, contribuindo, assim, para o processo de necrose. A exposição excessiva à luz, também pode levar à produção de espécies reativas de oxigênio. Dado que o ácido gama-aminobutírico (GABA) atua como um agente antioxidante, ele é capaz de potencializar a atividade de enzimas presentes no sistema antioxidante, reduzindo a formação de EROs. Nesse contexto, os resultados indicam que o GABA pode desempenhar um papel eficaz na preservação do estado redox das células frutíferas, atenuando a incidência de necrose nos frutos.

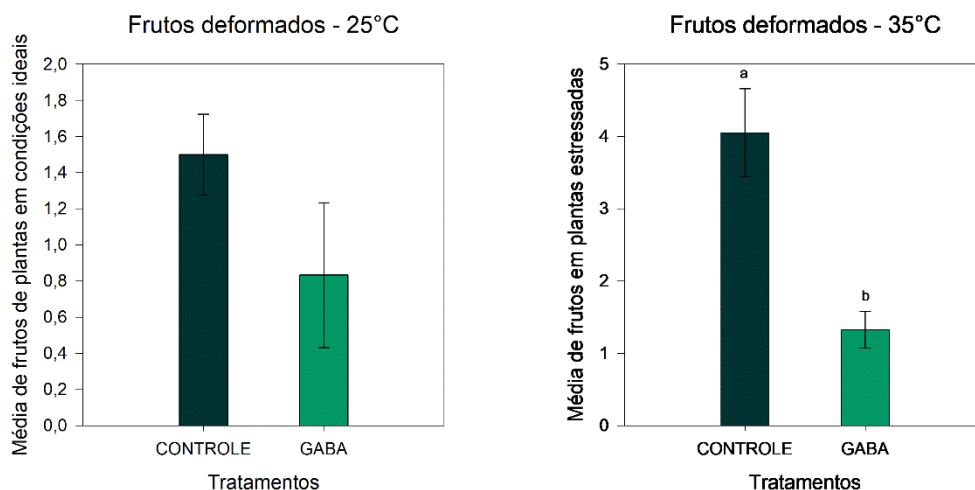


Figura 11: Gráfico mostrando a quantidade de frutos deformados nas duas condições de temperatura. A análise estatística foi conduzida por meio do teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$), em que as letras indicam diferenças entre o controle e o GABA em cada condição.



Figura 12: Frutos desidratados e com coloração marrom provenientes de plantas do grupo controle sob condições de estresse.

Em relação ao processo de amadurecimento dos frutos nessas condições, foi observado um amadurecimento precoce dos frutos sob fotoperíodo longo à 35°C (Figura 10). No entanto, a antecipação na maturação, não se refletiu em uma maior produção final de frutos ao término do experimento. As plantas do grupo controle, tanto em condições ideais quanto sob estresse, produziram uma quantidade superior de frutos maduros e verdes em comparação com as plantas tratadas com GABA (Figura 13).

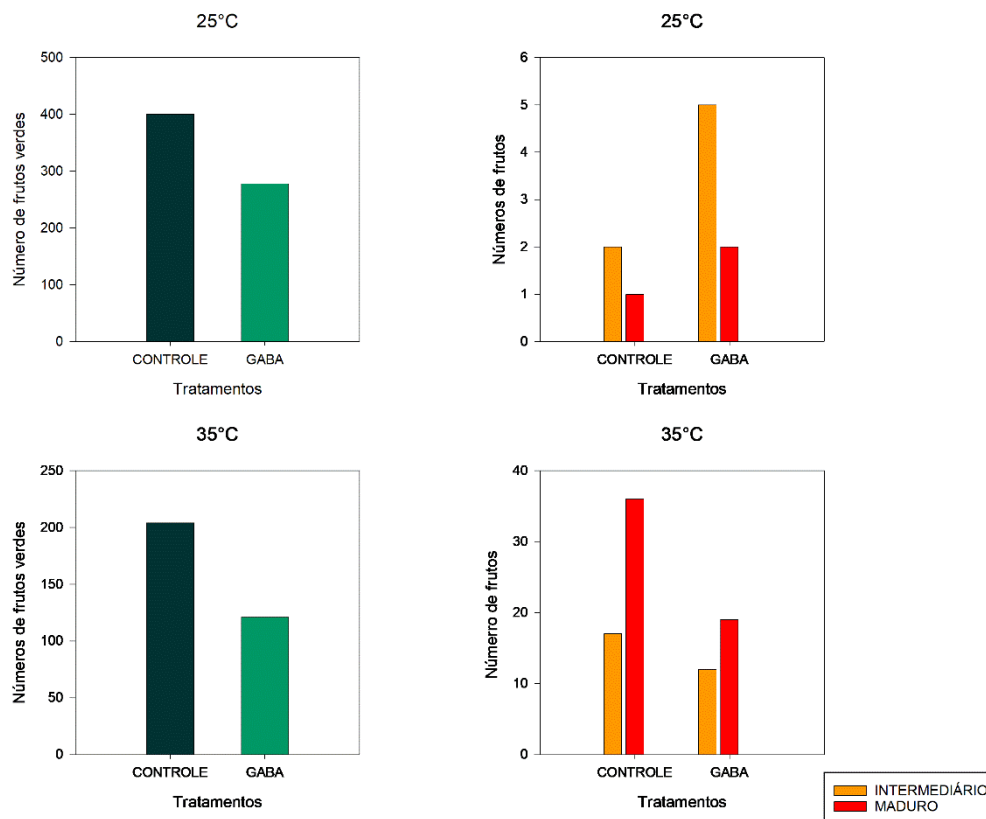


Figura 13: Contagem de frutos em estágio verde, intermediário e maduro em distintas condições de desenvolvimento.

Contudo, a problemática associada ao amadurecimento dos frutos em plantas de tomate já foi abordada por Hanson et al., (2002). Em seu estudo, os pesquisadores destacam que a floração e a frutificação são parâmetros cruciais na avaliação de diferentes cultivares de tomate quando sujeitos a estresse térmico, devido à notável sensibilidade desses processos a temperaturas elevadas. De maneira congruente, as descobertas de Camejo et al., (2005) corroboram essa visão, evidenciando que o aumento da temperatura influenciou a atividade fotossintética, repercutindo no desenvolvimento e maturação dos frutos, culminando em uma redução no rendimento da colheita.

Além disso, Lifschitz e Eshed (2006) descrevem em seus trabalhos que plantas de tomate, em seu ambiente natural, são perenes e não apresentam sensibilidade ao fotoperíodo, exibindo características de crescimento perene mesmo em um único ciclo sazonal breve. E adicionalmente, a EMBRAPA (2006), ressalta que o tomateiro não demonstra uma resposta significativa ao fotoperíodo, mostrando um bom desenvolvimento tanto em condições de dias curtos quanto de dias longos. Nesse contexto, a hipótese é que não foi o método de *Speed Breeding* que exerceu influência

sobre o processo de maturação dos frutos, mas sim a elevada temperatura às quais as plantas de tomate foram submetidas. Além disso, é possível inferir que as plantas tratadas com GABA direcionaram seus recursos energéticos para preservar a qualidade dos frutos, em detrimento da quantidade.

4.4 Avaliações das trocas gasosas

4.4.1 Impacto da Elevada Temperatura no Aparelho Fotossintético de Plantas Cultivadas a 35°C.

Diversos fatores exercem influência direta ou indireta sobre o processo fotossintético (Concenço et al., 2008). O déficit hídrico, o estresse térmico, as concentrações internas e externas de gases, bem como a composição e intensidade da luz são considerados os principais entre eles. Devido a isso, entender o mecanismo fotossintético de plantas é crucial para o entendimento de como elas respondem a esses tipos de estresse.

A transpiração, caracterizada pela perda de vapor d'água pelas plantas, está associada a espécies com elevadas taxas de absorção de CO₂, resultando em considerável perda por transpiração. Em muitos casos, o aumento significativo no consumo de água está relacionado a um incremento positivo na produtividade (Klar, 1984). Nas plantas, incluindo o tomate, a transpiração é determinada pela demanda climática, resposta estomática a fatores ambientais, índice de área foliar e disponibilidade de água no solo (Taiz & Zeiger, 2004).

