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

**Caracterização eletrofisiológica em girassol: cinética, rotas de propagação,
trocas gasosas e fluorescência da clorofila**

Diogo Capelin

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

**Piracicaba
2016**

Diogo Capelin
Engenheiro Agrônomo

Caracterização eletrofisiológica em girassol: cinética, rotas de propagação, trocas gasosas e fluorescência da clorofila

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Capelin, Diogo

Caracterização eletrofisiológica em girassol: cinética, rotas de propagação, trocas gasosas e fluorescência da clorofila / Diogo Capelin. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
83 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Sinalização elétrica 2. Potencial de variação 3. Potencial de ação 4. Fotossíntese
I. Título

CDD 633.39
C238c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

“Aos meus pais Lauri e Maria” e
“A todos que não dispõem das mesmas oportunidades”

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de aprendizado, por permitir a superação dos obstáculos que agora são degraus do meu amadurecimento. E, em especial, por permitir meu convívio com as pessoas especiais que me cercam.

Ao meu orientador Prof. Ricardo Ferraz de Oliveira, pela oportunidade de convívio e crescimento, pela amizade, pelos esforços para tornar possível a realização deste trabalho, por criar possibilidades de minha construção como ser humano e profissional, pelos ensinamentos de vida e pelo exemplo de competência científica. Muito aprendi com seus ensinamentos, e muito mais com seu exemplo.

Aos meus pais Lauri e Maria pelo amor incondicional, pelo incentivo sem medida, pelo exemplo incansável de superação e persistência, e por cultivar meus sonhos. Saibam que simples palavras não podem expressar minha real gratidão para com vocês.

À minha irmã Karine, que mesmo distante sempre esteve ao meu lado compartilhando os momentos bons e difíceis, me dando apoio, força e carinho.

A minha noiva Dayanne Fabrício Bressan, pelo incentivo e compreensão, pelo amor, pelo carinho, por ser esta pessoa sem igual e pelo simples fato de fazer parte de minha vida.

Aos meus familiares Ricardo, Glauber, Jairo e Cleusa pelo carinho, amizade, apoio e disponibilidade a ajudar nesta caminhada, mesmo estando distantes.

Aos amigos do laboratório Gabriel Daneluzzi, Francynês Macedo, Natalia Salib, Fábila Barbosa, Aécio Mendes, Lucas Riboldi, Karina Lima Reis e Marina Gentil, pelo apoio, amizade, entusiasmo e pelos muitos bons momentos que dividimos. Lembrem-se, que mesmo que nos tornemos distantes nossa amizade ficará gravada em minha memória.

Aos amigos de Botucatu Prof. Fernando Broetto, Edilson Gomes, Enrique Zuñiga, Luzmaria Machuca, Marcos Bettini, Renata Coscolin, Ricardo Favan e Érica Barros pela amizade e pelos bons momentos de descontração que dividimos.

Aos funcionários e amigos LEPSE José Francisco Rodrigues, Francisco Vitti e Robson Couto, pela disponibilidade em ajudar.

A secretária do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas Maria Solizete Graziol Silva, pela sua prontidão em nos auxiliar em momentos de necessidade.

E a todos aqueles que me apoiaram aqui não citados, porém não menos importantes, o meu muito obrigado!

Aos demais membros da banca

A ESALQ

A CAPES

Muito Obrigado!

*“Ciência é o caminho para chegarmos à essência das coisas e dos fenômenos
com objetivo de esclarecer os elementos comprovados
que são interpretados por meio de leis invioláveis da lógica”
“Niels Bohr”*

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	21
LISTA DE SIGLAS.....	23
1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Relevância da sinalização elétrica em plantas	26
1.2 Importância do estudo da sinalização elétrica em plantas	26
1.3 Importância da investigação dos efeitos da sinalização elétrica a fotossíntese	27
1.4 Justificativa do problema de pesquisa e objetivos	28
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 Tipos de sinais elétricos em plantas: cinética e rotas de propagação	29
2.2 Sinalizações elétrica e trocas gasosas em plantas.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Material vegetal e condições experimentais	35
3.2 Delineamento experimental e tratamentos	36
3.3 Sistema de captura dos sinais elétricos: Estímulo e medições	37
3.4 Medições de trocas gasosas e fluorescência da clorofila.....	39
4 RESULTADO E DISCUSSÃO	43
4.1 Caracterização eletrofisiológica dos sinais elétricos: cinética e rotas de propagação	43
4.2 Sinais elétricos e trocas gasosas em girassol	54
4.3 Sinais elétricos e fluorescência da clorofila em girassol	63
5 CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS	79

RESUMO

Caracterização eletrofisiológica em girassol: cinética, rotas de propagação, trocas gasosas e fluorescência da clorofila

Esta tese refere-se a pesquisa cujo o principal objetivo foi estudar os efeitos da sinalização elétrica sobre parâmetros fisiológicos de trocas gasosas e fluorescência da clorofila, bem como caracterizar e identificar rotas de propagação de sinais elétricos desencadeados por estímulos de queima em plantas de girassol. Os resultados obtidos a partir deste estudo demonstram que os sinais elétricos desencadeados por estímulo de queima podem ser classificados como potenciais de variação (PV). Estes sinais apresentaram maior facilidade de propagação no eixo vertical da planta atingindo folhas intactas que provavelmente possuem conexão vascular com a folha de estímulo. Apresentaram maior número de eventos de propagação na direção acrópeta da planta e foram incapazes de propagar-se lateralmente não atingindo folhas opostas à de estímulo. Nas folhas opostas onde não houve propagação de PVs foi registrada a ocorrência de hiperpolarização de membranas característica de potencial sistêmico (PS). Quanto aos efeitos fisiológicos do PV, observou-se que este promoveu redução na assimilação líquida de CO_2 (A) que provavelmente está relacionada a inativação da fase não fotoquímica da fotossíntese, uma vez que, esteve acompanhada de queda da dissipação fotoquímica dos fotossistemas (q_P) e da taxa de transporte de elétrons (ETR). Embora tenha sido registrada alterações na condutância estomática (g_s), na concentração intercelular de CO_2 (C_i), elevação da dissipação não fotoquímica (q_N) e queda na eficiência quântica efetiva do fotossistema II (Φ_{FSII}), estes não foram responsáveis pela queda de A , uma vez que, foram registrados posteriormente a sua redução.

Palavras-chave: Sinalização elétrica; Potencial de variação; Potencial de ação; Fotossíntese

ABSTRACT

Sunflower electrophysiological characterization: kinetic, propagation routes, gas exchange and chlorophyll fluorescence

This thesis mainly aimed to study the effects of electrical signaling on physiological parameters of gas exchange and chlorophyll fluorescence, and to characterize and identify route propagation of electrical signals triggered by burning stimuli in sunflower plants. The results from this study demonstrate that the electrical signals triggered by burning stimulus can be classified as variation potentials (VP). These signals showed greater ease of propagation in the vertical axis of the plant, reaching intact leaves that are likely to have vascular connection with the stimulus leaf. They presented greater ease of propagation in acropetal direction of the plant and are unable to spread laterally, not reaching leaves opposed to the stimulus. On opposed leaves, where there was no VPs propagation, it was recorded the occurrence of membrane hyperpolarization of systemic potential (PS). Concerning the physiological effects of PV, it was observed that this promoted a reduction in the liquid CO₂ assimilation (A) which is probably related to the inactivation of non-photochemical phase of the photosynthesis, since it was accompanied by the decrease of the photochemical dissipation of the photosystems (q_P) and the electron transport rate (ETR). Although changes were recorded in stomatal conductance (g_s), CO₂ intercellular concentration (C_i), increase of non-photochemical dissipation (q_N) and a decrease in the effective quantum efficiency of the photosystem II (Φ_{FSII}) were not responsible for the A fall, since its reduction was subsequently reported.

Keywords: Electrical signaling; Potential variation; Action potential; Photosynthesis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Posicionamento dos tratamentos que definem as folhas de estímulo em relação a folha de medidas em plantas de girassol36
- Figura 2 - Gaiola de Faraday equipadas com painéis de led azuis e vermelhos utilizada para avaliações de sinais elétricos, trocas gasosas e fluorescência da clorofila a.....37
- Figura 3 - Face abaxial de folhas de girassol. A - Posicionamento dos eletrodos de medida do sinal elétrico e câmara de medida do IRGA posicionada na folha de medidas. B – Posicionamento dos eletrodos de medida de sinais elétricos na folha de medidas. (E2) eletrodo canal 2, (E3) eletrodo do canal 3, (E4) eletrodo do canal39
- Figura 4 – Medições de trocas gasosas, fluorescência da clorofila a e sinais elétricos em plantas de girassol40
- Figura 5 - Variação do potencial de membrana extracelular (mV) em folhas de girassol, desencadeados após estímulo por queima. E1: eletrodo posicionado no pecíolo da folha de estímulo; E2: eletrodo posicionado no pecíolo da folha de medida; E3: eletrodo posicionado na nervura central da folha de medida e E4: eletrodo posicionado na nervura secundária da folha de medida (FPAC)44
- Figura 6 - Variação do potencial de membrana (mV) em folhas de girassol, desencadeados após estímulo por queima. Ocorrência de hiperpolarização de membranas nos tratamentos FOMP, FPAB e FPAC. E1: eletrodo posicionado no pecíolo da folha de estímulo; E2: eletrodo posicionado no pecíolo da folha de medida; E3: eletrodo posicionado na nervura central da folha de medida e E4: eletrodo posicionado na nervura secundária da folha de medida47
- Figura 7 - Variação típica do potencial de membrana de plantas de girassol em função da aplicação de estímulo de queima em folhas posicionadas no mesmo lado abaixo da folha de medida (FMLAB). E 1: eletrodo posicionado no pecíolo da folha de estímulo; E 2, E 3 e E 4 eletrodos posicionados no pecíolo, nervura principal e nervura secundária da folha de medida respectivamente. (A) estímulo em E 1 com propagação de PV para E 2, E3 e E4. (B) Estímulo em E 1 sem propagação de sinal para E 2, E3 e E4.....49

- Figura 8 - Variação típica do potencial de membrana de plantas de girassol em função da aplicação de estímulo de queima em folhas opostas de mesmo par a folha de medida (FOMP). E 1: eletrodo posicionado no pecíolo da folha de estímulo; E 2, E 3 e E 4 eletrodos posicionados no pecíolo, nervura principal e nervura secundária da folha de medida respectivamente. (A) estímulo em E 1 com propagação de PV para E 2, E3 e E4. (B) estímulo em E 1 sem propagação de sinal para E 2, E3 e E4 50
- Figura 9 - Variação típica do potencial de membrana de plantas de girassol em função da aplicação de estímulo de queima em folhas posicionadas no mesmo lado abaixo da folha de medida (FPAB). E 1: eletrodo posicionado no pecíolo da folha de estímulo; E 2, E 3 e E 4 eletrodos posicionados no pecíolo, nervura principal e nervura secundária da folha de medida respectivamente. (A) estímulo em E 1 com propagação de PV para E 2, E3 e E4. (B) estímulo em E 1 sem propagação de sinal para E 2, E3 e E4 51
- Figura 10 - Variação típica do potencial de membrana de plantas de girassol em função da aplicação de estímulo de queima em folhas posicionadas no mesmo lado abaixo da folha de medida (FPAC). E 1: eletrodo posicionado no pecíolo da folha de estímulo; E 2, E 3 e E 4 eletrodos posicionados no pecíolo, nervura principal e nervura secundária da folha de medida respectivamente. (A) estímulo em E 1 com propagação de PV para E 2, E3 e E4. (B) estímulo em E 1 sem propagação de sinal para E 2, E3 e E4 52
- Figura 11 - Variação típica do potencial de membrana de plantas de girassol em função da aplicação de estímulo de queima em folhas posicionadas no mesmo lado abaixo da folha de medida (FMLAC). E 1: eletrodo posicionado no pecíolo da folha de estímulo; E 2, E 3 e E 4 eletrodos posicionados no pecíolo, nervura principal e nervura secundária da folha de medida respectivamente. (A) estímulo em E 1 com propagação de PV para E 2, E3 e E4. (B) estímulo em E 1 sem propagação de sinal para E 2, E3 e E4 53
- Figura 12 - Variação da assimilação líquida de CO₂ (A), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO₂ (C_i), e transpiração (E) em folhas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha de mesmo lado abaixo da folha de medida (FMLAB)..... 56

- Figura 13 - Variação da assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO_2 (C_i), e transpiração (E) em folhas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha perpendicular abaixo da folha de medida (FPAB)57
- Figura 14 - Variação da assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO_2 (C_i), e transpiração (E) em folhas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha de mesmo lado acima da folha de medida (FMLAC)58
- Figura 15 - Variação da assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO_2 (C_i), e transpiração (E) em folhas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha perpendicular acima da folha de medida (FPAC)59
- Figura 16 - Variação da assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO_2 (C_i), e transpiração (E) em folhas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha oposta de mesmo par da folha de medida (FOMP)60
- Figura 17 - Alterações nas variáveis de trocas gasosas em função da propagação de sinais elétricos em plantas de girassol. A: variação da assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s) em função da propagação de sinais elétricos em E1- eletrodo do pecíolo da folha de estímulo, E3- eletrodo da nervura central da folha de medidas. B: variação do CO_2 intercelular (C_i), e taxa de transpiração (E). As setas pretas apontam o momento da aplicação do estímulo61
- Figura 18 - Variação da assimilação taxa de transporte de elétrons (ΔETR), variação da dissipação fotoquímica (Δq_p); variação da dissipação não fotoquímica (Δq_n), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{FSII}) em plantas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha de mesmo lado abaixo da folha de medida (FMLAB)66
- Figura 19 - Variação da taxa de transporte de elétrons (ΔETR), variação da dissipação fotoquímica (Δq_p); variação da dissipação não fotoquímica (Δq_n), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{FSII}) em plantas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha perpendicular abaixo da folha de medida (FPAB).....67

