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

**Sinalização elétrica de longa distância pós-irrigação em plantas de girassol
sob déficit hídrico**

Gabriel Silva Daneluzzi

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

**Piracicaba
2016**

Gabriel Silva Daneluzzi
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

Sinalização elétrica de longa distância pós-irrigação em plantas de girassol sob déficit hídrico

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**

Daneluzzi, Gabriel Silva

Sinalização elétrica de longa distância pós-irrigação em plantas de girassol sob déficit hídrico / Gabriel Silva Daneluzzi. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
61 p. : il.

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

1. Sinais elétricos 2. Potencial de ação 3. Eletrodos extracelulares I. Título

CDD 633.39
D179s

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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Benedito e Fátima, e
minha irmã Natália, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus caminhos e pela proteção.

Ao meu pai Benedito e minha mãe Fátima, por serem meus melhores exemplos, terem me incentivado a me dedicar nos estudos e pelo amor incondicional, e minha irmã Natália pelo apoio em todas as horas.

Ao restante da família, tios(as), primos(as), avós pelo incentivo.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” por fornecer condições para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu orientador, prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira, exemplo de homem e professor, por todos os ensinamentos ao longo desses anos e por nunca medir esforços para fornecer tudo de melhor para os alunos.

À CAPES pela concessão de bolsa de doutorado.

Ao programa de pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

Aos colegas do LEPSE, Francynês da Conceição Oliveira Macedo, Diogo Capelin, Aécio Mendes da Silva, Natália Couto Salib, Fábria Barbosa da Silva, Marina Otto pela excelente convivência e pelas discussões científicas de grande valia.

Aos colegas de pós-graduação Karina Lima Reis, Lucas Baiochi Riboldi, Mateus Henrique Vicente pelo intercâmbio de ideias.

Aos funcionários do departamento Francisco Xavier Vitti, José Francisco Rodrigues, Romeu Rocha e Robson Couto.

Aos amigos de Osvaldo Cruz e de graduação em Assis pela força de sempre. Amizade eterna.

Ao sr. Amaury de Sordi Abdala pela ajuda na correção dos ruídos dos sistemas de medição de sinais elétricos. Assessoria fundamental.

À secretária do programa de pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Maria Solizete Granziol Silva, pela competência e disponibilidade em sempre ajudar e entender os dramas vivenciados pelos alunos.

Por fim agradeço minha namorada Simone Missae Tanaka por sempre estar ao meu lado, nos momentos bons e ruins, sempre atenciosa e disposta a ajudar no que fosse preciso e a família Tanaka pelo incentivo.

“A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Objetivo	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Mecanismos de sinalização.....	19
2.2. Tipos de sinais de longas distâncias	19
2.2.1 Sinais hidráulicos.....	19
2.2.2 Sinais químicos	20
2.2.3 Sinais elétricos	21
2.3 Técnicas de medição de sinais elétricos.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Material vegetal e condições de cultivo	27
3.2 Tratamento de déficit hídrico	27
3.3 Análises eletrofisiológicas	27
3.3.1 Gaiolas de Faraday e rede elétrica.....	27
3.3.2 Eletrodos	29
3.3.3 Sistema de aquisição de dados.....	31
3.3.4. Características dos potenciais de ação	32
4 RESULTADOS	35
4.1 Características dos PAs gerados após irrigação	35
4.2 Descrição das condições das plantas quanto ao período sem água e os sinais gerados.....	37
4.2.1 Planta 1.....	37
4.2.2 Planta 2.....	38
4.2.3 Planta 3.....	39
4.2.4 Planta 4.....	40
4.2.5 Planta 5.....	40
4.2.6 Planta 6.....	41
4.2.7 Planta 7.....	42
4.2.8 Planta 8.....	42
4.2.9 Planta 9.....	43
4.2.10 Planta 10.....	44
4.2.11 Planta 11	44
5 DISCUSSÃO.....	47
6 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	55

RESUMO

Sinalização elétrica de longa distância pós-irrigação em plantas de girassol sob déficit hídrico

Uma propriedade fundamental dos seres vivos é a condução de sinais elétricos através de seus tecidos. Mas esse fato pouco é lembrado quando se trata de organismos vegetais. Outro item fundamental é a geração de sinais que possam transmitir informações entre os tecidos e órgãos para um ajuste fino do metabolismo. Nas plantas esses sinais podem ser de natureza química, hidráulica e elétrica. Nesse último caso são conhecidos potenciais de ação (PA), de variação (PV), de ferimentos (WP) e sistêmicos (SP), cada um com sua particularidade quanto à amplitude, velocidade e rotas de propagação, bem como seu papel no metabolismo. Os sinais elétricos podem afetar a respiração, fotossíntese, absorção de água, ativação de genes e fechamento de folhas de plantas insetívoras. PAs podem se propagar com velocidade relativamente constante e sem decréscimo. Eles seguem a lei do tudo-ou-nada, ou seja, todo estímulo que desencadeia um PA deve atingir um limiar de excitação para desencadear o sinal. Assim que o limiar é atingido o sinal se autoperpetua ao passo que estímulos supra limiares desencadeiam PAs de amplitude constante. A via de propagação do PA é o vaso do floema. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a sinalização elétrica em resposta à irrigação em plantas de girassol sob déficit hídrico e caracterizar esse sinal quanto à amplitude, duração, velocidade e direção de propagação. Para tanto 37 plantas foram avaliadas por meio de eletrodos extracelulares. Elas foram monitoradas eletrofisiologicamente durante um período em que eram irrigadas e em um período sob déficit hídrico. Desse montante, onze responderam à irrigação pela geração de potenciais de ação (PA), ou seja, 30% delas. Oito delas geraram PAs em direção ao ápice (propagação acrópeta) enquanto duas geraram na direção basípeta. Uma delas gerou nos dois sentidos. O PA foi gerado também pós-irrigação mesmo com a planta não tendo passado por déficit hídrico, porém só aconteceu em uma das onze plantas. Os sinais se propagaram no caule, pecíolo e nervura central das folhas. O potencial de ação é gerado após irrigação em plantas de girassol com maior frequência quando elas passam por período de déficit hídrico e se propagam por toda a planta. Isso evidencia o papel do PA na sinalização de longa distância nos vegetais.

Palavras-chave: Sinais elétricos; Potencial de ação; Eletrodos extracelulares

ABSTRACT

Long-distance electrical signaling after irrigation in sunflower plants under drought

A fundamental property in the living beings is the conduction of electrical signals through their tissues. However, this fact is not always remembered when it comes to plant organisms. Another key process is the generation of signals that can transmit information among tissues and organs to a fine-tuning of the metabolism. In plants, these signals can be chemical, hydraulic and electrical. Concerning the last one, action potentials (AP), variation potentials (VP), wound potentials (WP) and system potentials (SP) are known; each one with its particularity regarding amplitude, velocity and propagation routes as well as its role in metabolism. The electrical signals may affect respiration, photosynthesis, water uptake, activation of genes and leaf closure in insectivorous plants. APs can spread with relatively constant speed and no decrement. They follow the all-or-nothing law, in other words, every stimulus that triggers an AP must reach a threshold to trigger the signal. Once the threshold is reached, the signal is self-perpetuating while stimuli above threshold trigger APs with constant amplitude. The propagation path of the AP is the phloem vessel. The aim of this work was to evaluate the electrical signaling in response to irrigation in sunflower plants under water deficit and characterize the AP regarding its amplitude, duration, velocity and propagation direction. Thirty seven plants were analyzed using extracellular electrodes. They were electrophysiologically monitored during a period when irrigated and in a period under drought. Eleven plants generated AP after irrigation, i.e. 30%. Eight of them generated AP that propagated acropetally while two generated in basipetal direction. One generated in both directions. The action potential was also generated in a plant that was not under drought stress, however it just happened in one of the eleven plants. The signals propagated in the stem, petiole and midrib of the leaves. The action potential is generated after irrigation in sunflower plants more frequently when they go through a period of water deficit and propagate throughout the plant. This highlights the role of AP in long-distance signaling in plants.

Keywords: Electrical signals; Action Potential; Extracellular electrodes

1 INTRODUÇÃO

A habilidade de perceber e responder a estímulos ambientais é uma característica comum de todos os seres vivos. Isso é particularmente significativo para as plantas por causa da necessidade de gerir toda informação oriunda do ambiente e do seu meio interno estando presas ao solo. Elas sobrevivem em um ambiente em constante mudança e embora nem todas as suas partes estejam expostas ao mesmo estímulo ao mesmo tempo, diferentes órgãos devem responder de maneira coordenada (MANCUSO; MUGNAI, 2006).