A condutância estomática, como mecanismo fisiológico, desempenha papel crucial no controle da transpiração das plantas vasculares terrestres (Messinger et al., 2006). A epiderme foliar, envolta por uma cutícula relativamente impermeável ao vapor d'água e ao dióxido de carbono, contém estômatos cuja resposta, modulada pela regulação da condutância estomática, controla a transpiração foliar, influenciada por fatores como luz, concentração atmosférica de CO₂, umidade e temperatura (Barbiero et al., 2000). Segundo esses autores, a condutância estomática mantém uma relação proporcional com a transpiração, a fotossíntese líquida e o potencial hídrico foliar.

Com base nisso, as respostas das análises de trocas gasosas mostrou que na primeira aplicação em plantas tratadas com GABA, notou-se um aumento na taxa de fotossíntese líquida, condutância estomática e transpiração em comparação com o grupo controle (Figura 14). Esses resultados indicam uma maior abertura dos estômatos na presença do tratamento com GABA, para que as plantas conseguissem assimilar mais

CO₂, como consequência as plantas apresentaram uma intensificação da transpiração, resultando em uma perda significativa de água, conforme ilustrado na figura. Entretanto, é importante notar que, apesar desse aumento na transpiração, as plantas mantiveram a eficiência no uso da água em relação ao controle. (Figura 14A, 14B e 14C).

Contudo, na segunda aplicação, observou-se uma inversão dos resultados em relação à condutância estomática e à taxa de transpiração. As plantas do grupo controle apresentaram maior abertura estomática e maior perda de água em relação àquelas que receberam a aplicação de GABA. Esses resultados sugerem que as plantas tratadas com GABA adotaram uma estratégia de fechamento dos estômatos, visando evitar a perda excessiva de água pela transpiração. No que diz respeito à fotossíntese líquida, não houveram diferenças significativas, assim, tanto as plantas controle quanto as tratadas com GABA, mantiveram a taxa fotossintética alta.

Entretanto, as plantas submetidas ao tratamento com GABA demonstraram uma melhoria na EUA em comparação com o grupo controle (figura 14E). A eficiência do uso da água refere-se à quantidade de água evapotranspirada por uma planta para a produção de uma determinada quantidade de matéria seca. Nesse contexto, plantas mais eficientes no uso da água conseguem produzir mais matéria seca por grama de água transpirada (Baptista et al., 2001).

A melhoria na eficiência do uso da água está diretamente relacionada ao tempo de abertura estomática. Enquanto a planta absorve CO₂ para realizar a fotossíntese, há a perda de água para o ambiente por meio da evapotranspiração, seguindo um gradiente de potenciais hídricos (Pereira-Netto et al., 2002).

No contexto EiUA destaca-se que as plantas tratadas com GABA apresentaram uma maior eficiência instantânea no uso da água, conforme indicado por Jaimez et al. (2005), que define esses valores com base na relação entre a fotossíntese e a transpiração. Os resultados observados refletem a quantidade de carbono fixada pela planta em relação a cada unidade de água perdida (Figura 14D).

De modo geral, no início do período de estresse (aplicação 1), as plantas submetidas ao tratamento com GABA apresentaram um incremento na taxa de fotossíntese líquida em comparação ao grupo controle. Mesmo diante de uma elevada taxa de transpiração, essas plantas foram capazes de manter a eficiência do uso da água, sugerindo uma menor perda de água por essas plantas. Em contrapartida, quando o estresse foi prolongado (aplicação 2), as plantas sob tratamento com GABA não apresentaram maior fotossíntese líquida em relação ao grupo controle. No entanto, essas

plantas demonstraram uma capacidade de redução na perda de água em relação à quantidade de carbono fixado. Esta resposta parece correlacionar-se com um aumento significativo da massa seca das raízes, indicando um direcionamento do crescimento radicular como estratégia para atenuar os efeitos adversos no status hídrico das plantas sob elevadas temperaturas. Tal comportamento sugere uma adaptação voltada à manutenção da homeostase térmica nas plantas tratadas com GABA.

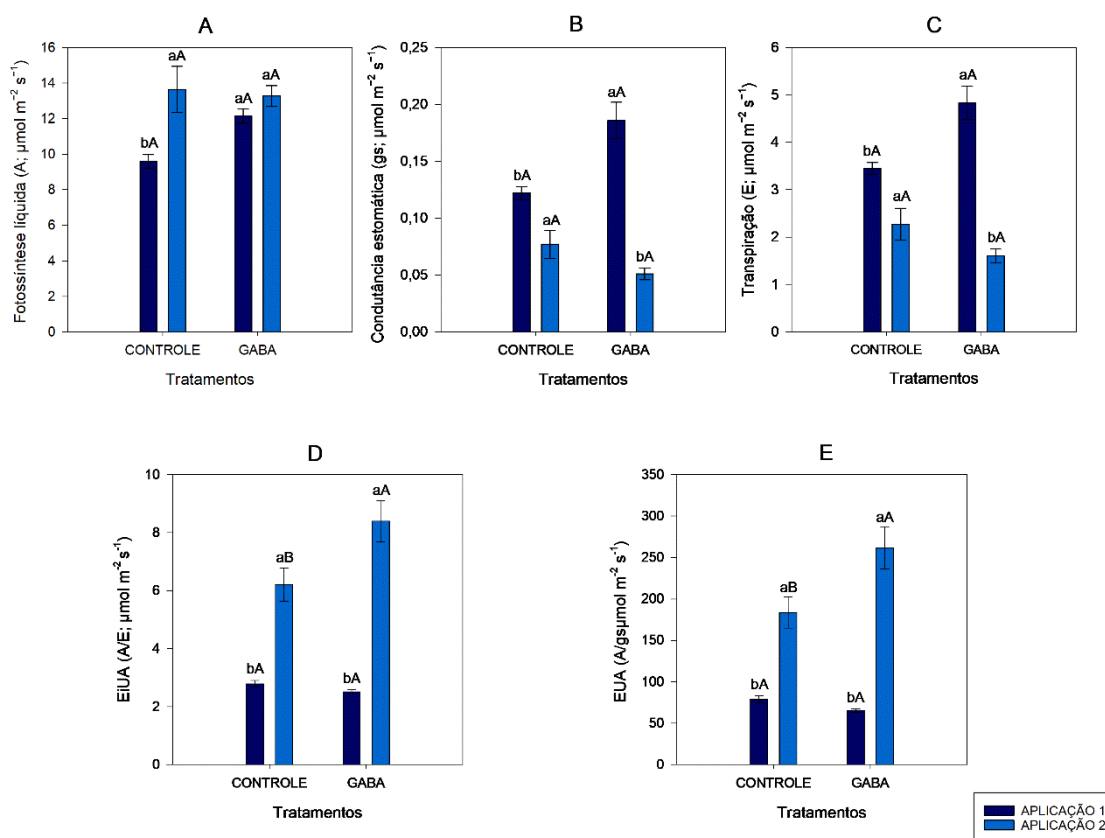


Figura 14: Análise dos parâmetros fotossintéticos em plantas submetidas ao estresse térmico de 35°C. Letras comparam entre os tratamentos CONTROLE e GABA dentro da aplicação 1 e 2. EiUA refere-se a eficiência instantânea do uso da água e EUA a eficiência do uso da água. Estatística realizada pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

4.4.2 Análises fisiológicas em plantas cultivadas sob condição ideal

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos parâmetros avaliados pelo analisador de gás infravermelho (IRGA) nas plantas cultivadas sob temperatura ótima (figura 15). Esses resultados indicam uma similaridade entre os tratamentos no que diz respeito à fixação de carbono, abertura estomática e transpiração. Contudo, em termos de (EiUA), foi constatada uma disparidade entre a primeira e segunda aplicação de GABA, resultando em um aumento da eficiência ao longo desse período nas plantas tratadas (figura 15D).

Na análise dos resultados, não foram identificadas diferenças estatísticas em relação a EUA, sugerindo, portanto, que tanto as plantas controle quanto as tratadas com GABA possivelmente apresentaram uma produção equivalente de matéria seca por grama de água transpirada (figura 15E). Os resultados indicam que a aplicação de GABA sob condições ótimas para o desenvolvimento de tomateiro não promove alterações nos parâmetros fotossintéticos avaliados.