- Figura 20 - Variação da assimilação taxa de transporte de elétrons (ΔETR), variação da dissipação fotoquímica (Δq_p); variação da dissipação não fotoquímica (Δq_N), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{FSII}) em plantas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha oposta e de mesmo par da folha de medida (FOMP)..... 68
- Figura 21 - Variação da assimilação taxa de transporte de elétrons (ΔETR), variação da dissipação fotoquímica (Δq_p); variação da dissipação não fotoquímica (Δq_N), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{FSII}) em plantas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha de mesmo lado acima da folha de medida (FMLAC)..... 69
- Figura 22 - Variação da assimilação taxa de transporte de elétrons (ΔETR), variação da dissipação fotoquímica (Δq_p); variação da dissipação não fotoquímica (Δq_N), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{FSII}) em plantas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha perpendicular acima da folha de medida (FPAC)..... 70
- Figura 23 - Variação da assimilação líquida de CO_2 (ΔA) e na dissipação não fotoquímica dos fotossistemas (Δq_N) em função da propagação de sinais elétricos em plantas de girassol. E1- eletrodo do pecíolo da folha de estímulo, E3- eletrodo da nervura central da folha de medidas. As setas pretas apontam o momento da aplicação do estímulo..... 72
- Figura 24 - Variação da assimilação líquida de CO_2 (ΔA) e n rendimento quântico do fotossistema II ($\Delta \Phi_{FSII}$) em função da propagação de sinais elétricos em plantas de girassol. E1- eletrodo do pecíolo da folha de estímulo, E3- eletrodo da nervura central da folha de medidas. As setas pretas apontam o momento da aplicação do estímulo..... 72
- Figura 25 - Variação da assimilação líquida de CO_2 (ΔA) e na taxa e transporte de elétrons (ΔETR) em função da propagação de sinais elétricos em plantas de girassol. E1- eletrodo do pecíolo da folha de estímulo E3- eletrodo da nervura central da folha de medidas. As setas pretas apontam o momento da aplicação do estímulo 73
- Figura 26 - Variação da assimilação líquida de CO_2 (ΔA) e da dissipação fotoquímica dos fotossistemas (Δq_p) em função da propagação de sinais elétricos em plantas de girassol. E1- eletrodo do pecíolo da folha de estímulo, E3- eletrodo da nervura

central da folha de medidas. As setas pretas apontam o momento da aplicação do estímulo 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fontes de nutrientes utilizadas na solução nutritiva.....	35
Tabela 2 - Composição química do fertilizante Miracle-Gro®.....	35
Tabela 3 - Variações do potencial de membrana e propagação de sinais elétricos em tecidos de girassol desencadeados por estímulo de queima	45
Tabela 4 - Número de eventos de propagação de sinal elétrico em plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i>) desencadeado por estímulo de queima	49
Tabela 5 - Atenuação da amplitude dos sinais elétricos gerados na folha de estímulo (E1) e propagados para o pecíolo da folha de medidas (E2), em função das diferentes posições da folha de estímulo em relação a folha de medidas. E correlação da distancias entre E1 e E2 e a porcentagem de atenuação da amplitude.....	53
Tabela 6- Número de eventos de propagação de sinais elétricos e de ocorrência de alteração em parâmetros das trocas gasosas em plantas de girassol submetidas a estímulo de queima	55
Tabela 7 - Parâmetros da fluorescência da clorofila determinados anteriormente ao estímulo após adaptação ao escuro por 40 minutos. F_o : fluorescência inicial; F_m : fluorescência máxima; F_v : fluorescência variável e F_v/F_m : rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m)	64
Tabela 8 - Variação dos parâmetros da fluorescência da clorofila após a aplicação do estímulo de queima em em folhas de girassol adaptadas a luz. Φ_{FSII} : rendimento quântico efetivo do fotossistema II; q_p : dissipação fotoquímica; q_N : dissipação não fotoquímica; ETR: taxa de transporte de elétrons. Amplitude do PV registrado no pecíolo da folha de medidas. Min: tempo em minutos após a aplicação do estímulo	71

LISTA DE SIGLAS

<i>A</i>	Assimilação líquida de CO ₂
AgCl	Cloreto de prata
E 1	Eletrodo do canal 1
E 2	Eletrodo do canal 2
E 3	Eletrodo do canal 3
E 4	Eletrodo do canal 4
<i>C_i</i>	Concentração intercelular de CO ₂
<i>E</i>	Taxa transpiratória
<i>ETR</i>	Taxa de transporte de elétrons
<i>F_m</i>	Fluorescência máxima da clorofila adaptada ao escuro
<i>F_m'</i>	Fluorescência máxima da clorofila adaptada a luz
FMLAB	Folha de mesmo e lado abaixo
FMLAC	Folha de mesmo lado e acima
<i>F_o</i>	Fluorescência mínima da clorofila adaptada ao escuro
<i>F_o'</i>	Fluorescência mínima da clorofila adaptada a luz
FOMP	Folha oposta e de mesmo par
FPAB	Folha perpendicular e abaixo adaptada ao escuro
FPAC	Folha perpendicular e acima adaptada ao escuro
FSII	Fotossistema II
<i>F_v</i>	Fluorescência variável
<i>F_v'</i>	Fluorescência variável adaptada a luz
<i>F_v/F_m</i>	Eficiência quântica potencial do fotossistema II
<i>F_v'/F_m'</i>	Eficiência quântica efetiva do fotossistema II
<i>g_m</i>	Condutância mesofílica
<i>g_s</i>	Condutância estomática ao vapor de água
IRGA	Infra-red gas analyzer
KCl	Cloreto de potássio
LEPSE	Laboratório de estudos de plantas sob estresse
mV	Milivolts
mΩ	Miliohm
PA	Potencial de ação
PS	Potencial sistêmico
PV	Potencial de variação
Qa	Quinona “a”
<i>q_N</i>	Dissipação não fotoquímica
<i>q_P</i>	Dissipação fotoquímica
Φ_{FSII}	Eficiência quântica potencial do fotossistema II

1 INTRODUÇÃO

A sobrevivência das plantas depende de como elas conseguem se adaptar as mudanças do ambiente ao seu redor. As plantas são capazes de responder a alterações de luminosidade e temperatura, disponibilidade de água e nutrientes, ataque de patógenos ou herbívoros, e estabelecer elaboradas relações nos eventos de simbiose (BRENNER et al., 2006).

Estes eventos, estressantes ou não, raramente ocorrem individualmente, e podem resultar em uma integrada cascata de sinalização (HUBER; BAUERLE, 2016), que precisa ocorrer célula a célula ou percorrer distâncias maiores sinalizando partes distantes da planta (BRENNER et al., 2006).

São considerados três tipos de sinalização de longas distância que permitem a planta reagir rapidamente e lidar adequadamente com o estresse imposto pelo ambiente: o hidráulico, o químico, e o elétrico. Estes diferentes sinais diferem não somente em sua natureza, mas também na sua velocidade de propagação (HUBER; BAUERLE, 2016).

Com maior volume de estudo, os sinais químicos e hidráulicos frequentemente são associadas ao controle de diversos processos nos vegetais (DAVIES, 2000; TARDIEU; DAVIES, 1993; CHRISTMANN et al., 2007). Entretanto, muitas respostas fisiológicas não são satisfatoriamente explicadas por estes dois tipos de sinalização.

A geração e propagação de sinais elétricos é um fenômeno bastante conhecido em organismos vivos. Entretanto, por muitos anos a importância fisiológica da sinalização elétrica em plantas foi negligenciada, mesmo os primeiros registros deste fenômeno tendo sido observados por Burdon-Sanderson em 1873 (KRÓL; DZIUBINKA; TREBACZ, 2010).

As propriedades elétricas dos organismos vivos originam-se da seletividade da membrana que cerca cada célula, o que torna a condução de eletricidade ou sinais elétricos uma característica inerente aos seres vivos.

A sinalização elétrica permite transmitir informações através de longas distâncias mais rapidamente do que sinais químicos (TREBACZ; DZIUBINSKA; KROL, 2006). Para Fromm e Lautner (2007) esta é uma das formas mais básicas de transmissão de informações em células vegetais que desempenha papel importante nas respostas das plantas a estresses (DAVIES, 2004).

Estudos recentes estão demonstrando que diferentes estímulos ambientais desencadeiam respostas específicas em células, gerando sinais elétricos que se propagam e são respondidos em regiões distantes a do estímulo (LAUTNER et al., 2005). Em contraste com a sinalização química, sinais elétricos são capazes de transmitir rapidamente informações

a longas distâncias promovendo numerosos efeitos fisiológicos que vem sendo elucidados nas duas últimas décadas (FROMM, 2006; TREBACZ; DZIUBINSKA; KROL, 2006). Segundo Fromm e Lautner (2007) esse tipo de transmissão rápida de sinais entre as células vivas está revelando-se essencial para as plantas.

1.1 Relevância da sinalização elétrica em plantas

As plantas, como organismos sensíveis ao ambiente, realizam um monitoramento contínuo na tentativa de identificar e lidar com as alterações que ocorrem constantemente no ambiente. Neste processo, um intrincado e complexo sistema de comunicação interliga, não somente diferentes órgãos ou células, mas também atua a nível ecológico, permitindo a interação da planta com outros organismos, sejam eles simbiotes ou patogênicos (BALUŠKA; MANCUSO, 2009). Como organismos sésseis inseridos neste sistema, em muitas ocasiões danoso, as plantas precisam rapidamente responder as mudanças que ocorrem. A sinalização elétrica insere-se neste contexto, como um dos primeiros eventos promovidos por estímulos do ambiente, que pode desencadear uma série respostas locais e a longa distância, como o objetivo de manter o equilíbrio do sistema (YAN et al., 2009).

Os fatores estressantes, aos quais as plantas são submetidas no ambiente provocam respostas específicas em células que são capazes de transmitir um sinal elétrico característico para regiões distantes onde este sinal desencadeará uma série de respostas (LAUTNER et al., 2005; FROMM; LAUTNER, 2007). Em comparação aos sinais químicos, como hormônios, os sinais elétricos são mais velozes, transmitindo rapidamente informação em longas distâncias (HUBER; BAUERLE, 2016).

Nas últimas décadas numerosos efeitos fisiológicos da sinalização elétrica estão sendo descobertos demonstrando que este tipo de sinalização é essencialmente relevante no reino vegetal (TREBACZ; DZIUBINSKA; KROL, 2006; FROMM; LAUTNER, 2007; VODENEEV; AKINCHITS; SUKHOV, 2015).

1.2 Importância do estudo da sinalização elétrica em plantas

A multiplicidade de fatores estressantes aos quais as plantas estão sujeitas no campo, pode resultar em uma grande variedade de respostas. Em um contexto atual de relevantes mudanças climáticas, onde os recursos do ambiente podem sofrer modificações significativas em um curto espaço de tempo, como por exemplo a redução da disponibilidade hídrica e o aumento da demanda evaporativa em função da temperatura, a importância de decifrar a

complexidade das respostas ao estresse é exemplificada. Da mesma forma, a identificação rápida da ocorrência de estresses por pressão de patógenos ou herbívoros se faz importante.

Neste contexto, o conhecimento dos sinais elétricos em função de cada tipo de estímulo, pode ser empregado como ferramenta eficiente de monitoramento de estresses, sendo utilizada como um indicativo precoce do status fisiológico das plantas. Desta forma, permitirá gerenciar de forma mais eficaz as práticas de manejo na agricultura, apontando de forma precisa a necessidade de investimento de recursos cada vez mais escassos, como por exemplo, a água para a irrigação.

Em um contexto mais amplo, caracterizar as modificações espontâneas de potencial de membrana durante processos fisiológicos, como por exemplo, a transição entre estádios fenológicos, o florescimento em culturas anuais ou perenes, identificação do momento de satisfação de necessidades fisiológicas e climáticas, como o alcance da soma térmica, indução do florescimento através do fotoperíodo, final do período de juvenilidade, entre outros, abre campo para o surgimento de novas técnicas de controle destes eventos.

Além disso, segundo Mantri et al. (2012) compreender os mecanismos pelos quais as plantas percebem sinais ambientais e ainda a sua transmissão à maquinaria celular para ativar respostas adaptativas é de fundamental importância para o desenvolvimento da criação racional e estratégias transgênicas para conferir tolerância ao estresse em culturas.

1.3 Importância da investigação dos efeitos da sinalização elétrica a fotossíntese

Alguns estudos têm se dedicado a explicar as mudanças das atividades fotossintéticas em resposta a sinalização elétrica (GALLÉ et al., 2015). Embora, o conhecimento sobre seus efeitos diretos e indiretos seja limitado, a ligação entre a sinalização elétrica e as alterações na fotossíntese tem sido demonstrada (GALLÉ et al., 2013; GRAMS et al., 2007, 2009; SUKHOV et al., 2015).

Dada a relevância da fotossíntese como o processo natural, responsável por coletar a energia solar e transformá-la em energia química, disponível para os demais organismos vivos, pode ser considerada um dos processos mais importantes e significativos para a manutenção da vida no planeta (PAVLOVIČ, 2012). Não menos importantes são os processos que a regulam.