Uma propriedade fundamental de todos os organismos vivos é a geração e condução de sinais elétricos através de seus tecidos. Animais possuem um sistema nervoso que permite a rápida transmissão de sinais elétricos entre diferentes partes de seu corpo. Esse circuito elétrico é baseado em uma densa rede de células nervosas conectadas pelos axônios, que operam como cabos para conduzir informação codificada pelo número e frequência de potenciais de ação (PA) (HEDRICH; SALVADOR-RECATALÀ; DREYER, 2016).

Por outro lado, as plantas não têm células nervosas especializadas como neurônios, mas similarmente aos animais, propagam sinais por longas distâncias. Por anos, os pesquisadores têm concentrado seus esforços no estudo de sinais químicos e hidráulicos, negligenciando o fato de que as plantas também se utilizam de sinais elétricos. O primeiro registro de um potencial de ação em vegetais foi feito em uma planta insetívora em 1873 (BURDON SANDERSON, 1873). Porém muitos aspectos da excitabilidade em organismos vegetais ainda não estão totalmente elucidados (KRÓL; DZIUBIŃSKA; TREBACZ, 2010; HEDRICH; SALVADOR-RECATALÀ; DREYER, 2016).

Hoje é compreendido, tanto em animais quanto em plantas, que: (i) o fluxo iônico através da membrana plasmática fornece as bases biofísicas para o PA; (ii) a transmissão do PA é eletrotônica, sem atenuação e é seguida de um período refratário; (iii) o PA obedece a lei do “tudo-ou-nada”; (iv) PAs são iniciados e propagados por tecidos excitáveis para controlar uma grande quantidade de respostas indispensáveis para crescimento, aquisição de nutrientes, reprodução e defesa contra agentes bióticos e abióticos. O mecanismo do PA é eletroquimicamente governado pelas propriedades seletivas da membrana plasmática com canais iônicos e bombas de H^+ trabalhando em sintonia (KRÓL; DZIUBIŃSKA; TREBACZ, 2010).

Outros sinais elétricos já conhecidos e exclusivos de plantas são o potencial de variação, o potencial de ferimento e o potencial sistêmico. Com relação ao papel fisiológico dos sinais elétricos, existem numerosos exemplos. Eles controlam movimentos rápidos em

folhas de plantas insetívoras, afetam absorção de nutrientes, respiração, fotossíntese, transporte no floema, expressão gênica entre outros (GALLÉ et al., 2015).

A sinalização de longa distância em plantas sob déficit hídrico tem despertado o interesse dos pesquisadores já que a falta d'água pode causar danos severos aos vegetais. Além disso, em um contexto de mudanças climáticas globais, com alterações no padrão de chuvas e a previsão de que nos próximos anos a agricultura não será capaz de alimentar toda a população do planeta, o estudo de plantas sob estresse hídrico tem se tornado cada vez mais importante.

Diversas plantas com importância agrônômica já foram estudadas quanto à sinalização elétrica, entre elas, milho, cevada, girassol, tomateiro, videira, abacateiro, além da planta modelo *Arabidopsis* (STANKOVIC et al., 1998; FELLE; ZIMMERMANN, 2007; GRAMS et al., 2007; GIL et al., 2009; GALLÉ et al., 2015; MACEDO et al., 2015). Sinais elétricos também foram registrados no musgo *Physcomitrella patens* (KOSELSKI et al., 2008) e em algas (JOHNSON et al., 2002).

O girassol é um objeto frequente de estudo em Eletrofisiologia Vegetal, tendo sido caracterizado quanto à geração de potenciais de ação induzidos, potenciais de ação espontâneos, potenciais de variação e rotas de propagação dos sinais elétricos (ZAWADZKI et al., 1991; ZAWADZKI; DAVIES; DZIUBINSKA, 1995; STANKOVIC; ZAWADZKI; DAVIES, 1997; STANKOVIC et al., 1998). No entanto, ainda não foi caracterizado quanto à geração de sinais elétricos pós-irrigação. Conhecer as características desse sinal é fundamental para entender se ele carrega informações do solo para a parte aérea das plantas, mais especificamente para as folhas, o local que controla a perda de água.

Na verdade, os estudos de sinalização elétrica em plantas sob déficit hídrico são escassos. Alguns pesquisadores têm proposto que medidas automáticas e contínuas da diferença de potencial elétrico entre tecidos vegetais possam ser efetivamente usadas como ferramentas alternativas para avaliar condições de estresse precocemente em plantas (OYARCE; GUROVICH, 2010). A técnica de medição elétrica extracelular, juntamente com o monitoramento ambiental com estações meteorológicas e equipamentos de medição do conteúdo de água do solo, pode ser usada, no futuro, em condições de campo para um planejamento mais preciso de irrigação (GUROVICH; HERMOSILLA, 2009).

Diante do exposto a hipótese deste trabalho é que a irrigação gera sinais elétricos na direção acrópeta em plantas de girassol sob déficit hídrico.

1.1 Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a sinalização elétrica em resposta à irrigação em plantas de girassol sob déficit hídrico e caracterizar os sinais gerados quanto à amplitude, duração, velocidade e direções de propagação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mecanismos de sinalização

Vivendo em um ambiente em constante mudança e presas ao solo, as plantas tiveram que desenvolver a capacidade de perceber e responder a diversos estímulos, sejam eles danosos ou não (JIA; ZHANG, 2008).

As plantas frequentemente têm que lidar com uma enorme gama de estresses abióticos e bióticos, isolados ou ao mesmo tempo. Estresses abióticos são causados por agentes físicos como salinidade, água, luz, calor, frio etc. Já os estresses bióticos são causados por herbívoros e patógenos. A habilidade do vegetal em reagir e sobreviver a esses agentes depende da efetividade dos mecanismos de defesa e vias de sinalização levando a um aumento na sua tolerância e/ou resistência a situações estressantes (HUBER; BAUERLE, 2016).

A resposta sistêmica de plantas à infecção por patógenos (Resistência Sistêmica Adquirida, SAR) ou ferimentos tem sido extensivamente estudada e é constituída por uma rede de numerosos compostos e sinais, incluindo ácido salicílico e proteínas relacionadas à patogênese. Estudos recentes ressaltaram um novo tipo de resposta sistêmica, chamada Aclimação Sistêmica Adquirida (SAA), que surgiu como uma importante resposta de aclimação em plantas a estresses abióticos. Ela inclui espécies reativas de oxigênio (EROs), ácido abscísico (ABA), ondas de cálcio, ondas hidráulicas e sinais elétricos (MITTLER; BLUMWALD, 2015, GILROY et al., 2016)

Após a percepção, e antes da resposta, as plantas precisam interpretar o estímulo e sinalizar para seus tecidos a fim de iniciar uma resposta sistêmica e coordenada. Até o momento são reconhecidos três tipos de sinalização de longa distância: hidráulica, química e elétrica (HUBER; BAUERLE, 2016).

2.2. Tipos de sinais de longas distâncias

2.2.1 Sinais hidráulicos

A água é um meio que conecta todos os órgãos de uma planta sendo um excelente veículo para rápida troca de informações entre eles. Sinais hidráulicos orquestram o comportamento fisiológico das plantas através da regulação da expansão celular (WESTGATE; BOYER, 1984, TANG; BOYER, 2002) que é controlada principalmente pela pressão de turgor celular (TAIZ, 1984).

Essa mudança na pressão se origina nos vasos do xilema e, devido a baixa resistência axial, pode ser propagada rapidamente para as células adjacentes (BRAMLEY et

al., 2007) e, potencialmente, para toda a planta. No entanto, as mudanças de pressão não podem ser percebidas pelas células mortas dos vasos do xilema, sendo decodificadas pelas células do parênquima adjacente que possuem canais mecanossensíveis na membrana plasmática (CHRISTMANN; GRILL; HUANG, 2013).

Em algumas plantas, independentemente do turgor foliar (GOLLAN; PASSIOURA; MUNN, 1986) ou do potencial hídrico foliar (GOWING; DAVIES; JONES, 1990; DAVIES; ZHANG, 1991, YAO; MORESHET; ALONI, 2001), pode ocorrer um decréscimo na condutância estomática durante períodos em que elas estejam sob déficit hídrico, o que pode ser explicado pela ocorrência de pulsos hidráulicos.