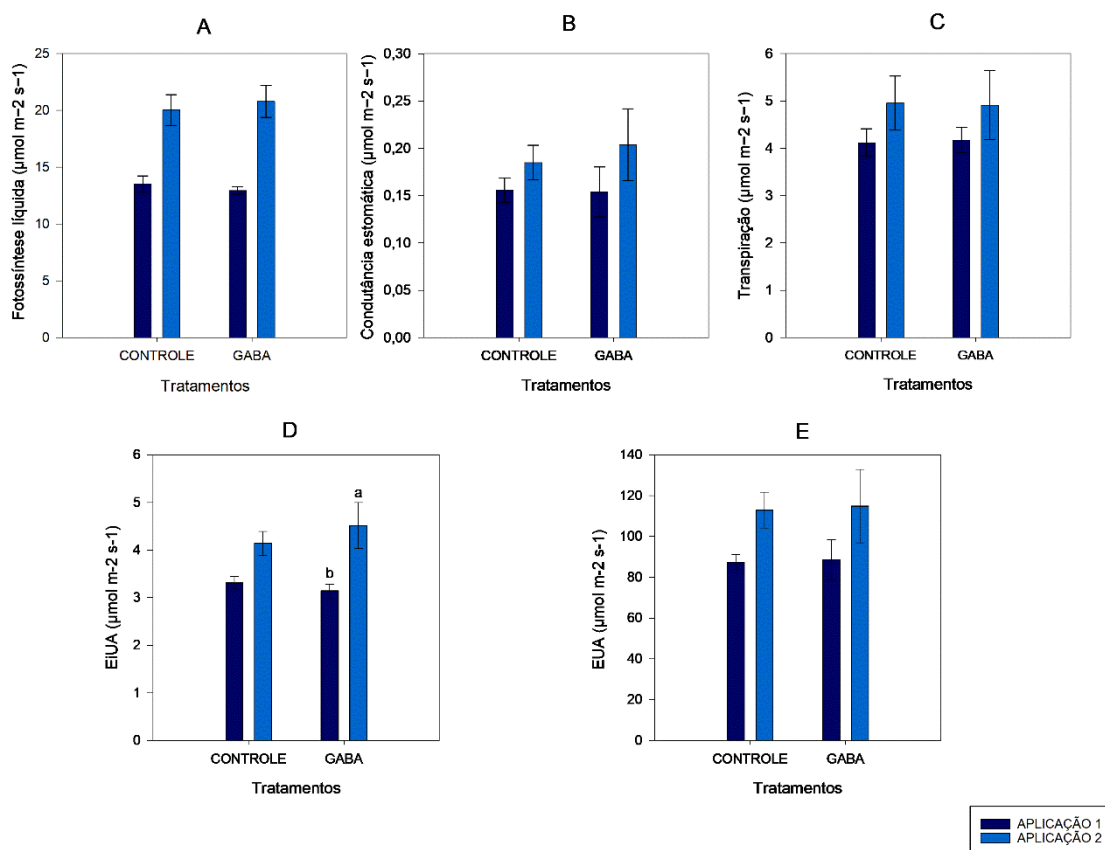


Figura 15: Análise dos parâmetros fotossintéticos em plantas cultivadas em condições ideais de 25°C. teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$). As letras dos gráficos D sobre a eficiência instantânea do uso de água (EiUA) comparam o tratamento GABA em relação a aplicação 1 e 2, realizados pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

4.5 Quantificação de GABA endógeno

4.5.1 Quantificação de GABA endógeno em plantas submetidas ao estresse térmico

O teor endógeno de GABA em plantas submetidas a um estresse térmico a 35°C e coletadas após 2 horas da aplicação demonstrou maiores valores em controle. Entretanto, após 12 horas da primeira coleta, as plantas tratadas com GABA apresentaram um incremento em seu teor de GABA (Figura 16A). Isso indica que após 2 horas da aplicação de GABA, a

concentração desse composto diminui, sugerindo um possível mecanismo de retroalimentação negativa. No entanto, após 12 horas, esse padrão se inverte, com as plantas tratadas apresentando uma concentração maior de GABA em comparação com o grupo controle, diante disso, há um mecanismo regulatório no qual a concentração de GABA diminui em resposta à aplicação após 2 horas, mas aumenta após 12 horas. Esse padrão oposto pode indicar uma autorregulação do sistema da planta para manter níveis homeostáticos. No que se refere à segunda aplicação, notou-se um aumento no teor endógeno de GABA em plantas controle coletadas 12 horas após a aplicação, mesmo sem a adição de GABA externo (figura 16B).

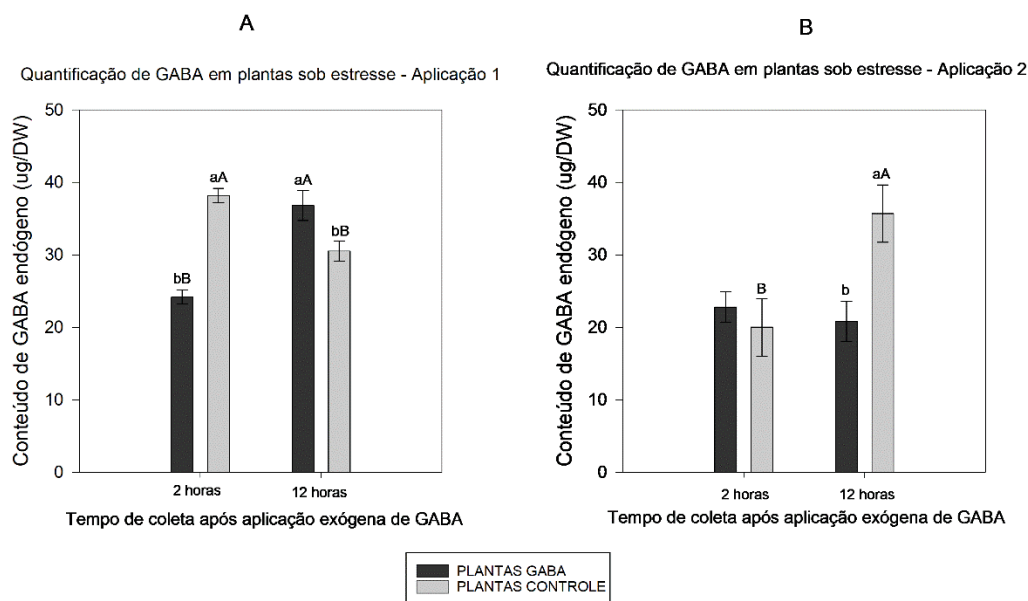


Figura 16: Quantificação de GABA em plantas submetidas a estresse térmico. Letras maiúsculas comparam o tempo dentro de cada tratamento e letras minúsculas comparam os tratamentos dentro de cada tempo.

O primeiro relato de um aumento considerável no acúmulo de GABA em resposta ao estresse foi feito por Naylor e Tolbert (1956), em que folhas de cevada foram alimentadas com ácido glutâmico marcado com C14 e os efeitos da privação de oxigênio no metabolismo do glutamato foram determinadas. Muitos estudos subsequentes confirmaram acumulações grandes e rápidas de GABA em resposta a diversos tipos de estresse.

Conforme abordado por Narayan e Nair (1990), o ácido gama-aminobutírico (GABA) foi identificado em todas as espécies de plantas e em diversas partes de seus

tecidos, conforme investigações anteriores. Uma análise temporal do acúmulo de GABA, considerando os distintos tipos de estresse, revelou padrões específicos. Como por exemplo, o perfil de acúmulo de GABA variou em células de feijão-caupi expostas ao choque térmico (Mayer et al., 1990) em comparação com células de aspargo sujeitas ao estresse de frio (Cholewa et al., 1996). O acúmulo de GABA em culturas de aspargo submetidas ao choque de frio se manifestou em questão de minutos, enquanto em culturas sob choque térmico, esse acúmulo se estendeu por várias horas.