A regulação da fotossíntese é especialmente importante sob condições de estresse promovida por condições ambientais como a alta intensidade luminosa, temperaturas elevadas ou muito baixas, deficit hídrico, entre outros fatores (SUKHOV, 2016). Nestes casos a

regulação dos processos fotossintéticos tem por objetivo a proteção da maquinária fotossintética (ZIVCAK et al., 2013), além de estimular os processos de reparação após o estresse (NATH et al., 2013).

Desta forma, conhecer os mecanismos envolvidos na regulação da fotossíntese possibilita o estabelecimento de estratégias para a melhoria do funcionamento do aparato fotossintético, com efeito direto sobre as taxas de assimilação de CO_2 e, por consequência, pode ajudar a melhorar o rendimento das culturas.

1.4 Justificativa do problema de pesquisa e objetivos

As recentes descobertas da atuação da sinalização elétrica sobre diversos processos fisiológicos em plantas, desperta grande interesse sobre seu potencial de utilização para monitoramento do status fisiológico dos vegetais, e como ferramenta para adequar estratégias de manejo em cada situação de condição ambiental específica. Para este fim, o conhecimento sobre as características dos sinais elétricos propagados em resposta ao estímulo, suas rotas de propagação e seus efeitos fisiológicos em partes intactas da planta são fundamentais. Sabendo que os sinais elétricos são capazes de propagar-se a longas distâncias e promover alterações significativas na fotossíntese perguntamos: os sinais elétricos propagam-se sistemicamente para todas as partes da planta a partir do ponto de estímulo ou possuem alguma rota preferencial de propagação? E quais são os parâmetros fisiológicos relacionados a fotossíntese afetados por estes sinais que resultam em alterações na assimilação líquida de CO_2 ?

Este trabalho teve por objetivo investigar as prováveis rotas de propagação dos sinais elétricos, em especial dos potenciais de variação, bem como, investigar seus efeitos sobre os processos fisiológicos relacionados a fixação de CO_2 .

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tipos de sinais elétricos em plantas: cinética e rotas de propagação

A capacidade de um organismo vivo gerar e propagar um sinal elétrico, depende inicialmente das propriedades físicas das membranas celulares, como a seletividade a íons e a capacidade de atuar como um isolante elétrico, separando cargas entre os meios internos e externos da membrana.

A presença de transportadores ativos de íons incorporados nas membranas (principalmente K^+ , Na^+ , H^+ , Ca^{2+} e Cl^-), permite a geração de um potencial eletrostático transmembranar (KRÓL; DZIUBINKA; TREBACZ, 2010). Quando as forças eletroquímicas dos íons que fluem através da membrana se equilibram em cada lado da mesma, ocorre o estado de repouso (COSTANZO, 2014). Qualquer alteração no movimento de íons resultará em alterações no potencial de repouso. Tais desequilíbrios podem ser desencadeados por estímulos como: luz, pressão (mecânica ou osmótica), temperatura, toque, ferimento, substâncias químicas, ou até mesmo corrente elétrica (KRÓL; DZIUBINKA; TREBACZ, 2010; FROMM; LAUTNER, 2007). Estes estímulos são capazes de atuar direta ou indiretamente sobre canais iônicos, transportadores ou bombas de prótons, promovendo uma alteração transitória na permeabilidade da membrana saindo do potencial de repouso (GRADMANN, 1976). Quando o estímulo é suficientemente grande para despolarizar a membrana para além de um certo limiar, o limiar de excitação, um potencial de ação é gerado sendo propagado para outras células através dos plasmodesmas (FROMM; LAUTNER, 2007).

Vários tipos de sinais elétricos são conhecidos em plantas, dentre eles estão os potenciais de ação (PAs); potenciais de variação (PVs) e potenciais sistêmicos (PS) (HUBER; BAUERLE, 2016).

- Potencial de ação (PA)

Os diferentes sinais elétricos são normalmente caracterizados em função de sua amplitude, duração, e embora variável, também pode ser considerada a velocidade de propagação (GALLÉ et al., 2015).

Os potenciais de ação (PAs) caracterizam-se principalmente por apresentarem velocidade de propagação e amplitude constantes, além de obedecer ao princípio do “tudo ou nada” (FROMM; LAUTNER, 2007). Este princípio implica que, para a ocorrência do PA,

seja necessário que as alterações de potencial de membrana ultrapassem um limiar de excitação, que é específico de cada célula, e somente quando este limiar é atingido ocorre a geração e propagação do PA. Após deflagrado o PA não sofre alterações em amplitude e forma em função de estímulos adicionais (HILLE, 1978).

Os estudos sobre as rotas de propagação dos sinais elétricos, dedicaram especial atenção aos feixes vasculares das plantas, por assemelharem-se ao sistema nervoso nos animais (DZIUBIŃSKA, 2003), onde a propagação de sinais elétricos ocorre através de uma densa rede de células especializadas que compõem o sistema nervoso. Estas células são conectadas por axônios, que funcionam como cabos que conduzem informações por todo o corpo. De forma análoga, nas plantas os tecidos vasculares, especialmente o floema, é formado por uma rede de células conectadas, que apresentam concentração iônica interna e externa a membrana idêntica ao axônio (100 mM de K^+ internamente, e 1 mM K^+ externamente a membrana) (HEDRICH; SALVADOR-RECATALÀ; DREYER, 2016).

Embora os tecidos vasculares vegetais não sejam especializados para a condução de sinais elétricos, Bose e Das (1925) demonstraram que os PAs se propagam pelo floema separadamente do xilema. Mais tarde estes resultados foram confirmados por outros estudos.

Os PAs são caracterizados por uma rápida fase de despolarização da membrana seguida por uma rápida repolarização (FROMM; LAUTNER, 2007; FROMM; ESCHRICH, 1988). Após a passagem de cada PA único, ocorre o chamado período refratário, que é o tempo necessário para uma célula restaurar a sua excitabilidade, ou seja, a capacidade de gerar e transmitir PAs (KRÓL; DZIUBINSKA; TREBACZ, 2010).

As diferentes fases que compõe um PA são caracterizadas pela ativação de canais distintos, bem como, pelo fluxo de íons através da membrana. Segundo modelo proposto por Opritov, Pyatygin e Vodeneev (2002), no momento em que o limiar de excitação é alcançado, canais de Ca^{2+} são abertos, promovendo o aumento na concentração citosólica deste íon. Ocorre então, a abertura de canais de Cl^- simultaneamente com a inativação da bomba de prótons (H^+ ATPase). Este fluxo iônico conduz à despolarização e a inversão momentânea da polaridade da membrana. A repolarização da membrana é promovida pelo efluxo de K^+ e pela reativação da bomba de prótons, o que impulsiona o valor do potencial de membrana novamente ao potencial de repouso.

Após desencadeado o PA não há consumo de energia, uma vez que, a força eletromotriz que sustenta o processo está acoplada ao campo elétrico gerado pelo movimento de íons, sendo que o retorno ao equilíbrio é direcionado por mudanças no próprio campo elétrico (HILLE, 1978).

- Potencial de variação (PV)

Assim como o PA, o PV também é caracterizado por uma mudança transitória no potencial de membrana (despolarização seguida de repolarização). Entretanto nos potenciais de variação (PVs) a fase de repolarização é mais longa (WAGNER et al., 2006).

Ao contrário dos PAs a geração dos PVs não está relacionada ao princípio do “tudo ou nada”. Os PVs podem ser gerados por ferimento, excisão de órgãos ou queima, embolia, flexão da haste, até mesmo pequenas incisões mandibulares de insetos (VODENEEV; AKINCHITS; SUKHOV, 2015; GALLÉ et al., 2013, FROMM; LAUTNER, 2007).

A amplitude do sinal diminui conforme aumenta a distância do local de estímulo (STAHLBERG; CLELAND; VAN VOLKENBURGH, 2005; DAVIES, 2004). Embora não bem explicada, a propagação dos PVs está associada a mudanças na pressão hidráulica dos tecidos ocasionada em função do estímulo (STAHLBERG; COSGROVE, 1996). Sinais hidráulicos positivos são quase sempre acompanhados por uma forte despolarização da membrana, que segue mais lentamente e atrasada a onda de propagação da alteração da pressão hidráulica (STAHLBERG; CLELAND; VAN VOLKENBURGH, 2005).

O mecanismo pelo qual a onda hidráulica é capaz de causar uma resposta elétrica nas células vizinhas ao xilema não é clara (FROMM; LAUTNER, 2007). Provavelmente, o grande influxo de água para dentro de células vivas pode conduzir a um alongamento de membranas afetando canais de íons mecano-sensíveis promovendo fluxo de íons (DAVIES; STANKOVIC, 2006). Após sua formação o PV pode propagar-se via plasmodesma por longas distâncias (FROMM; LAUTNER, 2007).

O mecanismo iônico de formação do PV difere do PA na fase de repolarização, onde além da reativação das bombas de prótons ocorre a extrusão de Ca^{2+} por um período de tempo longo prolongando a fase de repolarização (KATICHEVA et al., 2014, 2015).

- Potencial Sistêmico (PS)

Enquanto os PAs e PVs são eventos caracterizados por despolarização de membranas que diferem no padrão de voltagem, mecanismo iônico e velocidade de propagação, os PSs são eventos de hiperpolarizações de membrana sistemicamente transmitidos (ZIMMERMANN et al., 2009). A ocorrência dos PSs é menos relatada que os demais tipos de sinais elétricos.

Os PSs foram classificados como um tipo de sinal elétrico primeiramente por Zimmermann et al. (2009), entretanto outros autores observaram a propagação de sinais com as mesmas características anteriormente.

Mousavi et al. (2013) identificaram eventos de hiperpolarização de membranas em plantas de *Arabidopsis thaliana* estimuladas com ferimento. Zimmermann et al. (2009) estudando o estímulo de ferimento associado a aplicação de diferentes íons (Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , e Na^+) em plantas de *Vicia faba* observou a propagação de sinais semelhantes. Curiosamente em ambos os experimentos a propagação de PSs ocorreu em folhas onde não houve a propagação de PAs.

Adicionalmente a estes resultados Zimmermann et al. (2009) observaram que os PSs propagados apresentavam características particulares para cada concentração e tipo de íon utilizado. Zimmermann et al. (2016) registraram a ocorrência de PSs em resposta a herbivoria, estes sinais exibiram diferentes padrões de voltagem quando comparados aos PSs registrados em resposta a ferimentos.

Diferentemente dos PAs, os PSs apresentam como primeira fase a hiperpolarização de membranas como resultado da ativação da H^+ -ATPase. Os PSs auto propagam-se sistemicamente sem a dependência da ativação de outros canais, sendo que o fluxo de íons através da membrana é posterior a passagem deste sinal Zimmermann et al. (2016).

2.2 Sinalizações elétrica e trocas gasosas em plantas

É provável que a ocorrência da geração e propagação de sinais elétricos em plantas derive da necessidade de perceber e responder rapidamente as mudanças do ambiente. Variados tipos de estímulos são capazes de desencadear sinais elétricos específicos em células vegetais, e estes são capazes de promover respostas fisiológicas variadas em tecidos distantes ao que recebeu o estímulo (GALLÉ et al., 2015).

O estudo sobre a sinalização elétrica vem demonstrando a sua relação com alterações em diversos processos fisiológicos em plantas (VODENEEV; AKINCHITS; SUKHOV, 2015), respiração (DZIUBINSKA; TREBACZ; ZAWADZKI, 1989), absorção de água (DAVIES; ZAWADZKI; WITTERS, 1991), respostas a estresses bióticos e abióticos (FROMM; FEI, 1998; MAFFEI; BOSSI, 2006) e alterações na fotossíntese (GRAMS et al., 2009; PAVLOVIČ, 2012; SUKHOV et al., 2015; SHERSTNEVA et al., 2016).

O atual conhecimento sobre o efeito direto ou indireto de sinais elétricos na fotossíntese é limitado, uma vez que, o padrão de respostas fotossintéticas a sinais elétricos varia entre espécies, bem como, com o tipo de estímulos externos e a distância de transmissão

de sinal (GALLÉ et al., 2015). Além disso, a existência de outras formas de sinalização como a química e a hidráulica, que podem atuar de forma associada a elétrica, dificultam o estudo de um tipo de sinal atuando isoladamente.

Em geral, os trabalhos que estudam a resposta fotossintética a sinalização elétrica relatam uma supressão momentânea da assimilação líquida de carbono (A) após a aplicação de um estímulo.

Koziolek et al. (2004) observou que as alterações nas trocas gasosas em resposta a estímulo de ferimento por queima ocorrem rapidamente após o estímulo e ao registro de sinais elétricos, sendo mais rápidas do que a velocidade proposta para a propagação de sinais químicos, desta forma, a sinalização elétrica seria a responsável pelas alterações em A . Grams et al. (2009) estudando plantas de *Zea mays* observou decréscimo em A após aplicação de estímulo por queima. Curiosamente foi registrada elevação inicial na condutância estomática, o que sugere que a regulação estomática não seria o processo responsável pela redução em A .

Acredita-se que a propagação de sinais elétricos, especialmente o PV, está associado a variações de tensão nos vasos do xilema (STAHLBERG; COSGROVE, 1996). Esta variação pode modificar as trocas gasosas, em função de seu efeito direto sobre a abertura estomática. Entretanto, nos estudos sobre sinalização elétrica é normalmente observado que a modificação na abertura estomática é posterior a mudança em A . Desta forma, é possível considerar que a mudança da condutância estomática não é a responsável por promover a diminuição de A . Se considerada a sinalização química de longa distância, sabe-se que esta propagação pode ser demasiadamente lenta em comparação aos demais tipos de sinalização (HUBER; BAUERLE, 2016), o que reforça a ideia de que tais modificações derivam da sinalização elétrica.