Durante estresse osmótico ou hídrico, o início dos sinais hidráulicos se dá na raiz, o primeiro órgão a ser exposto a falta d'água, sendo transmitido através do caule para as folhas onde as células parenquimáticas percebem o sinal (ENDO et al., 2008; CHRISTMANN; GRILL; HUANG, 2013) e induzem a produção de ácido abscísico (ABA) levando ao fechamento estomático (BAUER et al., 2013).

2.2.2 Sinais químicos

Sinais químicos são os mais conhecidos em plantas. No entanto, apesar de seu papel indispensável nas respostas de defesa e aos estresses, é ainda uma questão em aberto se os sinais químicos funcionam exclusivamente a curta distância (HUBER; BAUERLE, 2016).

Vários estudos têm mostrado que hormônios vegetais cruciais para as respostas de estresse/defesa são incapazes de viajar por longas distâncias e têm velocidade de propagação inferior aos sinais hidráulicos e elétricos. Por exemplo, dado que o xilema tem uma taxa de transporte de $0,056 \text{ cm s}^{-1}$ (ZIMMERMANN; BROWN, 1971) é improvável que o ABA vindo das raízes seja o responsável pelo fechamento estomático em situações de seca.

Além do fator taxa de transporte, já foi demonstrado que as plantas podem se ajustar a um estresse hídrico sem mudanças detectáveis no status hídrico foliar devido a ajuste osmótico ou estomático. Dessa maneira os estômatos podem receber um sinal sobre o status hídrico do solo independentemente do status da folha (DAVIES; ZHANG, 1991). Então, em resposta ao déficit hídrico no solo, o ABA não é o único nem o principal sinal das raízes para as folhas.

Ante o exposto, é sugerido a existência de um sistema alternativo e/ou adicional de sinalização de longa distância (ZHANG; DAVIES, 1991, SALIENDRA; SPERRY; COMSTOCK, 1995, WHITEHEAD et al., 1996, WHITEHEAD, 1998).

Substâncias voláteis são outro tipo de sinal a longa distância tanto dentro quanto entre plantas em resposta a ataques de herbívoros e patógenos. Elas podem induzir respostas de defesa sistêmicas em partes distantes da planta e onde falte conexão vascular (FROST et al., 2007).

Por fim, espécies reativas de oxigênio (EROs) foram recentemente identificadas como um possível sinal capaz de viajar longas distâncias (MILLER et al., 2009, MITTLER et al., 2011). Sua rápida velocidade de propagação (até $0,14 \text{ cm s}^{-1}$), sua habilidade de atingir toda a planta a partir do local de origem (raiz, caule ou folha) (MILLER et al., 2009) e sua interconectividade com outras vias de sinalização (elétrica, hidráulica, hormonal, ondas de Ca^{2+}) (MITTLER; BLUMWALD, 2015) as fazem apropriadas como comunicadores de estresses.

2.2.3 Sinais elétricos

O primeiro registro de um sinal elétrico em plantas foi realizado por Burdon Sanderson em *Dionaea muscipula* em 1873 (BURDON SANDERSON, 1873). Hoje é bem estabelecido que sinais elétricos em plantas são rapidamente propagados em resposta a estímulos bióticos e abióticos (MAFFEI; BOSSI, 2006), e são definidos como um desequilíbrio iônico através da membrana plasmática levando a uma variação transiente de voltagem (HUBER; BAUERLE, 2016).

A sensibilidade elétrica dos organismos vivos deriva das membranas que revestem suas células. Graças ao transporte de íons por canais e bombas e suas propriedades seletivas, uma diferença de potencial transmembrana é gerada. Esse potencial é definido como o potencial do lado interno da membrana plasmática relativo ao potencial do lado externo (estabelecido como zero por convenção). A magnitude do potencial de membrana depende diretamente das propriedades seletivas dela e também da concentração de íons no meio externo e no citoplasma (KRÓL; DZIUBIŃSKA; TREBACZ, 2010).

As mudanças de potencial de membrana evocadas têm as seguintes características: (a) formato, (b) cinética, (c) duração, (d) propriedades e (e) funções e podem ser classificadas como:

- a. Hiperpolarização, se o potencial é direcionado a valores mais negativos, ou despolarização, se direcionado para valores menos negativos;
- b. Graduado, se a amplitude depende da intensidade do estímulo, ou de amplitude constante, se independe do estímulo;
- c. Transitório ou de longa duração;

- d. Propagável ou não propagável;
- e. Sistêmico ou local, se se espalha por todo o órgão ou organismo ou não.

Em geral, quatro tipos de sinais elétricos são conhecidos em plantas: potenciais de ação (PA), potenciais de variação (PV), também conhecidos como potenciais de ondas lentas (SWP), potenciais de ferimentos (WP) e potenciais sistêmicos (SP) (HUBER; BAUERLE, 2016).

PAs são caracterizados por uma rápida fase de despolarização do potencial de membrana (decréscimo de uma diferença no potencial elétrico) seguida de uma rápida fase de repolarização (recuperação da diferença potencial) (TREBACZ; DZIUBIŃSKA; KRÓL, 2006). O início iônico da fase de despolarização é devido a canais de Ca^{2+} regulados por voltagem que liberam cálcio de reservatórios internos (mitocôndria, vacúolo e retículo endoplasmático) e externos (apoplasto) para o citoplasma (REDDY et al., 2011). Em resposta ao influxo de cálcio, canais de Cl^- se abrem e íons cloro se difundem devido ao gradiente eletroquímico para fora da célula (LUNEVSKY et al., 1983) até que canais de K^+ voltagem-dependentes sejam ativados e efluxo de K^+ ocorra (fase de repolarização) (TREBACZ; DZIUBIŃSKA; KRÓL, 2006).

A transmissão de um PA por membranas excitáveis se dá por transmissão eletrotônica: um fluxo de corrente local entre uma parte da membrana ativada e a adjacente ainda não excitada. Depois da passagem de cada PA há um período refratário – período transitório de falta de excitabilidade, ou seja, o tempo necessário para uma célula restaurar sua excitabilidade, que eletrofisiologicamente, significa a habilidade de gerar e transmitir PAs. As células onde o potencial de membrana varia, mas PAs não ocorrem, não são consideradas excitáveis (MINORSKY, 1989).

PAs seguem a lei do tudo-ou-nada, ou seja, todo estímulo que desencadeia um PA deve atingir uma intensidade crítica (limiar de excitação) para desencadear o sinal. Assim que o limiar é atingido o sinal se autoperpetua ao passo que estímulos supra limiares desencadeiam PAs de amplitude constante (TREBACZ; DZIUBIŃSKA; KRÓL, 2006).

PAs se propagam pelo floema com amplitude e velocidade constantes. Essa última varia de 0,1 a 3000 cm s^{-1} em diferentes espécies (VOLKOV; COLLINS; MWESIGWA, 2000; FROMM, 2006). A velocidade pode ser elevada apesar de o floema não ser otimizado para a condução de sinais elétricos. Durante o desenvolvimento desse tecido, as células do tubo crivado sofrem uma morte celular programada parcial. Nesse processo, o vacúolo, o núcleo e plastídios degeneram, permitindo o fluxo de solutos. O citoplasma fica preenchido por uma solução eletrolítica com aproximadamente 100 mM K^+ , separada do

exterior (1 mM K⁺) pela membrana plasmática (HEDRICH; SALVADOR-RECATALÀ; DREYER, 2016).

PAs são induzidos por estímulos não invasivos incluindo estímulos elétricos, chuva ácida, irradiação e choque por frio (STANKOVIC et al., 1998; SHVETSOVA et al., 2002; VOLKOV et al., 2004; TRĘBACZ; DZIUBIŃSKA; KRÓL, 2006; FROMM; LAUTNER, 2007).

PAs são gerados também na ausência de qualquer estímulo externo intencional, tendo sido registrado pela primeira vez, deste modo, em girassol e foram chamados de potenciais de ação espontâneos (SAP) (ZAWADZKI; DAVIES; DZIUBIŃSKA, 1995). SAPs também foram registrados em tomateiro (MACEDO et al., 2015).

Por outro lado, os PVs são sinais elétricos únicos em plantas superiores (STAHLBERG; CLELAND; van VOLKENBURGH, 2006; VODENEEV; AKINCHITS; SUKHOV, 2015). PVs são caracterizados por uma fase de despolarização rápida seguida de uma repolarização mais duradoura e variável quando comparado com os PAs. Enquanto a fase de despolarização é causada pelos mesmos mecanismos iônicos que ocorrem em PAs, a lenta repolarização é iniciada por um desligamento transitório de bombas de H⁺ podendo chegar a 30 min (STAHLBERG; CLELAND; van VOLKENBURGH, 2006).