4.5.2 Acúmulo de GABA em plantas cultivadas em condições ideais.

O aumento significativo no acúmulo de GABA em condições ideais foi observado apenas após a primeira aplicação (figura 17A). Plantas tratadas demonstraram um acúmulo exógeno de GABA 12 horas após a aplicação, indicando um aumento na biossíntese desse aminoácido mesmo sob condições ideais de crescimento. Não houveram diferenças significativas na segunda aplicação de GABA (figura 17B). Além disso, uma segunda aplicação de GABA não altera o conteúdo de GABA endógeno, devido a uma possível resposta intrínseca da planta, não sendo necessária uma segunda aplicação. Diante disso, os resultados sugerem que o GABA realmente atua como um sinalizador, uma vez que é induzida a resposta não há necessidade de uma segunda aplicação.

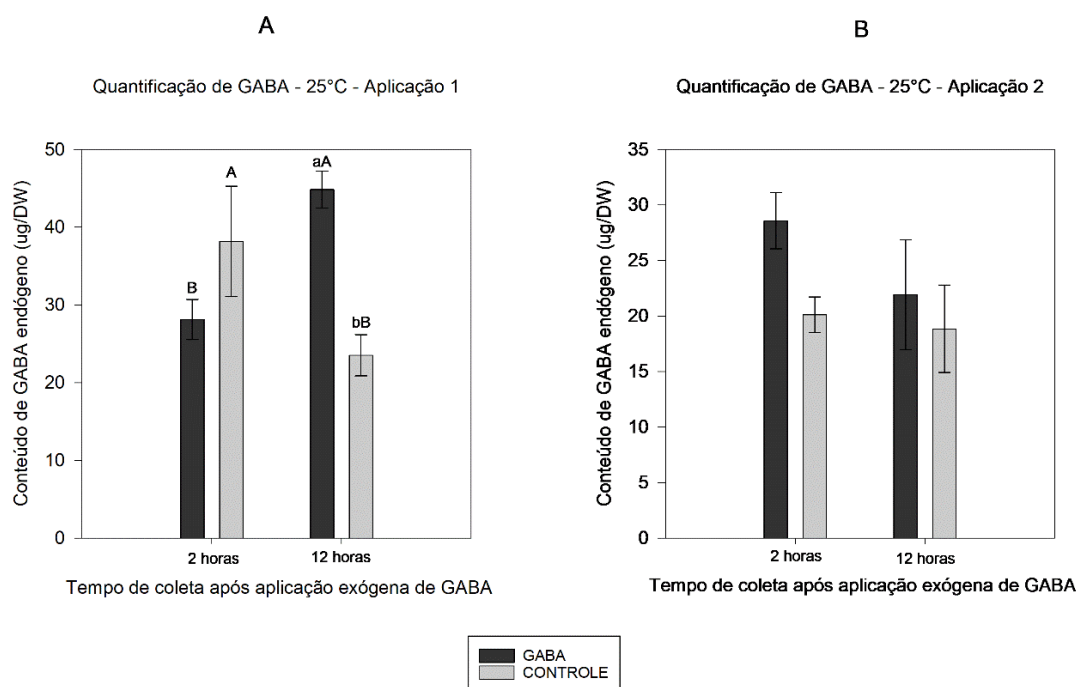


FIGURA 17: Quantificação de GABA em plantas cultivadas em condições ideais. Letras

maiúsculas comparam o tempo dentro de cada tratamento e letras minúsculas comparam os tratamentos dentro de cada tempo.

4.6 Genes e miRNAs Chaves da Rota de Biossíntese do Ácido Gama-Aminobutírico

A identificação dos genes envolvidos na biossíntese e transporte do GABA, foi realizada a partir de uma revisão de literatura e com subseqüentemente os miRNAs envolvidos utilizando a ferramenta psRNATarget. Como resultado desta pesquisa, três genes-chave foram identificados na via metabólica do ácido gama-aminobutírico (GABA) (Hosmani et al., 2019). O primeiro deles, o gene *SIGADI* (*Solyc03g098240-1*), responsável por codificar a enzima glutamato descarboxilase 1 (GAD1) (Akihiro et al., 2008), que desempenha um papel central na conversão do ácido glutâmico em GABA, sendo uma das principais enzimas na biossíntese do GABA (Shelp et al., 2012; Signorelli et al., 2015; Yang et al., 2015). Este processo é potencialmente regulado pelo miRNA *sly-miR5302b-5p*. Em seguida, foi identificado o gene *GABA-T1* (*Solyc07g043310*), que codifica a enzima GABA transaminase, encarregada da degradação do GABA em succinato semialdeído (Akihiro et al., 2008; Clark et al., 2009), possivelmente regulado por *sly-miR5302a*. Finalmente, o gene *SSADH* (*Solyc09g090700*) envolvido na codificação da enzima succinato semialdeído desidrogenase, que converte o succinato semialdeído a ácido succínico (Akihiro et al., 2008), regulado por *sly-miR9474-3p*, encerrando assim o ciclo do GABA (Figura 21).

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base em nossos resultados, pudemos concluir que:

- (i) A concentração ótima de GABA para as plantas foi de 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$;
- (ii) As plantas de tomate atingem o pico de absorvância do GABA 12 horas após a aplicação;
- (iii) O GABA pode se acumular no citosol celular mesmo sem aplicação exógena, quando as plantas estão sob estresse;
- (iv) O período de acumulação de GABA pode variar entre espécies e deve levar em consideração o tipo de estresse enfrentado;
- (v) O acúmulo de GABA pode ocorrer com a aplicação exógena mesmo na ausência de estresse nas plantas;
- (vi) As plantas tratadas com GABA mantiveram alta taxa de fotossíntese, mesmo com baixa condutância estomática, resultando em menor perda de água;
- (vii) Plantas tratadas com GABA demonstraram melhoria na Eficiência do Uso da Água (EUA) em condições de estresse;
- (viii) Plantas tratadas com GABA apresentaram maior eficiência instantânea no uso da água (EiUA) em condições de estresse;
- (ix) Não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados pelo analisador de gás infravermelho (IRGA) em plantas cultivadas sob temperatura ótima;
- (x) Houve maior EiUA na segunda aplicação em plantas tratadas com GABA sob condições ideais de crescimento;
- (xi) As plantas controle apresentaram melhor crescimento em condições de estresse em comparação com as plantas tratadas com GABA;
- (xii) Plantas tratadas com GABA mostraram diminuição do crescimento em condições de estresse e um aumento do sistema radicular;
- (xiii) O *Speed Breeding* não afetou o crescimento das plantas de tomate, mas pode estar envolvido na maturação precoce dos frutos;
- (xiv) Plantas controle em temperatura de 35°C apresentaram frutos desidratados e com coloração marrom;
- (xv) Três genes-chave foram identificados na via metabólica do ácido gama-aminobutírico, juntamente com seus possíveis miRNA reguladores.

Os resultados deste estudo indicam que o ácido gama-aminobutírico (GABA) exibiu eficácia ao preservar as taxas fotossintéticas, facilitando o aumento da massa radicular para melhor adaptação em ambientes de estresse térmico, esse ajuste nos parâmetros, promovido pelo GABA, sugere uma estratégia adaptativa benéfica para uma maior absorção de água, favorecendo a transpiração e, por conseguinte, contribuindo para a manutenção da homeostase térmica nas plantas tratadas com GABA.

O papel do GABA também está relacionado na manutenção da integridade dos frutos, visto que o GABA atua como um agente antioxidante, potencializando a atividade de enzimas presentes no sistema antioxidante e reduzindo a formação de EROs. Nesse contexto, seus resultados indicam que o GABA pode ter desempenhado um papel eficaz na preservação do status redox das células dos frutos, atenuando a incidência de necrose nos frutos. Em soma, os dados sugerem que uma segunda aplicação do GABA não é necessária em plantas submetidas a estresse térmico. Essa observação levanta a hipótese de que, nessas condições, o GABA pode estar sendo desviado para outras vias metabólicas.

Essas descobertas têm implicações importantes para estratégias práticas de aplicação de GABA visando otimizar seus benefícios sob condições de estresse térmico em plantas. Além disso, este estudo proporcionou uma compreensão mais aprofundada dos efeitos do ácido gama-aminobutírico (GABA) nas plantas de tomate submetidas a altas temperaturas, assim como das vias relacionadas aos microRNAs. Como perspectiva futura, a identificação dos microRNAs abre caminho para análises mais detalhadas em nível molecular, incluindo avaliações de expressão gênica. Isso permitirá uma manipulação mais precisa das respostas das plantas ao estresse térmico.