Reforçando a ligação entre a sinalização elétrica e modificações nas trocas gasosas Sukhov et al. (2012) observou que a ausência de propagação de sinais elétricos, ou sinais com amplitude reduzida, não promove alterações na fotossíntese. Galle et al. (2013), constatou que o bloqueio do sinal elétrico através do resfriamento do pecíolo da folha de estímulo impediu a propagação do sinal elétrico para a folha de medida, o que resultou na ausência de alterações nas trocas gasosas. Lautner et al. (2005) observou que o atraso entre o estímulo e as mudanças na fotossíntese aumenta quanto mais distante for o local do estímulo do local de medidas.

Menos relatada é a ocorrência de elevação de A em resposta a sinais elétricos. Grans et al. (2007) observou elevação em A após a propagação de PAs induzidos por irrigação em plantas de *Zea mays* L. sob estresse hídrico. Em alguns casos a ocorrência de sinais elétricos não resultou em alterações nas trocas gasosas. Lautner et al. (2005) observou ausência de alterações nas trocas gasosas em resposta a PAs induzidos por frio.

A influência de PSs sobre a fotossíntese não foi investigada profundamente. Lautner et al. (2005) e Fromm et al. (2013) observaram a inativação da fotossíntese em resposta a um sinal de hiperpolarização em resposta a queima. Desta forma, é provável que a hiperpolarização de membranas PS também promova alterações na fotossíntese, mas esta hipótese precisa de estudos mais específicos.

Os mecanismos pelos quais os sinais elétricos promovem ativação da fotossíntese, no entanto receberam pouca atenção (SUKHOV, 2016). Atualmente são considerados dois mecanismos possíveis para a inativação da fotossíntese induzido por sinais elétricos em plantas. O primeiro atribui ao aumento na concentração de Ca^{2+} no citoplasma e, posteriormente, no estroma do cloroplasto, o início da inativação da fotossíntese. O aumento na concentração citossólica de Ca^{2+} é documentada para PAs e PVs e estaria relacionado a inativação do ciclo de Calvin-Benson (BULYCHEV; KOMAROVA, 2014). A segunda hipótese considera que as alterações na fotossíntese estão relacionadas a mudanças no pH intracelular e extracelular (SUKHOV et al., 2013; SHERSTNEVA et al., 2016). Neste processo a inativação da H^+ -ATPase possui papel chave nas alterações de pH e estaria envolvida em PAs e PVs (VODENEEV; AKINCHITS; SUKHOV, 2015).

Neste caso observou-se que a propagação de sinais elétricos promoveu o influxo de ions H^+ nas células o que resultou em diminuição da eficiência quântica dos fotossistemas I e II (FSI e FSII respectivamente) e aumento da dissipação não fotoquímica (SUKHOV et al., 2014; SHERSTNEVA et al., 2016; PAVLOVIČ, 2012).

Outro aspecto importante a considerar é a influência da sinalização elétrica sobre A através da redução do fluxo de CO_2 no do mesófilo, fato registrado por Gallé et al. (2015) que observou a redução da assimilação líquida de CO_2 em função da redução da condutância mesofílica (g_m). Segundo Sukhov (2016) a ligação entre as alterações do pH celular e a condutância ao CO_2 não estão muito claras, provavelmente ela depende da atividade de aquaporinas que participam do transporte do CO_2 no mesófilo, e podem ter sua atividade alterada em função do pH.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições experimentais

Sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) variedade BRS-323 fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) foram semeadas em vasos plásticos de 5 litros e cultivados em casa de vegetação no Laboratório de Estudo de Plantas sob Estresse - (LEPSE) da Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, da USP. O substrato utilizado foi composto por argila laminada (2,5mm), argila expandida (6 a 15mm) e vermiculita na proporção de 1:1:1. Acomodado sobre uma camada de aproximadamente 3 cm de argila expandida (22 a 32 mm) no fundo do vaso.

Os vasos foram irrigados diariamente com 500 ml de solução nutritiva (Tabelas 1 e 2), quantidade suficiente para promover a percolação de solução nutritiva pelo fundo do vaso, garantindo a manutenção do substrato na capacidade de campo.

Os parâmetros de avaliação da sinalização elétrica, trocas gasosas e fluorescência da clorofila “a” foram realizadas quando as plantas atingiram o quarto par de folhas expandidas, aproximadamente 30 dias após a semeadura.

Tabela 1 - Fontes de nutrientes utilizadas na solução nutritiva

Fonte	Quantidade g L ⁻¹
Fertilizante Miracle-Gro®	0,46
KCl	0,1
CaCl ₂	0,26
MgCl ₂	0,1
Fe-EDTA	1 mL

Tabela 2 - Composição química do fertilizante Miracle-Gro®

Nutriente	Quantidade (%)
Nitrogênio Total (N)	24
Fósforo (P)	8
Potássio (K)	16
Boro (B)	0,02
Cobre (Cu)	0,07
Ferro (Fe)	0,15
Manganês (Mn)	0,05
Molibidênio (Mo)	0,0005
Zinco (Zn)	0,06

3.2 Delineamento experimental e tratamentos

O experimento foi conduzido sob delineamento inteiramente casualizado, constituído por 5 tratamentos com 10 repetições. Como tratamentos, foram considerados os diferentes posicionamentos das folhas de estímulo em relação a folha de medida das trocas gasosas (Figura1):

FMLAC- estímulo aplicado em folha de mesmo lado e acima da folha de medida das trocas gasosas.

FPAC- estímulo aplicado em folha perpendicular e acima da folha de medida das trocas gasosas.

FOMP- estímulo aplicado em folha oposta e de mesmo par da folha de medida das trocas gasosas.

FPAB- estímulo aplicado em folha perpendicular e abaixo da folha de medida das trocas gasosas.

FMLAB- estímulo aplicado em folha de mesmo e lado abaixo da folha de medida das trocas gasosas.

Figura 1 - Posicionamento dos tratamentos que definem as folhas de estímulo em relação a folha de medidas em plantas de girassol

3.3 Sistema de captura dos sinais elétricos: Estímulo e medições

Para as medições de sinais elétricos as plantas foram conduzidas da casa de vegetação para gaiolas de Faraday com dimensões de 110 x 85 x 120 cm, com espaços de blindagem de ferro de 1 cm², para assegurar o isolamento eletromagnético, e equipadas com painéis de led azuis e vermelhos para o fornecimento de aproximadamente 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura 2).

Figura 2 - Gaiola de Faraday equipada com painéis de led azuis e vermelhos utilizada para avaliações de sinais elétricos, trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

O registro dos potenciais elétricos foi seguido o protocolo de medição usado pelo Laboratório de Biofísica na Universidade Maria Curie-Sklodowska, na Polônia, utilizado por Paszewski e Zawadzki (1973) adaptado por Macedo (2015).

Para a execução da técnica foram utilizados eletrodos de registro Ag/AgCl constituído de fio de prata 0,25 mm de diâmetro, clorados com uma camada de AgCl numa solução de 3M de KCl. Após a cloração, os eletrodos foram inseridos nos tecidos vegetais de acordo com os tratamentos estabelecidos no item 3.2.

O eletrodo de referência foi inserido no solo e mantido úmido durante todo o experimento para promover o contato ideal do eletrodo com a solução do solo (Figura 1).

As medidas de sinais elétricos foram iniciadas 15 horas após a inserção dos eletrodos nas plantas, tempo este, necessário para estabilização da voltagem nos eletrodos.

A resistência de entrada de cada canal foi de 100 G Ω . Os eletrodos foram conectados a um conjunto de dados composto por 4 sistema de canais LABTRAX, conectados a um computador controlado pelo software “Lab Scribe”.

Os PVs foram medidos por monitoramento contínuo de atividade elétrica durante 60 minutos após o estímulo.

Para geração dos PVs, foi utilizado um estímulo de queima através do posicionamento da chama a aproximadamente 3 cm da lâmina foliar durante 10 segundos.

Para as medidas do sinal elétrico foi padronizado o posicionamento dos eletrodos (Figura 3), onde:

Eletrodo do canal 1 (E1)- pecíolo da folha de estímulo.

Eletrodo do canal 2 (E2)- pecíolo da folha de medidas com o IRGA.

Eletrodo do canal 3 (E3)- nervura central da folha de medidas com o IRGA.

Eletrodo do canal 4 (E4)- nervura secundária da folha de medidas com o IRGA.

Figura 3 - Face abaxial de folhas de girassol. A - Posicionamento dos eletrodos de medida do sinal elétrico e câmara de medida do IRGA posicionada na folha de medidas. B – Posicionamento dos eletrodos de medida de sinais elétricos na folha de medidas. (E2) eletrodo canal 2, (E3) eletrodo do canal 3, (E4) eletrodo do canal

3.4 Medições de trocas gasosas e fluorescência da clorofila

As leituras foram realizadas com a utilização de um sistema aberto de medição de trocas gasosas equipado com um analisador infravermelho de gases (IRGA – Infra-red Gas Analyzer) modelo LI-6400XT (LI-COR, Lincoln, Nebraska – USA), acoplado a uma câmara de fluorescência para folhas (6400-40), com área de 2 cm² (Figura 4). Para a avaliação da fluorescência da clorofila as folhas foram adaptadas ao escuro por 40 minutos (fluorescência com todos os aceptores do FS II “abertos”; Q_a totalmente oxidada) a fim de determinar a fluorescência mínima da clorofila (F_o). Com a folha ainda adaptada ao escuro foi obtida a fluorescência máxima da clorofila (F_m) através da aplicação de um flash de saturação de $\sim 7900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por aproximadamente 0,8 segundos, de modo que todos os aceptores do FS II tenham sido “fechados” (Q_a totalmente reduzida). A fluorescência variável (F_v) foi dada

pela diferença entre as fluorescências máxima e a mínima ($F_v = F_m - F_o$). O máximo rendimento quântico do FS II foi dado pela relação F_v/F_m .

Figura 4 – Medições de trocas gasosas, fluorescência da clorofila a e sinais elétricos em plantas de girassol

Com as folhas adaptadas a luz actínica (por 40 minutos a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a cada 60 segundos determinou-se a fluorescência em amostra adaptada à luz (F). Posteriormente aplicou-se um pulso de 0,8s de luz actínica saturante ($\sim 7900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para a determinação das variáveis fluorescência máxima em amostra adaptada à luz (F_m'), e estimados o rendimento quântico efetivo no FSII ($\Delta F/F_m'$), coeficiente de extinção fotoquímico $q_P = (F_m' - F)/(F_m' - F_o')$ e o coeficiente de extinção não fotoquímico $q_N = (F_m - F_m')/(F_m - F_o')$ e taxa de transporte de elétrons ($ETR = (F_m' - F_s/F_m') f I \alpha_{\text{folha}}$) onde f é a fração da energia absorvida pelo fotossistema II e é assumida como 0,5 para plantas C3; α_{folha} é a absorbância da folha e I é a densidade do fluxo de fótons incidente ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Imediatamente antes da aplicação do pulso de luz saturante foram mensurados a taxa de assimilação de CO_2 (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 a concentração intercelular de CO_2 (C_i $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol ar}^{-1}$).

Para estas medidas as condições microclimáticas da câmara foram mantidas constantes com valores de umidade relativa entre 50 e 60%, temperatura do bloco de medida em 27° C e concentração de CO₂ da atmosfera de referência em 400 µmol CO₂ mol ar⁻¹.

As medidas de trocas gasosas foram realizadas sempre em folhas totalmente expandidas do quarto par de folhas (Figura 4), contado da base para o ápice. Este par apresentava-se totalmente expandido quando as plantas atingiam aproximadamente 1 mês de idade, contado a partir da semeadura.

Para exposição dos resultados de trocas gasosas e fluorescência da clorofila optou-se calcular a variação (Δ) destes parâmetros após a aplicação do estímulo. Para isso, após a adaptação das plantas a luz, por um período de 40 minutos, foram executados 10 pulsos de luz completos para registro das variáveis da fluorescência da clorofila, anteriormente ao estímulo. Com os valores obtidos calculou-se a média para cada parâmetro avaliado. Todos os valores obtidos após o estímulo tiveram o valor da média subtraídos, desta forma, o valor obtido representa a variação dos parâmetros em relação aos valores anteriores ao estímulo.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização eletrofisiológica dos sinais elétricos: cinética e rotas de propagação

A geração e propagação de sinais elétricos é um fenômeno bastante difundido entre os organismos vivos. Nos vegetais a investigação do real papel fisiológico dos sinais, se depara com dificuldades, como por exemplo, identificar seu ponto de origem e rotas de propagação.

O potencial de variação (PV) é caracterizado por uma mudança transitória no potencial de membrana, uma fase de despolarização seguida de uma fase de repolarização mais longa (WAGNER et al., 2006). Os PVs podem ser gerados por ferimento, excisão de órgãos, queima, embolia, flexão da haste, até mesmo pequenas incisões mandibulares de insetos (VODENEEV; AKINCHITS; SUKHOV, 2015; GALLÉ et al., 2013, FROMM; LAUTNER, 2007).

As rotas e o mecanismo de propagação do PV não são bem conhecidas. Acredita-se que o estímulo de origem mecânica, promova uma alteração súbita da pressão hidrostática do tecido, que se propaga como uma onda ao longo dos vasos do xilema, provocando alterações no fluxo iônico nas membranas de células adjacentes.