PVs são sinais graduados e diferem dos PAs pelo fato de não seguirem a lei do tudo-ou-nada já que a magnitude e formato do sinal variam de acordo com a intensidade do estímulo e sua velocidade de propagação e amplitude decrescem à medida que o sinal se distancia do local estimulado (OYARCE; GUROVICH, 2011). A velocidade dos PVs está na faixa de 0,1 a 1 cm s⁻¹ (STAHLBERG; COSGROVE, 1997; FROMM; LAUTNER, 2007).

Estímulos como ferimento mecânico, queimadura ou ataque de herbívoros (STANKOVIC et al., 1998; MAFFEI; BOSSI 2006; GALLÉ et al., 2015) causam uma onda de pressão no vaso do xilema que resulta em mudança na atividade de canais mecanossensíveis, canais iônicos e bombas em células adjacentes. O fluxo iônico subsequente evoca a despolarização local da membrana plasmática que é monitorada extracelularmente como um PV (STANKOVIC, ZAWADSKI; DAVIES, 1997).

Esse sinal permite substancialmente que seja levada mais informação sobre a intensidade da injúria quando comparado ao PA, permitindo a planta perceber a distância do ferimento a partir de pequenas diferenças na pressão hidráulica, forma e intensidade do sinal (STAHLBERG; CLELAND; van VOLKENBURGH, 2006).

Potenciais de ferimento (WPs) são similares a PVs quanto ao mecanismo iônico induzindo as fases de despolarização e repolarização, resultando em um sinal de

formato similar (STAHLBERG; CLELAND; van VOLKENBURGH, 2006). O ferimento, seja ele causado por agentes bióticos ou abióticos, é propagado por mudanças de turgor nas células que iniciam a despolarização da membrana plasmática (SHIMMEN, 2001). Portanto, WPs, como PVs, não se auto perpetuam (ZEBELO; MAFFEI, 2012) e sempre decorrem de mudanças na pressão hidráulica. No entanto, diferentemente de PVs, não está claro se WPs devem ser considerados formalmente sinais de longas distâncias já que até hoje foram apenas registrados na proximidade de células feridas (1 a 40 mm) (STAHLBERG; COSGROVE, 1994).

Potenciais sistêmicos (SPs) são o quarto tipo de sinal elétrico que são propagados em plantas e ocorrem também após ferimento. SPs se diferem dos outros sinais pelo seu modo de ação. Enquanto PAs, PVs e WPs são causados pelo fluxo contínuo de cálcio através da membrana plasmática, SPs são iniciados pela ativação de bombas de H^+ , o que gera uma hiperpolarização da membrana (com relação ao interior da célula). A vantagem dos auto propagáveis SPs é que eles não seguem a lei do tudo-ou-nada. Portanto, sua intensidade pode ser modulada a fim de carregar informações sobre a severidade do ferimento (ZIMMERMANN et al., 2009).

Sinais elétricos em plantas são a resposta fisiológica inicial a estímulos do ambiente e têm efeito importante na respiração (DZIUBIŃSKA; TRĘBACZ; ZAWADZKI, 1989), absorção de água (DAVIES, ZAWADZKI; WITTERS, 1991), transpiração (FROMM; FEI, 1998), ativação de genes inibidores de proteinases (WILDON et al., 1992), trocas gasosas em folhas (FROMM; ESCHRICH, 1993; KOZIOLEK et al., 2003; KAISER; GRAMS, 2006) e resistência de plantas ao calor (SUKHOV et al., 2015). Em curtas distâncias tais sinais mediam a fertilização em flores (FROMM; HAJIREZAEI; WILKE, 1995), podem disparar o rápido fechamento da armadilha em plantas carnívoras (PAVLOVIC et al., 2011) além de induzir o movimento foliar em *Mimosa pudica* (VOLKOV et al., 2013).

Reações eletrofisiológicas são desencadeadas também por herbívoros. Zimmermann et al. (2016) demonstraram a geração de PAs, PVs e SPs após ataque de insetos, tanto localmente quanto sistemicamente.

2.3 Técnicas de medição de sinais elétricos

Abordagens para o estudo da atividade elétrica em plantas incluem medidas extra e intracelulares, a técnica de *patch clamp* e a técnica do microeletrodo de sonda vibratória. Dentre essas técnicas, o sinal registrado usando a medida extracelular é devido à

mudança de potencial elétrico de um grupo de células enquanto que a medida intracelular pode registrar o valor do potencial de membrana de uma célula individual (YAN et al., 2009).

Como os sinais elétricos em plantas são fracos, eles geralmente devem ser amplificados e os aparelhos de registro devem ter uma alta impedância ($>10^9 \Omega$) (DAVIES, 2006).

Medidas extracelulares são realizadas principalmente com dois tipos diferentes de eletrodos: de superfície ou metálicos de inserção (DAVIES, 2006; FROMM; LAUTNER, 2007). Os eletrodos de superfície consistem geralmente de fios de Ag/AgCl, umedecidos com 0,1% (p/v) de KCl em ágar (uma ponte salina entre o eletrodo e a planta) e envolvidos em algodão para permitir o contato apropriado com a superfície da planta (FROMM; SPANSWICK, 1993), ou de Ag/AgCl peletizados que podem ser conectados a superfície da planta por meio de um gel aquoso condutivo comumente usado em eletrocardiogramas (MANCUSO, 1999). Essa abordagem não é danosa à planta, mas é somente aplicável em medidas de curto prazo ($<12h$) por que o meio iônico tende a secar, o que afetaria os resultados (YAN et al., 2009). Uma variação do registro de potencial em superfície se dá pelo uso de microeletrodos de vidro inseridos na cavidade subestomática de um estômato aberto. Dessa maneira a ponta do eletrodo faz contato com a fase aquosa do apoplasto (FELLE; ZIMMERMANN, 2007).

Os eletrodos metálicos se referem a eletrodos de Ag/AgCl que são normalmente inseridos no caule ou nervura de folhas para medir o potencial de membrana de um grupo de células. Um eletrodo idêntico pode ser colocado na região distal da planta ou no solo para servir como eletrodo de referência. A desvantagem dessa abordagem é que isso pode causar um ligeiro dano às plantas, no entanto, ela é aplicável em medidas de longa duração ($>24h$) (FROMM; LAUTNER, 2007).

As medidas intracelulares dos potenciais de membrana e sinais elétricos são geralmente conduzidas com microeletrodos de vidro com um diâmetro de ponta menor que 1 μm . Esses eletrodos são preenchidos com uma solução de 0,3-3M de KCl e conectados a um amplificador de alta impedância de entrada. Um microeletrodo é cuidadosamente inserido no citoplasma (ou vacúolo) da célula usando micromanipuladores, enquanto que o eletrodo de referência (Ag/AgCl) fica em contato com a solução ao redor da célula. O material vegetal deve estar imerso em uma solução banho. Quando o microeletrodo atravessa a membrana celular, o amplificador reporta a mudança negativa do potencial registrado. Este é o potencial de membrana em repouso, geralmente com valores entre -80 e -200 mV em células vegetais (FROMM; LAUTNER, 2007; YAN et al., 2009).

A técnica do *patch-clamp* mostra as características dos canais iônicos e torna possível compreender os mecanismos iônicos que causam mudanças no potencial de membrana. Além disso, a técnica do microeletrodo de sonda vibratória é uma nova abordagem eletrofisiológica que pode medir os influxos e efluxos de íons e pequenas moléculas de células e órgãos. Ela pode mostrar a atividade dos canais de membranas e ligar os fluxos moleculares com os processos fisiológicos importantes para os quais eles estão relacionados. Diferentes técnicas de medida podem mostrar variação nas características dos sinais elétricos em plantas em diferentes níveis (YAN et al., 2009).