Considerando a importância das respostas bioquímicas ao estresse térmico, a próxima fase do trabalho pode envolver análises mais abrangentes para avaliar o impacto dos tratamentos nas características bioquímicas destas plantas. Isso incluiria a avaliação de parâmetros como atividade enzimática, teor de clorofila, acumulação de compostos antioxidantes, peroxidação lipídica, entre outros. A integração dessas abordagens proporcionará uma compreensão mais holística das respostas do tomateiro ao estresse térmico induzido por GABA, fornecendo informações valiosas para estratégias futuras de manejo de culturas em condições adversas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, S. J. et al. Physiological responses of grafted-cucumber leaves and rootstock roots affected by low root temperature. **Scientia horticulturae**, v. 81, n. 4, p. 397–408, 1999.
- AKIHIRO, T. et al. Biochemical mechanism on GABA accumulation during fruit development in tomato. **Plant & cell physiology**, v. 49, n. 9, p. 1378–1389, 2008.
- ALHAITHLOUL, H. A. S. **Impact of combined heat and drought stress on the potential growth responses of the desert grass *Artemisia sieberi alba*: Relation to biochemical and molecular adaptation**, *Plants*. [s.l.: s.n.].
- ALI, S. et al. Approaches in enhancing thermotolerance in plants: An updated review. **Journal of plant growth regulation**, v. 39, n. 1, p. 456–480, 2020.
- AURISANO, N.; BERTANI, A.; REGGIANI, R. Involvement of calcium and calmodulin in protein and amino acid metabolism in rice roots under anoxia. **Giornale botanico italiano (Florence, Italy: 1962)**, v. 129, n. 4, p. 1087–1088, 1995.
- BAPTISTA, J. M. Programa nacional para o uso eficiente da água. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia. v. 212, 2001.
- BARTYZEL, I.; PELCZAR, K.; PASZKOWSKI, A. Functioning of the γ -aminobutyrate pathway in wheat seedlings affected by osmotic stress. **Biologia plantarum**, v. 46, n. 2, p. 221–225, 2003.
- BAUM, G. et al. Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. **The EMBO journal**, v. 15, n. 12, p. 2988–2996, 1996.
- BHATTACHARYA, S. et al. Triheteromeric GluN1/GluN2A/GluN2C NMDARs with unique single-channel properties are the dominant receptor population in cerebellar granule cells. **Neuron**, v. 99, n. 2, p. 315–328.e5, 2018.
- BOUCHÉ, N.; FROMM, H. GABA in plants: just a metabolite? **Trends in plant science**, v. 9, n. 3, p. 110–115, 2004.
- CAMEJO, D. et al. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. **Journal of plant physiology**, v. 162, n. 3, p. 281–289, 2005.
- CARILLO, P. GABA Shunt in Durum Wheat. *Frontiers in plant science*, v. 9, 2018.
- CAO, Y.-Y. et al. Effect of heat stress during meiosis on grain yield of rice cultivars differing in heat tolerance and its physiological mechanism. **Acta agronomica Sinica**, v. 34, n. 12, p. 2134–2142, 2008.
- CHALORCHAROENYING, W. et al. Germination process increases phytochemicals in corn. **Int. Food Res. J.**, v. 24, p. 552–558, 2017.

CHEN, J.-H. et al. Nuclear-encoded synthesis of the D1 subunit of photosystem II increases photosynthetic efficiency and crop yield. **Nature plants**, v. 6, n. 5, p. 570–580, 2020.

CHEN, J.-H. et al. Regulation of Calvin-Benson cycle enzymes under high temperature stress. p. 1–13, 2022.

CHEN, S.-T. et al. Identification of core subunits of photosystem II as action sites of HSP21, which is activated by the GUN5-mediated retrograde pathway in Arabidopsis. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 89, n. 6, p. 1106–1118, 2017.

CHENG, B. et al. The γ -aminobutyric acid (GABA) alleviates salt stress damage during seeds germination of white clover associated with Na^+/K^+ transportation, dehydrins accumulation, and stress-related genes expression in white clover. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 9, p. 2520, 2018.

CHOLEWINSKI AJ, S.; BJ, S. Cold shock-stimulated γ -aminobutyric acid synthesis is mediated by an increase in cytosolic H^+ . **Can J Bot**, v. 75, p. 375–382, 1997.

CLARK, S. M. et al. Subcellular localization and expression of multiple tomato γ -aminobutyrate transaminases that utilize both pyruvate and glyoxylate. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 11, p. 3255–3267, 2009.

CONCENÇO, G. et al. Fotossíntese de biótipos de azevém sob condição de competição. **Planta daninha**, v. 26, n. 3, p. 595–600, 2008.

CRAFTS-BRANDNER, S. J. et al. Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO_2 . **Pro. Natl. Acad. Sci**, v. 97, p. 1773–1780, 2000.

CRAFTS-BRANDNER, S. J.; SALVUCCI, M. E. Sensitivity of photosynthesis in a C_4 plant, maize, to heat stress. **Plant Physiol**, v. 129, p. 1773–1780, 2002.

DAVID-SCHWARTZ, R. et al. Identification of a novel genetically controlled step in mycorrhizal colonization: plant resistance to infection by fungal spores but not extraradical hyphae. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 27, n. 6, p. 561–569, 2001.

DEEWATTHANAWONG, R.; ROWELL, P.; WATKINS, C. B. γ -Aminobutyric acid (GABA) metabolism in CO_2 treated tomatoes. **Postharvest biology and technology**, v. 57, n. 2, p. 97–105, 2010.

DINAR, M.; RUDICH, J. Effect of heat stress on assimilate metabolism in tomato flower buds. **Annals of botany**, v. 56, n. 2, p. 249–257, 1985.

DISTÉFANO, A. M. et al. Heat stress induces ferroptosis-like cell death in plants. **The journal of cell biology**, v. 216, n. 2, p. 463–476, 2017.

DOREMUS, H. D. Organization of the pathway of de novo pyrimidine nucleotide

biosynthesis in pea (*Pisum sativum* L. cv Progress No. 9) leaves. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 250, n. 1, p. 112–119, 1986.

DRIEDONKS, N. J. W. **From flower to fruit in the heat-Reproductive thermotolerance in tomato and its wild relatives(Doctoral dissertation)**. [s.l.: s.n.].

EMBRAPA, 2006. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial/clima.htm>>. Acesso em: 27 nov. 2023.

EYAL E, L. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 112–117, 2002.

FAHAD, S. et al. Crop production under drought and heat stress: Plant responses and management options. **Frontiers in plant science**, v. 8, 2017.

FATMA, M. et al. Methyl jasmonate protects the PS II system by maintaining the stability of chloroplast D1 protein and accelerating enzymatic antioxidants in heat-stressed wheat plants. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 8, p. 1216, 2021.

GALLEGO, P. P. et al. A role for glutamate decarboxylase during tomato ripening: the characterisation of a cDNA encoding a putative glutamate decarboxylase with a calmodulin-binding site. **Plant molecular biology**, v. 27, n. 6, p. 1143–1151, 1995.

GIORNO, F. et al. Developmental and heat stress-regulated expression of HsfA2 and small heat shock proteins in tomato anthers. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 2, p. 453–462, 2010.

GRAMAZIO, P.; TAKAYAMA, M.; EZURA, H. Challenges and prospects of new plant breeding techniques for GABA improvement in crops: Tomato as an example. **Frontiers in plant science**, v. 11, 2020.

GUAN, Q. Heat stress induction of mi R 398 triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in Arabidopsis. **The Plant Journal**, n. 5, p. 840–851, 2013.

GUT, H. et al. A common structural basis for pH- and calmodulin-mediated regulation in plant glutamate decarboxylase. **Journal of molecular biology**, v. 392, n. 2, p. 334–351, 2009.

HALL, A. E. **Crop responses to environment**. [s.l.] CRC Press, 2000.