A Figura 5 demonstra a variação típica do potencial de membrana (mV) em folhas de girassol, desencadeados após estímulo de queima no tempo zero. O registro feito por um sistema com quatro canais demonstra a variação do potencial de membrana originado na folha de estímulo, onde está inserido o eletrodo 1 (E1), propagando-se para outra folha onde estão inseridos os eletrodos 2, 3 e 4 (E2, E3 e E4, respectivamente)

Alguns estudos indicam que a propagação de PVs a longas distâncias ocorre através do xilema. Entretanto as células do xilema não possuem potencial de membrana, portanto não seriam capazes de propagar as variações em seu potencial, sendo que estas aconteceriam nas células adjacentes ao xilema (STANKOVIC; ZAWADZKI; DAVIES, 1997). Estas evidências sugerem que a propagação dos PVs depende da continuidade do xilema, bem como, das variações do seu potencial hidrostático. Desta forma, este tecido exerceria papel decisivo sobre as rotas de propagação destes sinais.

Para investigar as possíveis rotas de propagação dos PVs, foi aplicado estímulo de queima em folhas localizadas em diferentes posições no dossel da planta, e avaliado a ocorrência de propagação de sinais elétricos para uma folha posicionada no quarto par de folhas, bem como, as características dos sinais propagados, e os seus efeitos fisiológicos. A Figura 5 exemplifica o posicionamento dos eletrodos e os sinais obtidos.

Figura 5 - Variação do potencial de membrana extracelular (mV) em folhas de girassol, desencadeados após estímulo por queima. E1: eletrodo posicionado no pecíolo da folha de estímulo; E2: eletrodo posicionado no pecíolo da folha de medida; E3: eletrodo posicionado na nervura central da folha de medida e E4: eletrodo posicionado na nervura secundária da folha de medida (FPAC)

Embora exista um padrão típico que caracteriza sinais elétricos gerados e propagados em função do estímulo de queima, observou-se neste experimento, características diferenciadas de sinais propagados dependendo do posicionamento da folha de estímulo em relação a folha de medidas.

De forma geral nos eventos onde houve a propagação de sinais com maior amplitude, estes se caracterizaram por uma forte despolarização de membrana, tanto na folha de estímulo quanto na folha de medida (representados por valores com sinal positivo na Tabela 3), entretanto sempre com valores de amplitude menores na folha de medida. Segundo Fromm e Lautner (2007) os PVs caracterizam-se por uma fase de despolarização de membrana com amplitude inicialmente dependente da força do estímulo, e que perde amplitude e velocidade conforme distancia-se do local do estímulo. Este padrão característico é evidenciado no tratamento FMLAB, onde todos os estímulos resultaram em sinais propagados com tais

características, bem como, na maioria das plantas testadas nos tratamentos FPAB, FPAC, e FMLAB.

Tabela 3 - Variações do potencial de membrana e propagação de sinais elétricos em tecidos de girassol desencadeados por estímulo de queima

Planta n°	Amplitude (mV)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
FOMP										
E 1	119,9	95,137	115,1	90,7	81,9	113,6	66,571	87,9	65,6	49
E 2	-8,71	-5,6	-3,8	-12,9	-3,8	-6,6	0	-5,9	-4,1	0
E 3	-8,62	-5	-3,2	-12,5	-3,7	-7,6	0	-6	-3,86	0
E 4	-8	-3,1	-1,49	-13,2	-4,7	-12	0	-5,8	9,6	0
FMLAB										
E 1	114,86	119,8	123,5	131,5	117,3	119	110,2	137	82,74	104,6
E 2	63,4	57	16,7	46,3	20,68	76,5	51	49,6	59,7	52,2
E 3	58,6	43,5	40,6	44,7	53,8	92,4	66,7	67,8	36,1	69,75
E 4	64,4	41,6	30,8	93	23,7	71,3	0	16,7	75,2	12,1
FPAB										
E 1	134,6	124	120,4	104,5	114,3	111,4	90,9	126	54,6	76,7
E 2	42,7	-10,5	-3,9	18,1	0	29,9	69	12,5	3,84	21,9
E 3	28,4	-9,9	-9,66	36	0	44,8	80,2	12,3	0	26
E 4	82,4	-9,5	-12,9	48,6	0	9,5	19,4	11,7	5,3	5,3
FPAC										
E 1	109,4	77,13	105,6	135,2	64,8	144,6	100,5	106	67,4	52,47
E 2	22,6	0	-6,5	0	4,1	57,87	15,5	-3,62	-3,9	0
E 3	43,3	0	14,7	0	3,6	87,3	7,6	-3,5	-4,2	0
E 4	73,8	0	-6,9	0	3,4	81,8	5,1	-4,5	-4	0
FMLAC										
E 1	74,08	132,4	74	39,1	60,57	112,5	51,38	58,7	31,7	31,79
E 2	0	23,7	0	3,3	10,45	7,9	11,7	4	5,8	17,28
E 3	0	61,3	0	-3,6	3,28	6,5	3,24	3,9	6,8	30,7
E 4	0	17	0	2	3,6	6,1	4,34	4,1	5,8	6,2

Os eventos de propagação de sinal no tratamento FOMP, apresentaram características semelhantes aos demais quando considerados os valores obtidos no pecíolo da folha de estímulo, com despolarização igual ou superior a 49 mV, seguido por uma fase de repolarização lenta, características associadas a PVs. De forma contrastante, os sinais

registrados na folha de medida caracterizaram-se por sinais de baixa amplitude, em geral, inferiores a 13 mV (Figura 6), com orientação negativa o que sugere a ocorrência de hiperpolarização intracelular da membrana na fase inicial (valores com sinal negativo na Tabela 3). Mousavi et al. (2013) encontrou padrão semelhante estudando sinais propagados em resposta ao estímulo de ferimento em plantas de *Arabidopsis thaliana*, neste estudo os sinais observados apresentaram amplitude aproximada de 20 mV. Zimmermann et al. (2009, 2016), classificam sinais com esta característica como potencial sistêmico (PS). Este tipo de sinal propaga-se sistemicamente e varia conforme a natureza e a intensidade do estímulo, portanto não pode ser considerado PA; possui movimento intracelular inicial hiperpolarizante contrário ao observado em PVs. Por assumir características particulares de acordo com o tipo de estímulo os PSs podem ser eficientes na sinalização de longa distância (ZIMMERMANN et al., 2009).

Neste estudo não foi possível identificar o sentido de propagação dos PSs, uma vez que, o sinal gerado na folha de estímulo caracteriza-se como PV. Entretanto, claramente os PSs originam-se imediatamente após o estímulo, sendo registrado nos eletrodos da folha de medidas.

Curiosamente os PSs foram observados em plantas onde não foi registrada a propagação do PV da folha de estímulo em direção a folha de medidas. Além do elevado número de ocorrências no tratamento FOMP (7 eventos), também foram registrados PSs em FPAC (3 eventos), FPAB (2 eventos) e FMLAC onde este sinal foi registrado apenas no eletrodo da nervura central da folha de medidas (Figura 6 e Tabela 3).

Outras variações na cinética dos sinais foram observadas. No girassol 3 do tratamento FPAC, a despolarização característica observada na folha de estímulo foi propagada e registrada apenas no eletrodo 3 posicionado na nervura central da folha de medidas (E3 Tabela 3). Esta despolarização foi seguida de uma fase de repolarização e hiperpolarização de membranas. Nos eletrodos 2 e 4 posicionados no pecíolo e na nervura secundária da folha de medidas houve o registro apenas da fase de hiperpolarização de membranas.

Figura 6 - Variação do potencial de membrana (mV) em folhas de girassol, desencadeados após estímulo por queima. Ocorrência de hiperpolarização de membranas nos tratamentos FOMP, FPAB e FPAC. E1: eletrodo posicionado no pecíolo da folha de estímulo; E2: eletrodo posicionado no pecíolo da folha de medida; E3: eletrodo posicionado na nervura central da folha de medida e E4: eletrodo posicionado na nervura secundária da folha de medida

O fato dos PSs registrados neste experimento terem ocorrido em resposta a estímulos onde não houve registro de PVs, sugere que tais sinais não compartilham das mesmas rotas de propagação, sendo assim, a geração e propagação dos PSs a partir da folha de estímulo e registro na folha de medidas como no tratamento FOMP, sugerem a capacidade deste sinal propagar-se independentemente de tecidos vasculares. As ocasiões onde a propagação de PVs foi registrada, não descartam a possibilidade de PSs estarem sendo gerados na folha de estímulo, permanecendo imperceptíveis devido a grande amplitude dos PVs. Outra possibilidade a ser considerada é a dos PSs estarem sendo gerados na própria folha de medida.

Zimmermann et al. (2016) destaca que em função da dependência da conectividade entre as partes há dificuldade de propagação de PAs e PVs, fazendo com que estes muitas vezes sejam dissipados pelo caminho. A capacidade de autopropagação dos PSs favorece sua detecção de forma sistêmica.

Considerando os PVs propagados em função da aplicação do estímulo houve variação no número de eventos propagados para a folha de medida, em função da posição da folha de estímulo (Tabela 4). Foram considerados como propagação de sinal aqueles eventos onde a folha de medidas apresentou variação de potencial de membrana superior a 10 (mV).

De forma geral os sinais elétricos propagaram-se preferencialmente na direção acrópeta (FPAB+FMLAB: 16 eventos) quando o estímulo foi aplicado em folhas que localizavam-se abaixo da folha de medida. Quando o estímulo foi aplicado em folhas localizadas acima da folha de medidas, um menor número de sinais foi propagado (FPAC+FMLAC: 8 eventos) indicando maior dificuldade em propagar sinais na direção basípeta (Tabela 4).

Dziubińska, Trebacz e Zawadzki (2001) observaram a propagação de PVs na direção basípeta em girassol, entretanto, não avaliaram a ocorrência de propagação na direção acrópeta.

Tabela 4 - Número de eventos de propagação de sinal elétrico em plantas de girassol (*Helianthus annuus*) desencadeado por estímulo de queima

Tratamento	Nº de avaliações	Propagação de PV Nº de eventos	%
FPAB	10	6	60,0
FMLAB	10	10	100
FOMP	10	0	0
FPAC	10	4	40
FMLAC	10	4	40
Total	50	24	48,0

Considerando o posicionamento específico da folha de estímulo, no tratamento onde as folhas de estímulo e a folha de medida possuíam orientação paralela (FMLAB), houve elevado número de eventos com propagação de sinal. Neste caso, 100% das plantas propagaram sinal da folha de estímulo para a folha de medida (Figura 7).

Figura 7 - Variação típica do potencial de membrana de plantas de girassol em função da aplicação de estímulo de queima em folhas posicionadas no mesmo lado abaixo da folha de medida (FMLAB). E 1: eletrodo posicionado no pecíolo da folha de estímulo; E 2, E 3 e E 4 eletrodos posicionados no pecíolo, nervura principal e nervura secundária da folha de medida respectivamente. (A) estímulo em E 1 com propagação de PV para E 2, E3 e E4. (B) Estímulo em E 1 sem propagação de sinal para E 2, E3 e E4

Este padrão de propagação não foi mantido quando as folhas de estímulo possuíam orientação oposta a folha de medida (FOMP), onde não foi registrada nenhum evento de propagação de sinal (Figura 8). A propagação do sinal quando a folha de estímulo possuía

orientação perpendicular e acima da folha de medida (FPAC), teve reduzido número de eventos positivos, com 4 eventos. Quando a folha de medida possuía posicionamento perpendicular, porém, abaixo da folha de medida (FPAB), houve seis eventos com propagação de sinal (Figuras 9 e 10).

Figura 8 - Variação típica do potencial de membrana de plantas de girassol em função da aplicação de estímulo de queima em folhas opostas de mesmo par a folha de medida (FOMP). E 1: eletrodo posicionado no pecíolo da folha de estímulo; E 2, E 3 e E 4 eletrodos posicionados no pecíolo, nervura principal e nervura secundária da folha de medida respectivamente. (A) estímulo em E 1 com propagação de PV para E 2, E3 e E4. (B) estímulo em E 1 sem propagação de sinal para E 2, E3 e E4

Figura 9 - Variação típica do potencial de membrana de plantas de girassol em função da aplicação de estímulo de queima em folhas posicionadas no mesmo lado abaixo da folha de medida (FPAB). E 1: eletrodo posicionado no pecíolo da folha de estímulo; E 2, E 3 e E 4 eletrodos posicionados no pecíolo, nervura principal e nervura secundária da folha de medida respectivamente. (A) estímulo em E 1 com propagação de PV para E 2, E 3 e E 4. (B) estímulo em E 1 sem propagação de sinal para E 2, E 3 e E 4

De forma contrastante a FMLAB, FMLAC apresentou baixo número de eventos com propagação de sinal (Tabela 4) e (Figura 11). Embora a folha de estímulo estivesse posicionada no mesmo lado da folha de medida, 4 eventos com propagação de sinal foram registrados, número inferior aos 10 eventos registrados em FMLAB. Esta resposta evidencia a maior dificuldade na propagação na direção basípeta, também observada em FPAC.

Figura 10 - Variação típica do potencial de membrana de plantas de girassol em função da aplicação de estímulo de queima em folhas posicionadas no mesmo lado abaixo da folha de medida (FPAC). E 1: eletrodo posicionado no pecíolo da folha de estímulo; E 2, E 3 e E 4 eletrodos posicionados no pecíolo, nervura principal e nervura secundária da folha de medida respectivamente. (A) estímulo em E 1 com propagação de PV para E 2, E 3 e E 4. (B) estímulo em E 1 sem propagação de sinal para E 2, E 3 e E 4

Dziubińska, Trębacz e Zawadzki (2001) estudando rotas de propagação de sinais elétricos em girassol apontaram que folhas paralelamente posicionadas as folhas estimuladas apresentaram maior número de sinais propagados. Entretanto, a razão pela qual há maior número de sinais propagados na direção acrópeta precisa ser investigada.