Outra técnica intracelular é a de gráfico de penetração elétrica (EPG). Ela consiste em utilizar um inseto hemíptero conectado ao equipamento de EPG por um filamento de ouro que é colado no abdômen do inseto. Quando ele insere o estilete no floema há um curto período de salivação seguido por um longo período de ingestão de seiva. Nessa segunda etapa o afídeo passa e ser tornar um eletrodo intracelular (HEDRICH; SALVADOR-RECATALÀ; DREYER, 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas neste estudo plantas de girassol (*Helianthus annuus*) cultivar BRS 323 (Embrapa) cultivadas em casa de vegetação. Foram utilizados vasos de 5L com substrato formado por uma mistura de argila expandida do tipo laminado (até 2,5 mm) e granulado (de 1 a 5 mm) (Cinexpan, Várzea Paulista, Brasil) além de vermiculita, em partes iguais. Elas foram irrigadas diariamente, até a capacidade de campo do substrato, com solução nutritiva preparada com a mistura de: 0,46 g L⁻¹ do fertilizante Miracle-Gro® All Purpose Plant Food (EUA) corrigida com 0,1 g L⁻¹ KCl, 0,26 g L⁻¹ CaCl₂, 0,1 g L⁻¹ MgCl₂ e 1 mL L⁻¹ Fe-EDTA.

Quando as plantas atingiram uma idade entre 30 a 50 dias foram transferidas para o laboratório onde permaneceram por dois dias para se aclimatarem às condições antes de serem iniciadas as medições eletrofisiológicas. Ficaram sob a irradiância de 170 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com fotoperíodo de 12 horas (6 às 18h). A sala era dotada de ar-condicionado para controle de temperatura que variou entre 24 $\pm$ 2 °C. Nesse período foram irrigadas com a solução nutritiva.

3.2 Tratamento de déficit hídrico

Após aclimação as plantas foram colocadas em Gaiolas de Faraday e tiveram os eletrodos instalados. Permaneceram por dois dias sendo irrigadas e, depois desse período, a irrigação foi suspensa por um tempo que variou de 3 a 13 dias. As plantas foram monitoradas quanto ao murchamento das folhas. À medida que as folhas basais demonstravam murchamento os girassóis eram irrigados com solução nutritiva até a capacidade de campo do substrato. Foram avaliadas 37 plantas.

3.3 Análises eletrofisiológicas

3.3.1 Gaiolas de Faraday e rede elétrica

As plantas foram avaliadas na mesma sala, nas mesmas condições, em gaiolas de Faraday feitas de uma malha de ferro com 1cm² de área de abertura cuja porta possuía 70 cm de comprimento e 56 cm de altura, devidamente aterradas. As gaiolas eram dotadas de lâmpadas de LED que forneciam aproximadamente 170 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa para as plantas (Figura 1).

Uma gaiola de Faraday é uma blindagem elétrica, ou seja, uma superfície condutora que envolve uma dada região do espaço e que pode, em certas situações, impedir a

entrada de perturbações produzidas por campos eletrostáticos e/ou eletromagnéticos externos cujos comprimentos de onda sejam superiores ao tamanho da malha.

A fim de evitar ruído nas leituras, a rede elétrica que alimentava os equipamentos utilizados para os registros de sinais elétricos foi elaborada de maneira a separar cada uma das três Gaiolas de Faraday utilizadas no estudo. A energia elétrica que chegava ao laboratório passava por um estabilizador de voltagem antes de alimentar os equipamentos eletrônicos. O quadro de energia com os circuitos isolados de cada gaiola possuía um aterramento com 10 barras de cobre (Figuras 1B e C).

Figura 1 – **A.** Gaiola de Faraday. **B.** Quadro de energia. **C.** Estabilizador de voltagem. **D.** Quatro cabos para inserção dos eletrodos, cujo revestimento foi unido para se tornar o local de inserção do eletrodo de referência. **E.** Lab-Trax 4/24T. **F.** Eletrodo. **G.** Detalhe da extremidade de prata do eletrodo que é inserida na planta. **H.** Detalhe da extremidade do eletrodo com pino tipo macho

3.3.2 Eletrodos

As mudanças no potencial elétrico foram medidas com quatro eletrodos extracelulares. Medidas extracelulares são um “espelho” do que acontece dentro das células. Foram utilizados eletrodos de Ag/AgCl construídos no laboratório, de acordo com Macedo (2015). Eles consistiam de um fio de cobre (0,2 mm de diâmetro), no qual, em uma extremidade foi soldado um pino de ouro tipo macho e na outra um fio de prata (0,25 ou 0,5 mm de diâmetro – World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA). O fio de prata tinha diversos comprimentos de acordo com a espessura do órgão vegetal a ser penetrado (Figuras 1F, G e H). Depois de prontos os eletrodos eram submetidos a um teste de resistência elétrica por meio de um multímetro e deveriam atingir valores próximos a zero para melhor condução do sinal da planta ao sistema de aquisição de dados. Os eletrodos utilizados neste estudo possuíam resistência de 3 Ω .

Para ligação do eletrodo com o sistema de aquisição de dados foram preparados 4 cabos BNC. Os revestimentos de cobre desses cabos eram desfiados em uma extremidade e unidos de tal maneira que pudessem ser soldados em um único conector de ouro do tipo fêmea, onde seria conectado o eletrodo de referência (Figura 1D). O cerne desses cabos também era soldado em conectores de ouro do tipo fêmea. Na outra extremidade dos cabos foram soldados conectores do tipo DIN8 macho. Por fim, essa extremidade foi conectada no sistema de aquisição de dados.

Antes de serem instalados na planta os eletrodos tinham a extremidade de prata submetida ao processo de cloração: o pino de ouro era conectado ao polo positivo de uma bateria de 9V enquanto que a extremidade de prata era mergulhada em uma solução de KCl 3M. Para fechar um circuito elétrico, um fio de prata conectava o polo negativo da bateria à solução de KCl. Dessa maneira, íons Cl^- saíam da solução e aderiam à extremidade de prata do eletrodo constituindo o eletrodo Ag/AgCl.

Os eletrodos foram inseridos no caule (acima dos cotilédones), pecíolo e nervura central das folhas dos girassóis em distâncias variadas entre si e de uma maneira que perfurassem todo o órgão a fim de que atingissem os vasos condutores (Figura 2). Um eletrodo de referência do mesmo tipo do de medida foi inserido na planta. Os arranjos dos eletrodos são mostrados na Figura 3.

Figura 2 – **A.** Detalhe da inserção dos eletrodos no pecíolo e no caule. **B.** Detalhe da inserção do eletrodo na nervura central da folha

Figura 3 – Arranjo dos eletrodos

3.3.3 Sistema de aquisição de dados

Em se tratando de uma medida elétrica, a técnica requer um circuito elétrico fechado e completo que inclui um voltímetro, um amplificador, um conversor analógico-digital e um controlador micro processado onde a corrente possa passar por todos os componentes (MACEDO, 2015). Um único equipamento, preenchendo todos esses requisitos foi utilizado, o Lab-Trax™ 4/24T (World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA) com quatro canais independentes, cada um com seu próprio conversor A/D de 24 bits e com

impedância de entrada de 667 GigaOhm Typ./182 GigaOhm Min (Figura 1E). Dessa maneira o equipamento não provocava interferência nas leituras.

A frequência de amostragem foi de 20 Hz (amostras por segundo). O Lab-Trax™ foi controlado pelo software LabScribe versão 3 (iWorx System Inc., Dover, NH, EUA) que também foi utilizado para medir as características dos sinais.

3.3.4. Características dos potenciais de ação

Foram medidas as seguintes características dos sinais: amplitude (em mV), duração do pico medida na metade de sua amplitude ($t_{1/2}$, em segundos) e velocidade (cm min^{-1}) (Figura 4). Esta foi calculada tomando a distância entre os eletrodos (cm) e a dividindo pelo tempo necessário (minutos) para o PA percorrer esse segmento de caule ou folha (ZAWADZKI et al., 1991; MACEDO et al., 2015). Para o cálculo da velocidade foram escolhidos os eletrodos mais distantes entre si, desde que estivessem no mesmo órgão, ou seja, eletrodos posicionados somente no caule ou somente na folha. Não foi calculada a velocidade de um segmento com um eletrodo inserido no caule e outro na folha, pois a região do nó, onde a folha está inserida, permite a dispersão do sinal elétrico e drástica redução dos parâmetros analisados.

O pico de um PA lido no eletrodo de referência aparece ao mesmo tempo nos quatro canais (Figura 4), pois, como já explicado acima, tal eletrodo é ligado a um conector que faz parte dos 4 cabos BNC.