HAM, T.-H. et al. Γ -aminobutyric acid metabolism in plant under environment stresses. **Korean journal of crop science**, v. 57, n. 2, p. 144–150, 2012.

HANOWER, P.; BRZOZOWSKA, J. Influence d'un choc osmotique sur la composition des feuilles de cotonnier en acides amines libres. **Phytochemistry**, v. 14, n. 8, p. 1691–1694, 1975.

HANSON, P. M.; CHEN, J.-T.; KUO, G. Gene action and heritability of hightemperature fruit set in tomato line CL5915. **HortScience**, v. 37, n. 1, p. 172–175, 2002.

HANUMANTHARAO, B.; NAIR, R. M.; NAYYAR, H. Salinity and high temperature tolerance in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] from a physiological perspective. **Front. Plant Sci**, v. 7, 2016.

HAS, A. Impact of combined heat and drought stress on the potential growth responses of the desert grass *Artemisia sieberi* alba: relation to biochemical and molecular adaptation. **Plan Theory**, v. 8, 2019.

HEDDEN, P. 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases in plants: mechanism and function. **Biochemical Society transactions**, v. 20, n. 2, p. 373–377, 1992.

HILDEBRANDT, T. M. et al. Amino acid catabolism in plants. **Molecular plant**, v. 8, n. 11, p. 1563–1579, 2015.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil**. California Agricultural Experiment Station. [s.l.: s.n.].

HOSMANI, P. S. et al. **An improved de novo assembly and annotation of the tomato reference genome using single-molecule sequencing, Hi-C proximity ligation and optical maps**. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/767764>>.

HU, S.; DING, Y.; ZHU, C. Sensitivity and responses of chloroplasts to heat stress in plants. **Front. Plant Sci**, v. 11, 2020.

IBA, K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. **Annual review of plant biology**, v. 53, n. 1, p. 225–245, 2002.

IQBAL, N. et al. Nitric oxide and hydrogen sulfide coordinately reduce glucose sensitivity and decrease oxidative stress via ascorbate-glutathione cycle in heat-stressed wheat. In: **Triticum aestivum L.) plants. Antioxidants 10**. [s.l.: s.n.].

ISAACSON, T. et al. Cloning of *tangerine* from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants. **The plant cell**, v. 14, n. 2, p. 333–342, 2002.

JAIMEZ, R. E. Seasonal variations in leaf gas exchange of plantain cv. ‘Hartón’ (*Musa AAB*) under different soil water conditions in a humid tropical region. **Scientia Horticulturae**, n. 1, p. 79–89, 2005.

JONES, P. D. et al. Surface air temperature and its changes over the past 150 years. **Reviews of geophysics (Washington, D.C.: 1985)**, v. 37, n. 2, p. 173–199, 1999.

KARAPANOS, I. C. et al. (EDS.). **Tomato pollen respiration in relation to in vitro germination and pollen tube growth under favourable and stress-inducing temperatures**. [s.l.: s.n.].

KATHIRESAN, A. et al. γ -aminobutyric acid promotes stem elongation in *Stellaria longipes*: the role of ethylene. **Plant Growth Regul**, v. 26, p. 131–137, 1998.

KAUR, R. et al. Responses of mungbean (*Vigna radiata* L.) genotypes to heat stress: Effects on reproductive biology, leaf function and yield traits. **Sci. Hortic. (Amsterdam)**, v. 197, p. 527–541, 2015.

KETAO, W. A. N. G. Identification and characterization of microRNA during *Bemisia tabaci* infestations in *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites*. **Horticultural Plant Journal**, n. 2, p. 62–72, 2018.

KHARA, J. Effect of exogenous Gamaaminobutyric acid on physiological tolerance of wheat seedlings exposed to chilling stress. **Iran J Plant Physiol**, v. 3, 2012.

KIM, J. H.; DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. Control of de novo purine biosynthesis genes in ureide-producing legumes: induction of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase gene and characterization of its cDNA from soybean and *Vigna*. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 7, n. 1, p. 77–86, 1995.

KIM, S.-L. et al. Introduction and nutritional evaluation of germinated soy germ. **Food chemistry**, v. 136, n. 2, p. 491–500, 2013.

KINNERSLEY, A. M.; LIN, F. Receptor modifiers indicate that 4-aminobutyric acid (GABA) is a potential modulator of ion transport in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 32, p. 65–76, 2000b.

KINNERSLEY, A. M.; LIN, F. Receptor modifiers indicate that GABA is a potential modulator of ion transport in plants. **Plant Growth Regul**, v. 32, p. 65–76, 2000a.

KLAR, A.E. Evapotranspiração. In: *A água no sistema solo-planta-atmosfera* 2.ed. São Paulo: Nobel, 1984. 408 p.

KOIKE, S. et al. Suppression of γ -aminobutyric acid (GABA) transaminases induces prominent GABA accumulation, dwarfism and infertility in the tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Plant & cell physiology**, v. 54, n. 5, p. 793–807, 2013.

KUMAR, N. et al. GABA mediated reduction of arsenite toxicity in rice seedling through modulation of fatty acids, stress responsive amino acids and polyamines biosynthesis. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 173, p. 15–27, 2019.

KUMAR, R. R. Protection against heat stress in wheat involves change in cell membrane stability, antioxidant enzymes, osmolyte, H₂O₂ and transcript of heat shock protein. **International Journal of Plant Physiology and Biochemistry**, v. 4, n. 4, 2012.

LAKSHMI, G. et al. Exogenously applied plant growth regulator protects rice from heat-induced damage by modulating plant defense mechanism. **J. Crop Sci. Biotechnol**, p. 1–13, 2022.

LAKSHMI, J.; SK, Y. Morpho-physiological and biochemical changes in black gram (*Vigna mungo* L. Hepper genotypes under drought stress at flowering stage). **Acta Physiol Plant**, v. 41, 2019.

LAM, H. M. et al. Use of Arabidopsis mutants and genes to study amide amino-acid biosynthesis. **Plant Cell**, v. 7, p. 887–898, 1995.

LEA, P. J.; ROBINSON, S. A.; STEWART, G. R. The Enzymology and Metabolism of Glutamine, Glutamate, and Asparagine. In: **Intermediary Nitrogen Metabolism**. [s.l.] Elsevier, 1990. p. 121–159.

LI, L. et al. The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development[W]. **The plant cell**, v. 16, n. 1, p. 126–143, 2004.

LI, L. et al. The versatile GABA in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 16, n. 3, p. 1862565, 2021.

LI, R. et al. Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ -aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. **Plant biotechnology journal**, v. 16, n. 2, p. 415–427, 2018.

LI, Z. et al. Metabolic pathways regulated by γ -aminobutyric acid (GABA) contributing to heat tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). **Scientific reports**, v. 6, n. 1, 2016.

LIFSCHITZ, E.; ESHED, Y. Universal florigenic signals triggered by FT homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. **Journal of experimental botany**, v. 57, n. 13, p. 3405–3414, 2006.

LOCY, R. D. et al. The regulation of GABA accumulation by heat stress in Arabidopsis. In: **Plant Tolerance to Abiotic Stresses in Agriculture: Role of Genetic Engineering**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2000. p. 39–52.

LOCY, R. D.; CHERRY, J. H.; SINGH, N. K. The effects of GABA on the growth of Arabidopsis seedlings. **Plant Physiol**, v. 114, 1997.

LOPEZ-GOMOLLON, S. et al. Diverse correlation patterns between microRNAs and their targets during tomato fruit development indicates different modes of microRNA actions. **Planta**, v. 236, n. 6, p. 1875–1887, 2012.

MAHMUD, J. A. et al. γ -aminobutyric acid (GABA) confers chromium stress tolerance in *Brassica juncea* L. by modulating the antioxidant defense and glyoxalase systems. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 26, n. 5, p. 675–690, 2017.

MALEKZADEH, P.; KHARA, J.; HEYDARI, R. Alleviating effects of exogenous Gamma-aminobutyric acid on tomato seedling under chilling stress. **Physiology and molecular biology of plants: an international journal of functional plant biology**, v. 20, n. 1, p. 133–137, 2014.