O padrão da propagação observado é um indicativo de que o sinal elétrico, em especial PV, é propagado por grupos restritos de células, provavelmente feixes vasculares que conectam a folha de estímulo a folha de medida, uma vez que, um sinal gerado em determinada folha não se propaga universalmente para todas as partes da planta. Claramente o sinal é propagado com maior facilidade no eixo vertical da planta, com maior dificuldade de propagar-se lateralmente. Este fato é evidenciado pela ausência de PVs propagados quando folhas opostas a de medida foram estimuladas (tratamento FOMP) (Tabela 4).

Considerando a possibilidade da propagação de PVs através dos feixes vasculares Zimmermam et al. (2016) estudando sinalização elétrica em plantas de *Vicia faba*, observou através da utilização de corantes, que um mesmo órgão da planta pode ser alimentado por diversos feixes vasculares, cada um alimentando áreas bem delimitadas nas regiões entre as nervuras da folha. Desta forma, a propagação de sinais elétricos, estando correlacionada com o sistema vascular das plantas, deveria cobrir de forma desigual diferentes partes da folha.

Figura 11 - Variação típica do potencial de membrana de plantas de girassol em função da aplicação de estímulo de queima em folhas posicionadas no mesmo lado abaixo da folha de medida (FMLAC). E 1: eletrodo posicionado no pecíolo da folha de estímulo; E 2, E 3 e E 4 eletrodos posicionados no pecíolo, nervura principal e nervura secundária da folha de medida respectivamente. (A) estímulo em E 1 com propagação de PV para E 2, E 3 e E 4. (B) estímulo em E 1 sem propagação de sinal para E 2, E 3 e E 4

Quando considerada a amplitude dos sinais gerados na folha de estímulo, os valores obtidos variaram entre 66 e 116 mV.

Considerando que no tratamento FOMP não houve propagação de PVs em resposta ao estímulo, e que na folha de medidas foi observada uma hiperpolarização de membranas, este apresentou a maior atenuação da amplitude do sinal, representada em porcentagem da amplitude registrada na folha de medida em relação a amplitude registrada na folha de estímulo (Tabela 5).

Tabela 5 - Atenuação da amplitude dos sinais elétricos gerados na folha de estímulo (E1) e propagados para o pecíolo da folha de medidas (E2), em função das diferentes posições da folha de estímulo em relação a folha de medidas. E correlação da distancias entre E1 e E2 e a porcentagem de atenuação da amplitude

Tratamento	Distância (mm)	Atenuação (%)	Atenuação (% mm ⁻¹)	Correlação valor de r
FOMP	138,3 ±46,5	105,4 ±4,0 a	0,8 ±0,2 a	-0,57
FMLAB	220,1 ±42,3	56,2 ±18,7 c	0,3 ±0,1 c	-0,05
FPAB	185,8 ±50,9	81,4 ±24,5 b	0,5 ±0,2 b	0,22
FPAC	164,7 ±36,5	93,3 ±14,7 ab	0,6 ±0,1 b	0,45
FMLAC	213,4 ±31,2	84,7 ±15,8 ab	0,4 ±0,1 bc	-0,57
f		11,565	21,7136	
p		<0,0001	<0,0001	
CV %		20,09	28,19	

As médias seguidas pela mesma letra minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Este cálculo demonstra o quanto a amplitude do sinal do sinal elétrico foi dissipada durante o trajeto percorrido pelo sinal. FOMP diferiu de FMLAB e FPAB, nesta variável apresentando os maiores valores.

Neste experimento não foi observada correlação entre a distância percorrida pelo sinal e a atenuação da amplitude.

4.2 Sinais elétricos e trocas gasosas em girassol

O intenso estudo sobre sinais elétricos em plantas vem demonstrando sua ocorrência universal no reino vegetal (DAVIES, 2004), despertando grande interesse sobre o papel fisiológico deste tipo de sinalização em plantas. Estudos demonstram a ocorrência de sinais elétricos em resposta a diversos fatores estressantes como ferimento por queima (KATICHEVA et al., 2015; SHERSTNEVA et al., 2016), corte e herbivoria (SALVADOR-RECATALÀ; TJALLINGII; FARMER, 2014), ou estímulos ambientais como mudanças na luminosidade (DIETRICH; SANDERS; HEDRICH, 2001; LOHSE; HEDRICH, 1992), congelamento (CARPANETO et al., 2006) e estresse hídrico (FROMM; FEI, 1998).

A propagação destes sinais apresenta relação com alterações em diversos processos fisiológicos em plantas (VODENEEV; AKINCHITS; SUKHOV, 2015) como respiração (DZIUBINSKA; TREBACZ; ZAWADZKI, 1989), absorção de água (DAVIES; ZAWADZKI; WITTERS, 1991), respostas a estresses bióticos e abióticos (FROMM; FEI, 1998; MAFFEI; BOSSI, 2006) e alterações na fotossíntese (GRAMS et al., 2009; PAVLOVIČ, 2012; SUKHOV et al., 2015; SHERSTNEVA et al., 2016).

Neste estudo constatou-se que o estímulo de queima aplicado em folhas posicionadas em regiões distintas do dossel de plantas de girassol não apresentou propagação e padrão de sinais homogêneos, o que pode levar a respostas fisiológicas distintas em regiões distantes ao ponto de estímulo. Neste sentido, foram avaliadas as alterações nas variáveis de trocas gasosas em função da ocorrência de sinais elétricos em plantas de girassol.

A propagação de sinais elétricos oriundos de estímulo de queima promoveu alterações na assimilação líquida de CO₂ ($A \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), na condutância estomática ($g_s \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), na taxa de transpiração ($E \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e na concentração intercelular de CO₂ ($C_i \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$). Observou-se que, de um total de 50 plantas testadas, 25 plantas registraram

a propagação de PVs da folha de estímulo para a folha de medidas, destas, 8 plantas (32%) apresentaram alterações nestes parâmetros (Tabela 6).

Tabela 6- Número de eventos de propagação de sinais elétricos e de ocorrência de alteração em parâmetros das trocas gasosas em plantas de girassol submetidas a estímulo de queima

Tratamento	Nº de avaliações	Propagação de PV Nº eventos	%	Alteração nas trocas gasosas Nº plantas	%
FPAB	10	6	60,0	1	16,6
FMLAB	10	10	100	5	50,0
FOMP	10	0	0	0	0,0
FPAC	10	4	40	1	25,0
FMLAC	10	4	40	1	25,0
Total	50	24	48,0	8	33,3

As Figuras 12, 13, 14, 15 e 16 apresentam a variação das variáveis de trocas gasosas em plantas que responderam a propagação de sinais elétricos (com efeito) e plantas onde não houve alterações nestas variáveis (sem efeito). O ponto zero do eixo “x” representa o momento da aplicação do estímulo. Considerando especificamente posicionamento da folha de estímulo em relação a folha de medidas, os eventos onde houve propagação de sinal, promoveram alterações nas trocas gasosas em uma porcentagem maior de plantas no tratamento FMLAB com 50%, os tratamentos FMLAC e FPAC apresentaram alterações em 25% das plantas enquanto FPAB em 14% (Tabela 6). O tratamento FOMP não apresentou alterações nas trocas gasosas (Tabela 6).

Figura 12 - Variação da assimilação líquida de CO₂ (A_n), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO₂ (C_i), e transpiração (E) em folhas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha de mesmo lado abaixo da folha de medida (FMLAB)

Figura 13 - Variação da assimilação líquida de CO₂ (A), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO₂ (C_i), e transpiração (E) em folhas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha perpendicular abaixo da folha de medida (FPAB)

Figura 14 - Variação da assimilação líquida de CO₂ (A), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO₂ (C_i), e transpiração (E) em folhas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha de mesmo lado acima da folha de medida (FMLAC)

Figura 15 - Variação da assimilação líquida de CO₂ (A), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO₂ (C_i), e transpiração (E) em folhas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha perpendicular acima da folha de medida (FPAC)

Deve-se considerar que nas plantas do tratamento FOMP por não apresentarem despolarização de membranas característica de PVs ou PAs não foram consideradas no grupo de plantas que propagaram sinais. Entretanto, o grupo de plantas deste tratamento apresentou uma hiperpolarização de membrana com baixa amplitude na folha de medidas após o estímulo. Esta variação de potencial não foi capaz de promover alterações nas variáveis de trocas gasosas (Figura 16).

Figura 16 - Variação da assimilação líquida de CO₂ (A), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO₂ (C_i), e transpiração (E) em folhas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha oposta de mesmo par da folha de medida (FOMP)

Nas plantas onde foram identificadas alterações nas trocas gasosas a propagação do sinal elétrico foi acompanhada por queda imediata da assimilação líquida de CO₂ (A). A condutância estomática (g_s), a transpiração (E) e a concentração de carbono intercelular (C_i), no entanto, apresentaram elevação inicial seguida de queda acentuada e posterior a queda em A (Figura 17).

Figura 17 - Alterações nas variáveis de trocas gasosas em função da propagação de sinais elétricos em plantas de girassol. A: variação da assimilação líquida de CO₂ (A), condutância estomática (g_s) em função da propagação de sinais elétricos em E1- eletrodo do pecíolo da folha de estímulo, E3- eletrodo da nervura central da folha de medidas. B: variação do CO₂ intercelular (C_i), e taxa de transpiração (E). As setas pretas apontam o momento da aplicação do estímulo

Acredita-se que o surgimento e propagação dos PVs esteja associado a variação de pressão hidrostática nos tecidos vegetais, produzida em resposta a estímulos de origem mecânica (DZIUBIŃSKA; TRĘBACZ; ZAWADZKI, 2001), pela propagação de sinal químico (VODENEEV et al., 2015), ou pela combinação de sinais químicos e e hidráulicos (VODENEEV et al., 2012). Em comparação aos sinais químicos e elétricos, os sinais hidráulicos possuem maior velocidade de propagação (HUBER; BAUERLE, 2016), sendo

percebidos em células adjacentes aos vasos condutores promovendo alterações de fluxo iônico com consequente alteração de potencial de membranas destas células (DZIUBIŃSKA; TRĘBACZ; ZAWADZKI, 2001). Desta forma, a variações de pressão hidráulica e a propagação dos PVs estaria intimamente relacionada. O que ocorre, é que variações de tensão nos tecidos foliares, estão associadas a variações no grau de abertura dos estômatos, e estes a disponibilidade de CO_2 para a fotossíntese.

Segundo Jones (1998) g_s é capaz de regular A e a transpiração (E), e estes, por sua vez, podem contra regular g_s . Em condições de E elevado o suprimento de água nas células guarda dos estômatos é reduzido promovendo o fechamento estomático reduzindo a transpiração (EAMUS, 1999). Da mesma forma, quando A mantiver-se reduzido haverá condição para que a concentração intercelular de CO_2 mantenha-se elevada devido ao seu baixo consumo pela fotossíntese, propiciando o fechamento estomático, ao contrário, quando A mantiver-se elevado, o consumo de C_i será aumentado. Nestas condições, quando a concentração intercelular de CO_2 for reduzida haverá favorecimento para a abertura dos estômatos (JONES, 1998).

As variações observadas em A após o estímulo (Figura 10) poderiam estar associadas a mudanças em g_s oriundas da variação do suprimento de água nos tecidos do mesofilo. Entretanto, as alterações observadas em g_s são posteriores a queda de A . Desta forma, é fortalecida a ideia de que estas variações decorrem da propagação do sinal elétrico PV, e não do sinal hidráulico. Estes resultados são similares aos encontrados por Lautner et al. (2005), que avaliaram que a queda em A não esteve associada a mudanças em g_s . Gallé et al. (2013) para investigar uma possível influência de g_s sobre A , forneceu concentração ambiente de CO_2 de 700 μmol para plantas de *Glycine max* L., e observou o mesmo padrão de resposta, indicando que A não é limitada pela condutância estomática ao CO_2 durante os eventos de propagação de sinais elétricos.

Nos resultados obtidos observou-se que a queda em A é anterior as alterações nos demais parâmetros, o que indica que estes não tiveram influência sobre a queda inicial da fotossíntese.

Sukhov et al. (2012) relata que em condições onde não há propagação de sinais elétricos, ou sinais com amplitude reduzida, não houve alterações na fotossíntese. Da mesma forma, o atraso entre o estímulo e as mudanças na fotossíntese aumenta quanto mais distante for o local do estímulo do local de medidas (LAUTNER, 2005).

No presente estudo, não foi encontrada correlação entre a atenuação da amplitude dos sinais com a distância entre a folha de estímulo e a folha de medidas (Tabela 6). Verificou-se

que em folhas opostamente posicionadas do tratamento FOMP, apesar de possuir a menor distância média entre todos os tratamentos, apresentou a maior porcentagem de atenuação, sem eventos de propagação de PVs ou alteração em qualquer variável de trocas gasosas (Figura 16).

Galle et al. (2013) estudando alterações na fotossíntese de *Glycine max* L. em resposta a sinais elétricos induzidos por queima, constatou que o bloqueio do sinal elétrico através do resfriamento do pecíolo da folha de estímulo impediu a propagação do sinal elétrico para a folha de medidas, o que resultou na ausência de alterações nas trocas gasosas, demonstrando assim a relação direta dos sinais elétricos e alterações na fotossíntese.

O mesmo autor observou que a queda em A está relacionada a diminuição da condutância mesofílica ao CO_2 (g_m), entretanto não descarta a influência de g_s para o reestabelecimento do equilíbrio das trocas gasosas após os eventos de sinalização.