Figura 4 – **A.** Representação do arranjo dos eletrodos. **B.** Características do PA: duração e amplitude, medidas no pico do eletrodo de medida (voltado para cima). O pico voltado para baixo representa a leitura no eletrodo de referência. Nos quatro canais esses picos coincidem no tempo. **C.** Exemplo de um PA de propagação basípeta resultante da decapitação do ápice caulinar de uma planta de girassol. **D.** Exemplo de um PA de propagação acrópeta resultante de estímulo de choque de 10 V por 8 s na mesma planta. Linhas tracejadas indicam o momento do estímulo. + e – representam os eletrodos de choque.

4 RESULTADOS

4.1 Características dos PAs gerados após irrigação

Das 37 plantas avaliadas, 11 plantas responderam à irrigação pela geração de potenciais de ação, ou seja, 30% delas. Todos os sinais estão representados abaixo e as plantas estão numeradas de 1 a 11. Plantas que não responderam à irrigação não foram representadas. Pelos arranjos dos eletrodos utilizados neste estudo, foi possível perceber que os PAs se originaram na base da planta e seguiram até o ápice (propagação acrópeta) chegando a atingir as folhas (Figuras 5, 6, 7C, 8, 9, 10, 12). Esses sinais também se originaram nas folhas e seguiram até o caule em direção ao solo (propagação basípeta) (Figuras 13 e 14).

O tempo que levou para que o sinal atingisse o primeiro eletrodo variou entre 18 s e 14 min, com média de 6,5 minutos. Porém, em alguns casos, poucos segundos após a irrigação já havia mudança no potencial elétrico antes da geração do PA.

Oito plantas geraram PAs que se propagaram em direção acrópeta. A amplitude no caule variou entre 2,3 e 32,4 mV, com média de 12,1 mV. Já para o pecíolo, variou de 4,8 a 38,9 mV com média de 16,1 mV. Ao atingir a nervura central, a amplitude variou de 4 a 25,9 mV com média de 15 mV (Tabela 1). Outro importante parâmetro do PA, a duração do pico ($t_{1/2}$), variou entre 3 e 38,9 s, com média de 15,3 s no caule. No pecíolo variou de 4,2 a 20,5 s, com média de 10,8 s. Já na nervura central variou de 4,3 a 18,5, com média de 11,4 s (Tabela 1).

Tabela 1 – Amplitude (mV) e duração ($t_{1/2}$, s) dos potenciais de ação em diferentes partes das plantas propagados nas direções acrópeta, basípeta ou em múltiplas direções

Parte da planta	Acrópeta		Basípeta		Múltiplas direções	
	Amplitude	$t_{1/2}$	Amplitude	$t_{1/2}$	Amplitude	$t_{1/2}$
Caule	12,1± 7,7	15,3±8,1	1,4	6,7±0,8	7,6± 4,1	12,5±6,6
	(n=8)		(n=1)		(n=2)	
	(x=44)	(x=43)	(x=2)		(x=8)	
Pecíolo	16,1±15,8	10,8±7,4	25,6±5,3	8,8±2,2	9,7±4,1	16±5
	(n=4)		(n=2)		(n=1)	
	(x=4)		(x=3)		(x=5)	
Nervura central	15±15,4	11,4±10	32,7	7,6	17,6±7,2	9±2,9
	(n=2)		(n=1)		(n=1)	
	(x=2)		(x=1)		(x=9)	

Média ± desvio-padrão. “n” representa o número de plantas. “x” representa o número de picos de PAs utilizados para os cálculos

A velocidade de propagação do PA em direção ao ápice das plantas foi de $6,3 \text{ cm min}^{-1}$, em média, quando medida no caule. Quando medida num seguimento de folha onde havia um eletrodo no pecíolo e outro na nervura central ela foi 6 cm min^{-1} . (Tabela 2).

Tabela 2 – Velocidade de propagação (cm min^{-1}) dos potenciais de ação em diferentes partes das plantas propagados nas direções acrópeta e basípeta

Parte da planta	Velocidade	
	Acrópeta	Basípeta
Caule	$6,3 \pm 1,7$	4,5
	(n= 7)	(n= 1)
	(x= 12)	(x= 1)
Pecíolo	-	4
	-	(n=1)
	-	(x= 1)
Pecíolo e Nervura central	6	7,4
	(n= 1)	(n= 1)
	(x= 1)	(x= 1)

Média $\pm$ desvio-padrão. “n” representa o número de plantas. “x” representa o número de picos de PAs utilizados para os cálculos. “-” indica que não houve propagação naquele órgão

Com relação à propagação basípeta do PA, dois girassóis tiveram sinais que se originaram nas folhas e seguiram em direção à base da planta (Figuras 13 e 14). O único pico registrado na nervura central teve amplitude $32,7 \text{ mV}$ e $t_{1/2}$ de $7,6 \text{ s}$ (Tabela 1). Ao chegarem no pecíolo a amplitude variou entre $19,5$ e $29,1 \text{ mV}$ com média de $25,6 \text{ mV}$. O $t_{1/2}$ variou nessa região entre $6,8$ e $11,2 \text{ s}$, com média de $8,8 \text{ s}$. Ao atingir o caule a amplitude média decresceu para $1,4 \text{ mV}$ e o $t_{1/2}$ variou entre $6,1$ e $7,2 \text{ s}$, com média de $6,7 \text{ s}$ (Tabela 1).

Na direção basípeta a velocidade de propagação foi de $4,5 \text{ cm min}^{-1}$ no caule, 4 cm min^{-1} no pecíolo e $7,4 \text{ cm min}^{-1}$ quando medida num seguimento de folha onde havia um eletrodo no pecíolo e outro na nervura central (Tabela 2) (Figura 14).

Uma planta que já havia propagado um PA acrópeto propagou, em uma segunda irrigação, um PA em múltiplas direções (eletrodos 3-4-2-1-4-3-R, nesta ordem – Figura 7B). Tal padrão de sinal também ocorreu em outra planta com os picos de despolarização ocorrendo repetidamente por 150 minutos no caule, pecíolo e nervura central (Figura 6C).

Nessas duas situações a amplitude variou entre $4,4$ e $17,3 \text{ mV}$, no caule, com média de $7,6 \text{ mV}$. No pecíolo variou de $5,2$ a $13,8 \text{ mV}$, com média de $9,7 \text{ mV}$. Por outro lado, na nervura central variou de $6,8$ a $28,7 \text{ mV}$, com média de $17,6 \text{ mV}$. Quanto ao $t_{1/2}$, este variou de $6,4$ a $27,2 \text{ s}$ no caule, com média de $12,5 \text{ s}$. Quando ocorreu nas folhas, no pecíolo

variou de 10,5 a 22,3 s, com média de 16 s e na nervura central seu valor mínimo foi de 4,3 s e máximo de 12,5 s, com média de 9s (Tabela 1). Nessas plantas não foi calculada a velocidade, pois não foi possível determinar a direção em que os PAs se propagaram.

4.2 Descrição das condições das plantas quanto ao período sem água e os sinais gerados

4.2.1 Planta 1

A planta ficou 8 dias sem ser irrigada. Um minuto e meio após irrigação, o potencial elétrico começou a se alterar nos 4 eletrodos simultaneamente na direção de hiperpolarização. Em seguida ocorreu uma série de quatro PAs, na direção acrópeta, 6, 8, 11 e 17 min depois com uma tendência de aumento na amplitude à medida que se sucediam, chegando a 26 mV. As velocidades de propagação desses PAs, calculadas entre os eletrodos 4 e 1, foram de $6,9 \text{ cm min}^{-1}$, $8,5 \text{ cm min}^{-1}$, $5,8 \text{ cm min}^{-1}$ e $4,4 \text{ cm min}^{-1}$, respectivamente. Em seguida o potencial elétrico retornou a um valor próximo do que era antes da irrigação (Figura 5B). Um novo ciclo de déficit hídrico foi imposto por treze dias. Doze minutos após nova irrigação gerou-se, dessa vez, apenas um PA de baixo para cima, com amplitude em torno de 13 mV e velocidade de $7,1 \text{ cm min}^{-1}$ (Figura 5C).

Figura 5 – A. Arranjo dos eletrodos. B. Série de potenciais de ação resultantes de irrigação. C. Potencial de ação acrópeta após irrigação. Os números representam os eletrodos. “R” representa o eletrodo de referência. A linha tracejada representa o momento da irrigação

4.2.2 Planta 2

Ficou 7 dias sem ser irrigada. Sete minutos após irrigação houve a geração de um PA acrópeto com no máximo 5 mV de amplitude e velocidade de propagação de 6,2 cm min⁻¹ (Figura 6B). Depois ficou 5 dias sob déficit hídrico quando foi novamente irrigada. 3 min após irrigação houve a geração de um PA acrópeto com amplitude máxima de 8,9 mV e velocidade de 3,2 cm min⁻¹. Em seguida o potencial elétrico variou tanto no sentido de despolarização quanto de hiperpolarização durante 50 min (Figura 6C).