MANI, A.; SANKARANARAYANAN, K. Heavy metal and mineral element-induced abiotic stress in rice plant. In: **Rice Crop - Current Developments**. [s.l.] InTech, 2018.

MANIVANNAN, P. et al. Growth, biochemical modifications and proline metabolism in

Helianthus annuus L. as induced by drought stress. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 59, n. 2, p. 141–149, 2007.

MATSUKURA, C. et al. Generation of gamma irradiation-induced mutant lines of the miniature tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar “Micro-Tom.” **Plant biotechnology (Tokyo, Japan)**, v. 24, n. 1, p. 39–44, 2007.

MAYER, R. R.; CHERRY, J. H.; RHODES, D. Effects of heat shock on amino Acid metabolism of cowpea cells. **Plant physiology**, v. 94, n. 2, p. 796–810, 1990.

MEI, X. et al. Dual mechanisms regulating glutamate decarboxylases and accumulation of gamma-aminobutyric acid in tea (*Camellia sinensis*) leaves exposed to multiple stresses. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 23685, 2016.

MEISSNER, R. et al. A high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 22, n. 3, p. 265–274, 2000.

MEISSNER, R. et al. A new model system for tomato genetics. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 12, n. 6, p. 1465–1472, 1997.

MESSINGER, S. M.; BUCKLEY, T. N.; MOTT, K. A. Evidence for involvement of photosynthetic processes in the stomatal response to CO₂. **Plant physiology**, v. 140, n. 2, p. 771–778, 2006.

MICHAELI, S. et al. A mitochondrial GABA permease connects the GABA shunt and the TCA cycle, and is essential for normal carbon metabolism. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 67, n. 3, p. 485–498, 2011.

MOLNÁR, A. et al. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1126–1129, 2007.

MUSTAFA, T. et al. Exogenous application of silicon improves the performance of wheat under terminal heat stress by triggering physio-biochemical mechanisms. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 23170, 2021.

NANKISHORE, A.; FARRELL, A. D. The response of contrasting tomato genotypes to combined heat and drought stress. **Journal of plant physiology**, v. 202, p. 75–82, 2016.

NARAYAN, V. S.; NAIR, P. M. Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. **Phytochemistry**, v. 29, n. 2, p. 367–375, 1990.

NAVES-BARBIERO, C. C. et al. Fluxo de seiva e condutância estomática de duas espécies lenhosas sempre-verdes no campo sujo e cerrado. **Revista brasileira de fisiologia vegetal**, v. 12, n. 2, p. 119–134, 2000.

NAYLOR, A. W.; TOLBERT, N. E. Glutamic acid metabolism in green and etiolated barley leaves¹. **Physiologia plantarum**, v. 9, n. 2, p. 220–229, 1956.

NAYYAR, H. et al. Γ -aminobutyric acid (GABA) imparts partial protection from heat

stress injury to rice seedlings by improving leaf turgor and upregulating osmoprotectants and antioxidants. **Journal of plant growth regulation**, v. 33, n. 2, p. 408–419, 2014.

OAKS, A. Nitrogen metabolism in roots. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 36, n. 1, p. 345–365, 1985.

ORI, N. Regulation of LANCEOLATE by miR319 is required for compound- leaf development in tomato. **Nature genetics**, p. 787–791, 2007.

PAN, C. et al. Identification and expression profiling of microRNAs involved in the stigma exertion under high-temperature stress in tomato. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 843, 2017.

PEREIRA-NETTO, A. B. Crescimento e desenvolvimento. In: WACHOWICZ, C. M.; CARVALHO, R. I. N. (Eds.). **Fisiologia vegetal - produção e pós-colheita**. Curitiba: Champagnat: [s.n.]. p. 17–42.

PERES, L. E. P. et al. Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of tomato cultivars and wild related species. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 65, n. 1, p. 37–44, 2001.

PINO, L. E. et al. The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato “Micro-Tom” model system. **Plant methods**, v. 6, n. 1, p. 23, 2010.

PODLEŠÁKOVÁ, K. et al. Phytohormones and polyamines regulate plant stress responses by altering GABA pathway. **New biotechnology**, v. 48, p. 53–65, 2019.

POLLASTRI, S. et al. Chloroplast calcium signalling regulates thermomemory. **J. Plant Physiol**, v. 264, 2021.

PRIYA, M. et al. GABA (γ -aminobutyric acid), as a thermo-protectant, to improve the reproductive function of heat-stressed mungbean plants. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 7788, 2019.

RADFORD, P. J. Growth Analysis formulae - their use and abuse¹. **Crop science**, v. 7, n. 3, p. 171–175, 1967.

RAJA, M. M. et al. Pollen development and function under heat stress: from effects to responses. **Acta physiologiae plantarum**, v. 41, n. 4, 2019.

RAMOS-RUIZ, R.; MARTINEZ, F.; KNAUF-BEITER, G. The effects of GABA in plants. **Cogent food & agriculture**, v. 5, n. 1, p. 1670553, 2019.

RAMPUTH, A. I.; BOWN, A. W. Rapid γ -aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of oblique-banded leaf-roller larvae. **Plant Physiol**, v. 111, p. 1349–1352, 1996.

REDDY, K. R. Triagem de espécies de Capsicum de diferentes origens para tolerância a altas temperaturas por germinação de pólen in vitro e comprimento do tubo polínico. **Sci. Hortico**, v. 112, n. 2, p. 130–135, 2007.

ROBERTS, M. R. Does GABA act as a signal in plants? Hints from molecular studies: hints from molecular studies. **Plant Signaling Behavior**, v. 2, p. 408–409, 2007.

RODRIGUEZ, I. M. et al. Fine-tuning the CROPGRO-Sunflower model and its application to the quantification of crop responses to environmental and management variables. **Field crops research**, v. 300, n. 108986, p. 108986, 2023.

SANDERS, D.; BROWNLEE, C.; HARPER, J. F. Communicating with calcium. **The plant cell**, v. 11, n. 4, p. 691–706, 1999.

SCAFARO, A. P. et al. Heat tolerance in a wild *Oryza* species is attributed to maintenance of Rubisco activation by a thermally stable Rubisco activase ortholog. **The new phytologist**, v. 211, n. 3, p. 899–911, 2016.

SCHOFFL, F.; PRANDL, R.; REINDL, A. Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants. In: SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (Eds.). **R.G. Landes Co.** [s.l: s.n.]. p. 81–98.

SCOTT JW, H. Micro-Tom. A miniature dwarf tomato. **Florida Agricultural Experimental Station Circular S**, v. 370, p. 1–6, 1989.

SEHGAL, A. et al. Drought or/and heat-stress effects on seed filling in food crops: Impacts on functional biochemistry, seed yields, and nutritional quality. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1705, 2018.

SEIFIKALHOR, M. et al. γ -Aminobutyric acid confers cadmium tolerance in maize plants by concerted regulation of polyamine metabolism and antioxidant defense systems. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 3356, 2020.

SHARMA A, W. et al. Melatonin regulates the functional components of photosynthesis, antioxidant system, gene expression, and metabolic pathways to induce drought resistance in grafted *Carya cathayensis* plants. **Sci Total Environ**, v. 713, 2020.

SHELP, B. J. et al. Strategies and tools for studying the metabolism and function of γ -aminobutyrate in plants. I. Pathway structure. **Botany**, v. 90, n. 8, p. 651–668, 2012.

SHELP, B. J.; BOWN, A. W.; ZAREI, A. 4-Aminobutyrate (GABA): a metabolite and signal with practical significance. **Botany**, v. 95, n. 11, p. 1015–1032, 2017.

SHELP, B. J.; MULLEN, R. T.; WALLER, J. C. Compartmentation of GABA metabolism raises intriguing questions. **Trends in plant science**, v. 17, n. 2, p. 57–59, 2012.

SHIMAJIRI, Y. et al. Differential subcellular localization, enzymatic properties and expression patterns of γ -aminobutyric acid transaminases (GABA-Ts) in rice (*Oryza sativa*). **Journal of plant physiology**, v. 170, n. 2, p. 196–201, 2013.