4.3 Sinais elétricos e fluorescência da clorofila em girassol

A análise dos efeitos da propagação de sinais elétricos sobre A demonstrou que este tipo de sinalização, quando desencadeada em função do estímulo de queima, promoveu drástica redução nesta variável em folhas intactas distantes do local de estímulo. O estímulo de queima por ser de origem mecânica pode promover alterações de pressão hidráulica nos tecidos. Sendo esta alteração candidata a promover redução em A em função de sua atuação direta sobre a abertura estomática. Nos resultados obtidos, no entanto, observou-se que as alterações em g_s ocorreram posteriormente as alterações em A , além disso apresentou elevação inicial enquanto A era reduzida. O que sugere que os estômatos não estariam oferecendo dificuldades para a entrada de CO_2 no mesofilo foliar, contribuindo para a elevação de C_i enquanto A foi reduzida.

Estes fatos indicam que a redução em A promovida pela sinalização elétrica é regulada por processos distintos ao controle estomático. Desta forma, a análise de alterações no processo fotoquímico da fotossíntese em função da sinalização elétrica pode auxiliar no esclarecimento deste processo.

O parâmetro relacionado a fluorescência da clorofila F_o (fluorescência mínima ou inicial da clorofila “a”) representa a emissão de luz pela molécula de clorofila “a” quando esta encontra-se em estado de excitação anterior à dissipação da energia para os centros de reação do fotossistema II, em uma condição em que todos os aceptores de elétrons quinona (Qa) estejam em estado oxidado, sendo que esta forma de dissipação de energia ocorre independentemente dos eventos fotoquímicos. Este parâmetro é utilizado como referência

para a determinação dos demais parâmetros relacionados a fluorescência, entretanto F_o pode ser afetado por fatores que alterem a estrutura dos pigmentos fotossintéticos ou em caso de danos aos centros de reação do fotossistema II (CONROY, 1986). Neste estudo, este parâmetro foi avaliado anteriormente a aplicação do estímulo. Sua avaliação após o estímulo é impossibilitada devido a necessidade de adaptação da planta a condição de escuro, o que inviabilizaria a avaliação dos parâmetros adaptados a luz que foram determinados antes e depois do estímulo. Portanto, este parâmetro, bem como a fluorescência máxima F_m , F_v e F_v/F_m , todos dependentes da adaptação ao escuro, foram utilizados como indicadores do status inicial das plantas avaliadas.

Para os parâmetros da fluorescência com a planta adaptada ao escuro, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 7).

Tabela 7 - Parâmetros da fluorescência da clorofila determinados anteriormente ao estímulo após adaptação ao escuro por 40 minutos. F_o : fluorescência inicial; F_m : fluorescência máxima; F_v : fluorescência variável e F_v/F_m : rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m)

Tratamento	F_o	F_m	F_v	F_v/F_m
FOMP	327,71 ± 32,09 a	2112,58 ± 120,49 a	1784,86 ± 103,98 a	0,84 ± 0,01 a
FMLAB	327,71 ± 32,09 a	2112,58 ± 120,49 a	1784,86 ± 103,98 a	0,84 ± 0,01 a
FPAB	322,33 ± 24,34 a	2005,92 ± 179,45 a	1683,58 ± 168,06 a	0,84 ± 0,01 a
FMLAC	304,55 ± 18,69 a	2006,56 ± 140,21 a	1702,01 ± 123,60 a	0,85 ± 0,00 a
FPAC	315,80 ± 21,32 a	2073,08 ± 170,90 a	1757,27 ± 170,67 a	0,85 ± 0,02 a

As médias seguidas pela mesma letra minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Dentre estas variáveis F_v/F_m possui grande relevância pois reflete o máximo rendimento quântico do fotossistema II e é uma boa medida de sua saúde. Valores ótimos de F_v/F_m medido em várias espécies de plantas encontraram-se próximos de 0,83 (BJORKMAN; DEMMIG, 1987). Neste experimento os valores obtidos foram iguais ou superiores a 0,84 indicando que não havia limitações a atividade dos fotossistemas antes da aplicação do estímulo. A redução de F_v/F_m para valores abaixo de 0,75 são um indicativo da ocorrência de estresses causadores de fotoinibição.

A avaliação dos parâmetros da fluorescência da clorofila em condições de adaptação a luz demonstrou que a sinalização elétrica é capaz de promover alterações em tais parâmetros.

De forma geral, a ocorrência da propagação dos sinais elétricos, em especial dos PVs, promoveu redução da taxa de transporte de elétrons (ETR), no rendimento quântico do

fotosistema II (Φ_{FSII}), e na dissipação fotoquímica dos fotossistemas (q_P), promovendo elevação em outras formas de dissipação de energia evidenciada no aumento da dissipação não fotoquímica (q_N).

Considerando os tratamentos testados, que diferiam na posição da folha de estímulo em relação a folha de avaliação, em FMLAB foram registradas variações nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila em 5 plantas de um grupo de 10 que propagaram PVs da folha de estímulo para a folha de medidas. Nos demais tratamentos exceto FOMP, apenas uma planta de cada tratamento apresentou alterações nestes parâmetros em resposta ao sinal elétrico (Figuras 18,19, 20, 21 e 22).

Figura 18 - Variação da assimilação taxa de transporte de elétrons (ΔETR), variação da dissipação fotoquímica (Δq_P); variação da dissipação não fotoquímica (Δq_N), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{FSII}) em plantas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha de mesmo lado abaixo da folha de medida (FMLAB)

Figura 19 - Variação da taxa de transporte de elétrons (ΔETR), variação da dissipação fotoquímica (Δq_P); variação da dissipação não fotoquímica (Δq_N), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{FSII}) em plantas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha perpendicular abaixo da folha de medida (FPAB)

Figura 20 - Variação da assimilação taxa de transporte de elétrons (ΔETR), variação da dissipação fotoquímica (Δq_P); variação da dissipação não fotoquímica (Δq_N), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{FSh}) em plantas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha oposta e de mesmo par da folha de medida (FOMP)

Figura 21 - Variação da assimilação taxa de transporte de elétrons (ΔETR), variação da dissipação fotoquímica (Δq_P); variação da dissipação não fotoquímica (Δq_N), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{FSII}) em plantas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha de mesmo lado acima da folha de medida (FMLAC)

Figura 22 - Variação da assimilação taxa de transporte de elétrons (ΔETR), variação da dissipação fotoquímica (Δq_P); variação da dissipação não fotoquímica (Δq_N), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{FSII}) em plantas de girassol após estímulo de queima aplicado na folha perpendicular acima da folha de medida (FPAC)

Igualmente ao resultado observado para trocas gasosas a hiperpolarização de membranas registrada no tratamento FOMP em resposta ao estímulo não resultou em alterações nos parâmetros de fluorescência da clorofila.

A análise das variações dos parâmetros da fluorescência em relação ao tempo para a sua alteração após o estímulo revela que para todos os tratamentos ETR e q_P sofreram

alterações anteriormente aos demais parâmetros, sugerindo que a propagação dos PVs e seus efeitos sobre a fotossíntese pode estar relacionado a alterações nestes parâmetros (Tabela 8).

Tabela 8 - Variação dos parâmetros da fluorescência da clorofila após a aplicação do estímulo de queima em folhas de girassol adaptadas a luz. Φ_{FSII} : rendimento quântico efetivo do fotossistema II; q_P : dissipação fotoquímica; q_N : dissipação não fotoquímica; ETR : taxa de transporte de elétrons. Amplitude do PV registrado no pecíolo da folha de medidas. Min: tempo em minutos após a aplicação do estímulo

Tratamento	Φ_{FSII}	Min.	q_P	Min.	q_N	Min.	ETR	Min.	Amplitude
FOMP	0	0	0		0		0		0
FMLAB	-0,070	9	-0,215	3,4	0,068	7,4	-69,1	3,6	74,9
FPAB	-0,063	11	-0,027	4	0,051	11	-12,8	6	12,5
FPAC	-0,049	8	-0,264	4	0,026	9	-77,6	4	57,9
FMLAC	-0,026	9	-0,070	5	0,024	9	-23,9	9	17,4

As Figuras 23 e 24 demonstra o momento em que q_N e Φ_{FSII} , respectivamente, são alterados em função da propagação dos sinais elétricos. Observa-se que antes do declínio a Φ_{FSII} apresenta uma pequena elevação. Esta elevação não é retratada na literatura para respostas a propagação de sinais elétricos. Observa-se que q_N eleva-se posteriormente a passagem do PV e após a redução em A. Segundo Bulychev e Kamzolkin (2006) a elevação de q_N (um mecanismo que converte o excesso de excitação da clorofila em calor) pode ocorrer em resposta a alteração tilacoidal de pH e a redução de Φ_{FSII} pela interrupção do fluxo de íons H^+ através da membrana plasmática.

Estas explicações poderiam esclarecer os efeitos do sinal elétrico sobre q_N e Φ_{FSII} , entretanto não elucidam os efeitos desta sinalização sobre A, uma vez que, neste estudo, observou-se que a elevação de q_N e a queda de Φ_{FSII} ocorreram com atraso em relação a queda de A, desta forma, parecem não ser os responsáveis pela diminuição da assimilação de CO_2 .

Figura 23 - Variação da assimilação líquida de CO_2 (ΔA) e na dissipação não fotoquímica dos fotossistemas (Δq_N) em função da propagação de sinais elétricos em plantas de girassol. E1- eletrodo do pecíolo da folha de estímulo, E3- eletrodo da nervura central da folha de medidas. As setas pretas apontam o momento da aplicação do estímulo

Figura 24 - Variação da assimilação líquida de CO_2 (ΔA) e n rendimento quântico do fotossistema II ($\Delta \Phi_{FSII}$) em função da propagação de sinais elétricos em plantas de girassol. E1- eletrodo do pecíolo da folha de estímulo, E3- eletrodo da nervura central da folha de medidas. As setas pretas apontam o momento da aplicação do estímulo

Nas Figuras 25 e 26 observa-se as respostas de A ao PV, bem como, a redução em ETR e q_P respectivamente. Observa-se que estes parâmetros alteram-se simultaneamente com A .

Figura 25 - Variação da assimilação líquida de CO₂ (ΔA) e na taxa e transporte de elétrons (ΔETR) em função da propagação de sinais elétricos em plantas de girassol. E1- eletrodo do pecíolo da folha de estímulo E3- eletrodo da nervura central da folha de medidas. As setas pretas apontam o momento da aplicação do estímulo

Figura 26 - Variação da assimilação líquida de CO_2 (ΔA) e da dissipação fotoquímica dos fotossistemas (Δq_P) em função da propagação de sinais elétricos em plantas de girassol. E1- eletrodo do pecíolo da folha de estímulo, E3- eletrodo da nervura central da folha de medidas. As setas pretas apontam o momento da aplicação do estímulo

Sherstneva et al. (2016), estudando os efeitos de PVs induzidos por queima sobre a fotossíntese, observou relação entre a queda de A com a elevação da dissipação não fotoquímica. O mesmo autor correlacionou a elevação da dissipação não fotoquímica a alterações do pH intracelular.

Outras hipóteses consideradas para a inativação da fotossíntese induzido por sinais elétricos em plantas incluem o aumento na concentração de Ca^{2+} no citoplasma e, posteriormente, no estroma do cloroplasto, como início da inativação da fotossíntese. O aumento na concentração citossólica de Ca^{2+} é documentada para PAs e PVs e estaria relacionado a inativação do ciclo de Calvin-Benson (BULYCHEV; KOMAROVA, 2014). A segunda hipótese considera que as alterações na fotossíntese estão relacionadas a mudanças no pH intracelular e extracelular (SUKHOV et al., 2013; SHERSTNEVA et al., 2016). Neste processo a inativação da H^+ - ATPase possui papel chave nas alterações de pH e estaria envolvida em PAs e PVs (VODENEEV; AKINCHITS; SUKHOV, 2015).

Desta forma, uma paralização do ciclo de Calvin-Benson pode indiretamente acarretar na redução do fluxo de elétrons através dos fotossistemas pelo esgotamento do pool de NADP^+ e ADP, resultando na redução de ETR , e consequente elevação das outras vias de

dissipação de energia de excitação das clorofilas que não a via fotoquímica. Como resultado observa-se a imediata redução de q_P .

5 CONCLUSÃO

Os sinais gerados e propagados em resposta a queima foram classificados como potenciais de variação.

Os potenciais de variação propagaram-se com maior facilidade na direção acrópeta e entre folhas com provável conexão vascular entre si.

Potenciais sistêmicos foram gerados em resposta ao estímulo de queima em folhas opostas quando não houve propagação de potenciais de variação.

Os potenciais de variação promoveram redução na assimilação líquida de CO₂, seguida elevação e posterior queda na condutância estomática, e na concentração intercelular de CO₂.

A redução na assimilação líquida de CO₂ em resposta a potenciais de variação, provavelmente está relacionada a inativação da fase bioquímica da fotossíntese, uma vez que, esteve acompanhada de queda da dissipação fotoquímica dos fotossistemas e da taxa de transporte de elétrons.