Figura 6 – **A.** Arranjo dos eletrodos. **B.** Potencial de ação acrópeto após irrigação. **C.** PAs acrópetos após irrigação e variação do potencial elétrico. Números representam os eletrodos. “R” representa o eletrodo de referência. A linha tracejada representa o momento da irrigação

4.2.3 Planta 3

Ficou 13 dias sem receber água. Doze minutos após a irrigação ocorreu um PA em múltiplas direções até atingir o ápice da planta. O sinal apareceu primeiramente no eletrodo 3 e concomitantemente se dirigiu tanto na direção basípeta quanto na acrópeta e por fim chegou até a região do eletrodo de referência (Figura 7B). Passou por um novo período de déficit hídrico de 8 dias. Dois minutos após irrigação gerou PA acrópeto de baixa magnitude (máximo de 6 mV) e velocidade de $3,8 \text{ cm min}^{-1}$ (Figura 7C).

Figura 7 – **A.** Arranjo dos eletrodos. **B.** Potencial de ação em múltiplas direções após irrigação. **C.** Potencial de ação acrópeto após irrigação. Números representam os eletrodos. “R” representa o eletrodo de referência. A linha tracejada representa o momento da irrigação

4.2.4 Planta 4

Passou 13 dias em déficit hídrico. Cinco minutos após irrigação houve a geração de um PA em direção ao ápice que se dividiu ao chegar à região da folha, seguindo até ser captado pelo eletrodo do pecíolo, além de continuar em direção ao ápice até ser detectado pelo eletrodo de referência. A detecção do PA nos eletrodos 1 e de referência se sobrepuseram. O potencial elétrico continuou oscilando por mais 40 min quando houve uma despolarização no pecíolo de aproximadamente 27 mV (Figura 8B).

Figura 8 – **A.** Arranjo dos eletrodos. **B.** Potencial de ação acrópeto após irrigação. Números representam os eletrodos. “R” representa o eletrodo de referência. A linha tracejada representa o momento da irrigação.

4.2.5 Planta 5

Permaneceu sob déficit hídrico por 12 dias. Sete minutos após irrigação houve a geração de um PA que percorreu a planta em direção acrópeta. Este atingiu o eletrodo 1 do caule antes de chegar ao eletrodo 2 no pecíolo, que teve maior amplitude que os demais (Figura 9B). A velocidade de propagação no caule foi de $7,4 \text{ cm min}^{-1}$.

Figura 9 – **A.** Arranjo dos eletrodos. **B.** Potencial de ação acrópeto gerado após irrigação. Números representam os eletrodos. “R” representa o eletrodo de referência. A linha tracejada representa o momento da irrigação

4.2.6 Planta 6

Permaneceu sob déficit hídrico por 6 dias. 10 minutos após irrigação houve um PA acrópeto que atingiu o pecíolo (14,5 mV) e nervura central da folha (25,9 mV), com amplitudes maiores do que no caule (Figura 10B). Apesar da menor amplitude, a velocidade de propagação foi maior no caule que na folha, 8 e 6 cm min⁻¹, respectivamente.

Figura 10 – **A.** Arranjo dos eletrodos. **B.** Potencial de ação acrópeto após irrigação. Números representam os eletrodos. “R” representa o eletrodo de referência. A linha tracejada representa o momento da irrigação

4.2.7 Planta 7

Passou por 5 dias de déficit hídrico. Quatro minutos após irrigação houve um PA em direção ao ápice que não se propagou além do eletrodo 3, nem para folha nem para o caule (Figura 11B).

Figura 11 – **A.** Arranjo dos eletrodos. **B.** Potencial de ação após irrigação detectado apenas nos eletrodos 3 e 4. Números representam os eletrodos. “R” representa o eletrodo de referência. A linha tracejada representa o momento da irrigação

4.2.8 Planta 8

Ficou por 3 dias sem receber irrigação. Um minuto após irrigação houve a geração de um PA acrópeto que percorreu caule (com velocidade de $6,3 \text{ cm min}^{-1}$) e pecíolo até chegar à nervura central da folha, com amplitude decrescente (Figura 12B), diferentemente do que ocorreu nas plantas 5 e 6.

Figura 12 – **A.** Arranjo dos eletrodos. **B.** Potencial de ação acrópeto. Números representam os eletrodos. “R” representa o eletrodo de referência. A linha tracejada representa o momento da irrigação

4.2.9 Planta 9

Ficou 5 dias sob déficit hídrico. Um minuto e meio após irrigação o potencial elétrico começou a se alterar no canal 4, que estava mais próximo ao solo (10,6 cm), aproximadamente 20 mV no sentido de despolarização. Em menor magnitude este também se alterou no canal 1. Nove minutos decorrentes da irrigação, um PA originado na folha (eletrodos 1 e 2, picos clássicos) se propagou em direção basípeta (eletrodos 3 e 4, picos irregulares) (Figura 13B). A velocidade de propagação na folha foi de 4 cm min^{-1} .

Figura 13 – **A.** Arranjo dos eletrodos. **B.** Potencial de ação basípeta. Números representam os eletrodos. “R” representa o eletrodo de referência. A linha tracejada representa o momento da irrigação

4.2.10 Planta 10

Essa planta não sofreu déficit hídrico. Apenas 18 segundos após irrigação houve a geração de um PA na nervura central da folha que se propagou para o pecíolo a uma velocidade de $7,4 \text{ cm min}^{-1}$ (Figura 14B). Ao chegar no caule teve sua magnitude grandemente reduzida a 1 mV aproximadamente, enquanto que a velocidade se reduziu a $4,5 \text{ cm min}^{-1}$.

Figura 14 – **A.** Arranjo dos eletrodos. **B.** Potencial de ação basípeto. Números representam os eletrodos. “R” representa o eletrodo de referência. A linha tracejada representa o momento da irrigação

4.2.11 Planta 11

Esse girassol passou por um déficit hídrico de 8 dias. Três minutos após a irrigação o potencial elétrico começou a se alterar na direção de despolarização tanto no caule quanto nas folhas, mas com mais proeminência na nervura central (eletrodo 1). Quatorze minutos após a irrigação iniciou-se uma série de picos de despolarizações que se estendeu por 2 horas e trinta minutos (Figura 15B). Não foi possível calcular a velocidade e saber a direção desses sinais uma vez que os eletrodos estavam em partes diferentes da planta: nervura central em uma folha, pecíolo de outra folha no mesmo nó e caule. Tais picos de despolarização variaram de 5 a 28 mV de amplitude, com média de 13,9 mV. A duração deles variou de 4,3 a 22,3 s, com média de 11,5 s.

Figura 15 – **A.** Arranjo dos eletrodos. **B.** Potencial elétrico registrado por 2 horas após irrigação. **C.** Potencial elétrico desde o momento da irrigação até 35 min depois, mostrando três despolarizações. **D.** Período entre 40 e 60 min após irrigação. **E.** Maior despolarização atingida no período (28,7 mV) ocorreu 67 min após a irrigação. **F.** Período de 1h e 40 min até 2h após irrigação. Números representam

os eletrodos. “R” representa o eletrodo de referência. A linha tracejada representa o momento da irrigação

5 DISCUSSÃO

Este trabalho demonstra pela primeira vez a geração de potenciais de ação após irrigação em plantas de girassol. Apesar de ela ser uma planta modelo para estudos eletrofisiológicos, só tinham sido reportados potenciais de ação e de variação após estímulos de choque e queima (STANKOVIC et al., 1998).

Das 37 plantas avaliadas, 11 responderam à irrigação pela geração de potenciais de ação, ou seja, 30% delas se mostraram excitáveis. Macedo (2015) avaliando plantas de tomateiro cv. Micro-tom após irrigação quando submetidas a déficit hídrico encontrou excitabilidade para o genótipo selvagem de 20%. Para os outros genótipos estudados foi demonstrada excitabilidade de 80 e 60% em *notabilis* e *sitiens*, respectivamente, ambos deficientes na produção de ABA.