SHUSEI SATO, SATOSHI TABATA, HIDEKI HIRAKAWA, ERIKA ASAMIZU, KENTA SHIRASAWA, SACHIKO ISOBE, TAKAKAZU KANEKO, YASUKAZU NAKAMURA, DAISUKE SHIBATA, KOH AOKI, SHUSEI SATO & SATOSHI

TABATA. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature**, v. 485, n. 7400, p. 635–641, 2012.

SIGNORELLI, S. et al. Connecting proline and γ -aminobutyric acid in stressed plants through non-enzymatic reactions. **PLoS one**, v. 10, n. 3, p. e0115349, 2015.

SIMPSON, J. P. et al. Identification and characterization of a plastid-localized Arabidopsis glyoxylate reductase isoform: comparison with a cytosolic isoform and implications for cellular redox homeostasis and aldehyde detoxification. **Journal of experimental botany**, v. 59, n. 9, p. 2545–2554, 2008.

SINGH, A. K. et al. Debilitation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) as result of heat stress. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 6, p. 1917–1922, 2017.

SITA, K.; KUMAR, V. Role of Gamma Amino Butyric Acid (GABA) against abiotic stress tolerance in legumes: a review. **Plant Physiology Reports**, v. 25, n. 4, p. 654–663, 2020.

SNEDDEN, W. A. et al. Activation of a recombinant petunia glutamate decarboxylase by calcium/calmodulin or by a monoclonal antibody which recognizes the calmodulin binding domain. **The journal of biological chemistry**, v. 271, n. 8, p. 4148–4153, 1996.

SNEDDEN, W. A. et al. Calcium/calmodulin activation of soybean glutamate decarboxylase. **Plant physiology**, v. 108, n. 2, p. 543–549, 1995.

SOLIMAN MH, A.; EL KELISH AA, A.-E. Acetylsalicylic acid enhance tolerance of *Phaseolus vulgaris* L. to chilling stress, improving photosynthesis, antioxidants and expression of cold stress responsive genes. **Bot Stud**, v. 59, n. 1, 2018.

SOLIMAN, M. et al. Exogenous nitric oxide mitigates nickel-induced oxidative damage in eggplant by upregulating antioxidants, osmolyte metabolism, and glyoxalase systems. **Plants**, v. 8, n. 12, p. 562, 2019.

SONG, H. et al. Exogenous γ -aminobutyric acid alleviates oxidative damage caused by aluminium and proton stresses on barley seedlings. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 9, p. 1410–1416, 2010.

STAINFORTH, D. A. et al. Incerteza nas previsões da resposta climática aos níveis crescentes de gases de efeito estufa. **Natureza**, v. 433, n. 7024, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal 3.ed. São Paulo: Artmed, 2004. 719 p.

TAKAYAMA, M. et al. Tomato glutamate decarboxylase genes *SIGAD2* and *SIGAD3* play key roles in regulating γ -aminobutyric acid levels in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Plant & cell physiology**, v. 56, n. 8, p. 1533–1545, 2015.

TEMPLE, S. J.; VANCE, C. P.; STEPHEN GANTT, J. Glutamate synthase and nitrogen assimilation. **Trends in plant science**, v. 3, n. 2, p. 51–56, 1998.

TENORIO, F. A. Screening rice genetic resources for heat tolerance. **SABRAO Journal**

of **Breeding and Genetics**, v. 45, p. 371–381, 2013.

THOMPSON, J. F.; POLLARD, J. K.; STEWARD, F. C. Investigations of nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. Iii. Gamma-aminobutyric acid in plants, with special reference to the potato tuber and a new procedure for isolating amino acids other than alpha-amino acids. **Plant physiology**, v. 28, n. 3, p. 401–414, 1953.

TIEMAN, D. M. et al. Members of the tomato *LeEIL* (*EIN3-like*) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 26, n. 1, p. 47–58, 2001.

TREWAVAS, A.; KNIGHT, M. Mechanical signalling, calcium and plant form. **Plant molecular biology**, v. 26, n. 5, p. 1329–1341, 1994.

TROBACHER, C. P. et al. Catabolism of GABA in apple fruit: Subcellular localization and biochemical characterization of two γ -aminobutyrate transaminases. **Postharvest biology and technology**, v. 75, p. 106–113, 2013.

ULLAH, A. et al. Heat stress effects on the reproductive physiology and yield of wheat. **Journal of agronomy and crop science**, v. 208, n. 1, p. 1–17, 2022.

VAN CAUWENBERGHE, O. R. et al. Plant pyruvate-dependent gamma-aminobutyrate transaminase: identification of an *Arabidopsis* cDNA and its expression in *Escherichia coli*. **Canadian journal of botany. Journal canadien de botanique**, v. 80, n. 9, p. 933–941, 2002.

VAN CAUWENBERGHE, O. R.; SHELP, B. J. Biochemical characterization of partially purified gaba:pyruvate transaminase from *Nicotiana tabacum*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 4, p. 575–581, 1999.

VIJAYAKUMARI, K.; PUTHUR, J. T. γ -Aminobutyric acid (GABA) priming enhances the osmotic stress tolerance in *Piper nigrum* Linn. plants subjected to PEG-induced stress. **Plant growth regulation**, v. 78, n. 1, p. 57–67, 2016.

VILJEVAC, V. M. et al. **Physiological Response to Short-Term Heat Stress in the Leaves of Traditional and Modern Plum (*Prunus domestica* L.) Cultivars. Horticulturae** 8. [s.l: s.n.].

VOGG, G. et al. Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid -ketoacyl-CoA synthase. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 401, p. 1401–1410, 2004.

VOINNET, O. Origin, biogenesis, and activity of plant MicroRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 669–687, 2009.

VON WETTSTEIN, D.; GOUGH, S.; KANNANGARA, C. G. Chlorophyll Biosynthesis. **The plant cell**, v. 7, n. 7, p. 1039, 1995.

- WAHID, A. et al. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and experimental botany**, v. 61, n. 3, p. 199–223, 2007.
- WALLACE, W.; SECOR, J.; SCHRADER, L. E. Rapid accumulation of γ -aminobutyric acid and alanine in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness, or mechanical manipulation. **Plant physiology**, v. 75, n. 1, p. 170–175, 1984.
- WANG, H. et al. The tomato *Aux/IAA* transcription factor *IAA9* is involved in fruit development and leaf morphogenesis. **The plant cell**, v. 17, n. 10, p. 2676–2692, 2005.
- WANG, Q.-L. et al. Metabolic reprogramming in chloroplasts under heat stress in plants. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 3, p. 849, 2018.
- WANG, X. et al. Heat-responsive photosynthetic and signaling pathways in plants: Insight from proteomics. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 10, p. 2191, 2017a.
- WANG, Y. et al. Γ -Aminobutyric acid imparts partial protection from salt stress injury to maize seedlings by improving photosynthesis and upregulating osmoprotectants and antioxidants. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 2017b.
- WATSON, A. et al. Speed breeding is a powerful tool to accelerate crop research and breeding. **Nature plants**, v. 4, n. 1, p. 23–29, 2018.
- XU, J. et al. Heat stress affects vegetative and reproductive performance and trait correlations in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Euphytica; Netherlands journal of plant breeding**, v. 213, n. 7, 2017.
- YAMAGUCHI, S. Basic properties of umami and effects on humans. **Physiology & behavior**, v. 49, n. 5, p. 833–841, 1991.
- YANG, A. et al. γ -Aminobutyric acid treatment reduces chilling injury and activates the defence response of peach fruit. **Food chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1619–1622, 2011.
- YANG, R.; YIN, Y.; GU, Z. Polyamine degradation pathway regulating growth and GABA accumulation in germinating fava bean under hypoxia- NaCl stress. **J. Agric. Sci. Technol**, v. 17, p. 311–320, 2015.
- YONG, B. et al. Exogenous application of GABA improves PEG-induced drought tolerance positively associated with GABA-shunt, polyamines, and proline metabolism in white clover. **Frontiers in physiology**, v. 8, 2017.
- YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. **Photosynthetica**, v. 38, n. 2, p. 171–186, 2000.
- ZHAO, Q. et al. Relationship of ROS accumulation and superoxide dismutase isozymes in developing anther with floret fertility of rice under heat stress. **Plant physiology and biochemistry**, v. 122, p. 90–101, 2018.