REFERÊNCIAS

- BALUSKA, F.; MANCUSO, S. Plant neurobiology: from stimulus perception to adaptive behavior of plants, via integrated chemical and electrical signaling. **Plant Signaling & Behavior**, London, v. 4, n. 6, p. 475–476, 2009.
- BOSE, J. C.; DAS, G. P. Physiological and Anatomical Investigations on *Mimosa pudica*. **Proceedings of the Royal Society. B: Biological Sciences**, Calcutta, v. 98, n. 690, p. 290–312, 1925.
- BRENNER, E.D.; STAHLBERG, R.; MANCUSO, S.; VIVANCO, J.; BALUŠKA, F.; VOLKENBURG, V.E. Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling. **Trends in Plant Science**, London, v. 11, p. 413–419, 2006.
- BULYCHEV, A.A.; KAMZOLKINA, N.A. Effect of action potential on photosynthesis and spatially distributed H⁺ fluxes in cells and Chloroplasts of *Chara corallina*. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 53, n. 1, p. 1–9, 2006.
- BULYCHEV, A.A.; KOMAROVA, A.V. Long-distance signal transmission and regulation of photosynthesis in characean cells. **Biochemistry**, Moscow, v. 79, n. 3, p. 273–281, 2014.
- CARPANETO, A.; IVASHIKINA, N.; LEVCHENKO, V.; KROL, E.; JEWORUTZKI, E.; ZHU, JIAN-KANG; HEDRICH, R. Cold transiently activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, n. 1, p. 487–494, 2006.
- CHRISTMANN, A.; WEILER, E.W.; STEUDLE, E.; GRILL, E. A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. **The Plant Journal**, Malden, v. 53, p. 167–174, 2007.
- COSTANZO, L.S. Fisiologia celular. In: _____. (Ed.). **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. cap. 1, p. 1–44.
- DAVIES, E. New functions for electrical signals in plants. **New Phytologist**, Lancaster, v. 161, p. 607–610, 2004.
- DAVIES, E.; STANKOVIC, B. (2006) Electrical signals, the cytoskeleton, and gene expression: a hypothesis on the coherence of the cellular responses to environmental insult. In: BALUSKA, F.; MANCUSO, S.; VOLKMANN, D. (Ed.). **Communication in plants: neuronal aspects of plant life**. Berlin: Springer, 2006. chap. 21, p. 309–320.
- DAVIES, E.; ZAWADZKI, T.; WITTERS, D. Electrical activity and signal transmission in plants: how do plants know? In: PENEL, C.; GREPPIN, H. (Ed.). **Plants signaling, plasma membrane and change of state**. Geneva: University of Geneva, 1991. p. 119–137.
- DAVIES, W.J. Regulation of leaf and fruit growth in plants growing in drying soil: exploitation of the plants' chemical signalling system and hydraulic architecture to increase the efficiency of water use in agriculture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 350, p. 1617–1626, 2000.

DIETRICH, P.; SANDERS, D.; HEDRICH, R. The role of ion channels in light-dependent stomatal opening. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 363, p. 1959–1967, 2001.

DZIUBINSKA, H. Ways of signal transmission and physiological role of electrical potentials in plants. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Wroclaw, v. 72, p. 309–318, 2003.

DZIUBINSKA, H.; TREBACZ, K.; ZAWADZKI, T. The effect of excitation on the rate of respiration in the liverwort *Conocephalum conicum*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 75, p. 417–23, 1989.

_____. Transmission route for action potentials and variation potentials in *Helianthus annuus* L. **Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 158, n. 9, p. 1167–1172, 2001.

EAMUS, D. Ecophysiological traits of deciduous and evergreen woody species in the seasonally dry tropics. **Tree**, Berlin, v. 14, n. 1, p. 0169–5347, 1999.

FROMM, J.; ESCHRICH, W. Transport process in stimulated and non-stimulated leaves of *Mimosa pudica*. I. The movement of ¹⁴C-labelled photo assimilates. **Trees**, Berlin, v. 2, p. 7–17, 1988.

FROMM, J.; FEI, H. Electrical signalling and gas exchange in maize plants of drying soil. **Plant Science**, Clare, v. 132, p. 203–213, 1998.

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

FROMM, J.; HAJIREZAEI, M.R.; BECKER, V.; LAUTNER, S. Electrical signaling along the phloem and its physiological responses in the maize leaf. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 239, p. 1–7, 2013.

GALLÉ, A.; LAUTNER, S.; FLEXAS, J.; FROMM, J. Environmental stimuli and physiological responses: the current view on electrical signaling. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 114, p. 15–21, 2015.

GALLÉ, A.; LAUTNER, S.; FLEXAS, J.; RIBAS-CARBO, M.; HANSON, D.; ROESGEN, J.; FROMM, J. Photosynthetic responses of soybean (*Glycine max* L.) to heat-induced electrical signaling are predominantly governed by modifications of mesophyll conductance for CO₂. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 36, p. 542–552, 2013.

GRADMANN, D. “Metabolic” action potential in *Acetabularia*. **Journal of Membrane Biology**, New York, v. 29, p. 23–45, 1976.

GRAMS, T.E.E.; KOZIOLOEK, C.; LAUTNER, S.; MATYSSEK, R.; FROMM, J. Distinct roles of electric and hydraulic signals on the reaction of leaf gas exchange upon reirrigation in *Zea mays*. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 30, p. 79–84, 2007.

GRAMS, T.E.E.; LAUTNER, S.; FELLE, H.H.; MATYSSEK, R.; FROMM, J. Heat-induced electrical signals affect cytoplasmic and apoplastic pH as well as photosynthesis during propagation through the maize leaf. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 319–326, 2009.

HILLE, B. Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. **Biophysical Journal**, Washington, v. 22, n. 2, p. 283–294, 1978.

HUBER, A.E.; BAUERLE, T.L. Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 67, n. 7, p. 2063–2079, 2016.

JONES, H.G. Stomatal control of photosynthesis and transpiration. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, p. 387–398, 1998. Special issue.

KATICHEVA, L; SUKHOV, V; AKINCHITS, E; VODENEEV, V. Ionic nature of burn-induced variation potential in wheat leaves. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 55, n. 8, p. 1511–1519, 2014.

KATICHEVA, L; SUKHOV, V; BUSHUEVA, A; VODENEEV, V. Evaluation of the open time of calcium channels at variation potential generation in wheat leaf cells. **Plant Signaling & Behavior**, London, v. 10, n. 3, p. 2311–2314, 2015.

KOZIOLEK, C.; GRAMS, T.E.E.; SCHREIBER, U.; MATYSSEK, R.; FROMM, J. Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals. **New Phytologist**, Lancaster, v. 161, p. 715–722, 2004.

KROL, E.; DZIUBINSKA, H.; TREBACZ, K. What do plants need action potentials for? In: DUBOIS, M.L. (Ed.). **Action potential**. New York: New Science, 2010. p. 1–28.

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

LOHSE, G.; HEDRICH, R. Characterization of the plasma-membrane H(+)-ATPase from *Vicia faba* guard cells : Modulation by extracellular factors and seasonal changes. **Planta**, New York, v. 188, n. 2, p. 206–214, 1992.

MACEDO, F.C.O. **Electrical signaling, gas exchange and turgor pressure in ABA-deficient tomato (cv. Micro-Tom) under drought**. 2015. 98 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

MAFFEI, M.; BOSSI, S. Electrophysiology and plant responses to biotic stress. In: VOLKOV, A.G. (Ed.). **Plant electrophysiology: theory and methods**. Berlin: Springer-Verlag, 2006. p. 461–481.

MANTRI, N.; PATADE, V.; PENNA, S.; FORD, R.; PANG, E. Abiotic stress responses in plants: present and future. In: AHMAD, P.; PRASAD, M.N.V. (Ed.). **Abiotic stress responses in plants**. New York: Springer New York, 2012. p. 1–19.

MOUSAVI, S.A.R.; CHAUVIN, A.; PASCAUD, F.; KELLENBERGER, S.; FARMER, E. Glutamate receptor-like genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. **Nature**, London, v. 500, n. 7463, p. 422–426, 2013.

NATH, K.; JAJOO, A.; POUDYAL, R.S.; TIMILSINA, R.; PARK, Y.S.; ARO, EVA-MARI.; NAMB, H.G.; LEE, C.H. Towards a critical understanding of the photosystem. II repair mechanism and its regulation during stress conditions. **Febs Letters**, Heidelberg, v. 587, n. 21, p. 3372–3381, 2013.

OPRITOV, V.A.; PYATYGIN, S.S.; VODENEEV, V.A. Direct coupling of action potential generation in cells of a higher plant (*Cucurbita pepo*) with the operation of an electrogenic pump. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 49, p. 142–147, 2002.

PASZEWSKI, A.; ZAWADZKI, T. Action potentials in *Lupinus angustifolius* L. shoots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 24, p. 804–809, 1973.

PAVLOVIĆ, A. The effect of electrical signals on photosynthesis and respiration. In: VOLKOV, A.G. (Ed.). **Plant Electrophysiology**. Berlin; Heidelberg: Springer, 2012. p. 33–62.

SALVADOR-RECATALÀ, V.; TJALLINGII, W.F.; FARMER, E. Real-time, in vivo intracellular recordings of Caterpillar-induced depolarization waves in sieve elements using aphid electrodes. **New Phytologist**, Lancaster, v. 203, p. 674–684, 2014.

SHERSTNEVA, O.N.; SUROVA, L.M.; VODENEEV, V.A.; PLOTNIKOVA, Y.I.; BUSHUEVA, A.V.; SUKHOV, V.S. The role of the intra- and extracellular protons in the photosynthetic response induced by the variation potential in pea seedlings. **Biochemistry Moscow, Series A: Membrane and Cell Biology**, Moscow, v. 10, n. 1, p. 60–67, 2016. Supplement.

STAHLBERG, R.; COSGROVE, D. Induction and ionic basis of slow wave potentials in seedlings of (*Pisum sativum* L). **Planta**, New York, v. 200, n. 4, p. 416–425, 1996.

STAHLBERG, R.; CLELAND, R.E.; VAN VOLKENBURGH, E. Decrement and amplification of slow wave potentials during their propagation in (*Helianthus annuus* L) shoots. **Planta**, New York, v. 220, n. 4, p. 550–558, 2005.

STANKOVIĆ, B.; ZAWADZKI, T.; DAVIES, E. Characterization of the variation potential in sunflower. **Plant Physiology**, Rockville, v. 115, p. 1083–1088, 1997.

STEWART, F.C. (Ed.). **Water and solutes in plants**. New York: Academic Press, 1986. v.11, p. 611.

SUKHOV, V. Electrical signals as mechanism of photosynthesis regulation in plants. **Photosynthesis Research**, Boston, p. 1–15, 2016.

SUKHOV, V.; AKINCHITS, E.; KATICHEVA, L.; VODENEEV, V. Simulation of variation potential in higher plant cells. **The Journal of Membrane Biology**, New York, v. 246, n. 4, p. 287–296, 2013.

SUKHOV, V.; MYSYAGIN, S.; SINITSINA, J.; VODNEEV, V. Analysis of the photosynthetic response induced by variation potential in geranium. **Planta**, New York, v. 235, n. 4, p. 703–712, 2012.

SUKHOV, V.; SHERSTNEVA, O.; SUROVA, L.; KATICHEVA, L.; VODNEEV, V. Proton cellular influx as a probable mechanism of variation potential influence on photosynthesis in pea. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 37, n. 11, p. 2532–2541, 2014.

SUKHOV, V.; SUROVA, L.; SHERSTNEVA, O.; KATICHEVA, L.; VODNEEV, V. Variation potential influence on photosynthetic cyclic electron flow in pea. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 1–13, 2015.

TARDIEU, F.; DAVIES, W.J. Integration of hydraulic and chemical signaling in the control of stomatal conductance and water status of droughted plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 16, p. 341–349, 1993.

TREBACZ, K.; DZIUBINSKA, H.; KROL, E. Electrical signals in long-distance communication in plants. In: BALUSKA, F.; MANCUSO, S.; VOLKMANN, D. (Ed.). **Communication in plants**. Berlin: Springer-Verlag, 2006. p. 277–290.

VODNEEV, V.; AKINCHITS, E.; SUKHOV, V. Variation potential in higher plants: mechanisms of generation and propagation. **Plant Signaling & Behavior**, London, v. 10, n. 9, p. 1–7, 2015.

VODNEEV, V.; ORLOVA, A.; MOROZOVA, E.; ORLOVA, L.; AKINCHITS, E.; ORLOVA, O.; SUKHOV, V. The mechanism of propagation of variation potentials in wheat leaves. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 169, n. 10, p. 949–954, 2012.

WAGNER, E.; LEHNER, L.; NORMANN, J.; VEIT, J.; ALBRECHTOVÁ, J. (2006) Hydroelectrochemical integration of the higher plant: basis for electrogenic flower induction. In: BALUSKA, F.; MANCUSO, S.; VOLKMANN, D. (Ed.). **Communication in plants**. Berlin: Springer, 2006. p. 369–387.

YAN, X.; WANG, Z.; HUANG, L.; WANG, C.; HOU, R.; XU, Z.; QIAO, X. Research progress on electrical signals in higher plants. **Progress in Natural Science**, London, v. 19, p. 531–541, 2009.

ZIMMERMANN, M.R.; MAISCHAK, H.; MITHOFER, A.; BOLAND, W.; FELLE, H.H. System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, p. 1593–1600, 2009.

ZIMMERMANN, M.R.; MITHOFER, A.; WILL, T.; FELLE, H.H.; FURCH, A.C.U. Herbivore-triggered electrophysiological reactions: candidates for systemic signals in higher plants and the challenge of their identification. **Plant Physiology**, Rockville, v. 170, n. 4, p. 2407–2419, 2016.

ZIVCAK, M.; BRESTIC, M.; BALATOVA, Z.; DREVENAKOVA, P.; OLSOVSKA, K.; KALAJI, H.M.; YANG, X.; ALLAKHVERDIEV, S.I. Photosynthetic electron transport and specific photoprotective responses in wheat leaves under drought stress. **Photosynthesis Research**, Boston, v. 117, n. 1/3, p. 529, 2013.