PAs são gerados quando o potencial de membrana excede o limiar de excitação. Por sua vez, o limiar é atingido quando um número apropriado de canais iônicos é ativado por um estímulo particular e dispara um PA que se propaga com amplitude e velocidade constantes, de acordo com a lei do “tudo-ou-nada” (KRÓL; DZIUBIŃSKA; TREBACZ, 2010). O limiar de excitação, bem como a excitabilidade, podem variar entre espécies, órgãos, tecidos ou células, já que ele depende da atividade de canais iônicos, sua condição de fosforilação/desfosforilação e, portanto, das condições metabólicas em cada nível de organização (KRÓL; DZIUBIŃSKA; TREBACZ, 2010). Isso explica o porquê de algumas plantas terem gerado PA e outras não, bem como o fato de algumas plantas terem gerado PA pós-irrigação em alguns momentos e em outros não.

A grande variabilidade na geração de PAs não é um novo achado deste estudo, mas uma situação recorrente reportada em estudos em muitas plantas (PICKARD, 1973; ZAWADSKI et al., 1991). Isso pode confirmar que plantas são altamente individuais (como humanos que somente 30% respondem a placebos), ou, alternativamente, mais de um fator pode estar agindo em conjunto para desencadear PAs (STAHLBERG et al., 2006). Mais estudos são necessários para determinar se essa ausência de sinal significa uma propagação de curto alcance com grande atenuação ou se verdadeiramente nenhuma propagação ocorreu.

Existe ainda a possibilidade de a técnica utilizada, eletrodos de Ag/AgCl de perfuração, não permitir a captura do sinal com excelência. Ademais a altura das plantas, 40 a 50 cm aproximadamente, oferece um trajeto para a propagação dos sinais que dificulta a captação dos mesmos devido a sua possível atenuação.

PAs ocorrendo em animais apresentam propagação “tudo-ou-nada”. Por outro lado, devemos ter em mente que o mecanismo intercelular de propagação do PA em plantas é,

em grande parte, desconhecido e pode incluir novos modelos com nenhum paralelismo com os animais (STAHLBERG et al., 2006).

Séries de sinais elétricos foram descritas para várias espécies tais como *Conocephalus conicum* (PASZEWSKI et al. 1982), *H. annuus* (STANKOVIC; ZAWADZKI; DAVIES, 1997; STANKOVIC et al., 1998), *Arabidopsis thaliana* (FAVRE; GREPPIN; DEGLI AGOSTI, 2001) e *Lycopersicon esculentum* (ROUSSET et al., 2002). Eles foram geralmente observados depois de ferimento ou aquecimento com chama e ocorreram durante PVs.

Em girassol, PVs que se propagavam geralmente acompanhados por um ou mais picos superpostos (supostos PAs), foram evocados por ferimento de queima aplicado a folhas (STANKOVIC; ZAWADZKI; DAVIES, 1997; STANKOVIC et al., 1998). Também em girassol, pela primeira vez em plantas vasculares, foram demonstradas séries de PAs induzidas pela aplicação de glutamato na base do caule. Isso foi um evento característico e reproduzível. Os PAs se originaram em várias partes do caule e se propagaram acrópeta e basipetamente (STOLARZ et al., 2010).

Neste trabalho em apenas uma ocasião a irrigação de um girassol sob déficit hídrico originou uma série de PAs bem definidos que se encerrou após 17 minutos decorrentes do estímulo (Figura 5). Foram quatro sinais, todos na direção acrópeta. Esse tempo é consistente com o trabalho de Stolarz et al. (2010), que demonstrou a duração de séries de PAs de 9 a 20 min após estímulo. Este trabalho também está em concordância quanto ao número de PAs em cada série, já que os autores encontram de 4 a 7. Quanto a velocidade, Stolarz et al. (2010) encontraram valores de $9,9 \text{ cm min}^{-1}$ a $17,5 \text{ cm min}^{-1}$, maiores do que o encontrado na série de PAs neste trabalho ($4,4$ a $8,5 \text{ cm min}^{-1}$).

O período refratário é o mínimo de tempo necessário para o reestabelecimento do potencial de repouso depois da propagação de um sinal (TREBACZ et al., 1997). É também necessário tempo para restaurar a homeostase iônica em células excitáveis. Portanto, superar o período refratário é essencial para evocar sinais sucessivos.

No trabalho de Zawadski et al. (1991), em girassol e com estímulo de choque, o menor período refratário absoluto (período após um PA durante o qual é impossível gerar outro PA, independentemente da intensidade do estímulo) observado foi de 10 minutos e o menor período refratário relativo (período após um PA quando um segundo PA pode ser gerado, mas somente por um estímulo de maior intensidade) foi de 20 minutos. No geral, o intervalo necessário para gerar sucessivos PAs foi de 2 a 5 horas. Essa ampla variação dificulta os estudos desse fenômeno e não fornece valores significativos de período refratário

para *Helianthus annuus*. Macedo et al. (2015) encontraram tempos de 4 a 5 horas para estímulo elétrico em mutantes de tomateiro (cv. Micro-tom).

Neste trabalho, entre o primeiro e o segundo PA da série houve um intervalo de 2 minutos (Figura 5B), o que significa que o período refratário foi pelo menos desse tempo, curto quando comparado com outros estímulos em outros trabalhos. Provavelmente o tratamento de irrigação, bem como o de aplicação de glutamato no trabalho de Stolarz et al. (2010), sensibilizaram os canais iônicos responsáveis pela geração do PA e os fizeram mais responsivos (aboliram o fator que os torna não responsivos em longos períodos refratários). Pode ser também que o registro de vários PAs em sequência seja resultado da onda de excitação passando ao longo de vasos condutores isolados e registrados em momentos diferentes, pois como a medição foi extracelular, vários vasos poderiam estar em contato com os eletrodos.

Oscilações no potencial elétrico também ocorreram na re-irrigação da Planta 2 pós segundo ciclo de déficit hídrico. O potencial variou tanto no sentido de despolarização quanto hiperpolarização com amplitude de até 28 mV, o que durou cerca de 30 minutos (Figura 6C).

Ocorreu também neste estudo uma sequência de 15 despolarizações com duração de 2h e 30 minutos pós-irrigação. Nesse caso não é possível afirmar que foi um PA, pois apenas três eletrodos foram utilizados e estavam em órgãos diferentes da planta, não sendo possível determinar a direção do sinal (Figura 15). Esse longo período de resposta mostra que o potencial elétrico demorou a retornar para os valores em condição de repouso, diferentemente do que encontrou Fromm e Fei (1998), em plantas de milho, onde após o único PA pós-irrigação, houve hiperpolarização do potencial elétrico e retorno ao ritmo diário que tinha antes das plantas passarem por déficit hídrico. O tempo que o sinal levou para atingir a folha do milho foi significativamente menor que o que foi encontrado neste estudo com girassol (média de 6,5 minutos), onde em apenas uma planta ocorreu na ordem de segundos (Figura 14). A velocidade de 1 cm s^{-1} encontrada por Grams et al. (2007), em milho, foi significativamente maior que neste estudo, que foi de $1,8 \text{ cm min}^{-1}$.

As demais plantas estudadas geraram PA único na direção acrópeta que atingiu a folha. Em uma ocasião esse sinal não apareceu no eletrodo mais próximo ao solo logo após irrigação. Aparentemente o PA se originou próximo ao eletrodo 3 e seguiu na direção basípeta e acrópeta até atingir o eletrodo de referência (Figura 7B).

Para todos os girassóis estudados a média de amplitude foi de 12,9 mV. Tal valor fica bem abaixo do encontrado por Fromm e Fei (1998) e Grams et al. (2007) pós-

irrigação de plantas de milho sob déficit, que foi de 50 mV em média, medido na superfície foliar. Essa diferença pode ter ocorrido por serem espécies diferentes e por que diferentes técnicas de medida podem mostrar variação nas características dos sinais elétricos em diferentes níveis (YAN et al., 2009).

A via de propagação do sinal/ PA é facilmente deduzida a partir da sequência de aparecimento dos picos no gráfico do LabScribe e conhecendo o arranjo dos eletrodos. Era esperado apenas PAs no sentido acrópeto pós-irrigação, pois se imagina que este sinal elétrico leve alguma informação de longa distância das raízes até as folhas sobre a presença de água. No entanto também foram registrados PAs na direção basípeta originados na folha e que tiveram grande redução na amplitude após chegarem ao caule (Figuras 13 e 14). Isso ainda não havia sido demonstrado na literatura.

Nos trabalhos de Fromm e Fei (1998) e Grams et al. (2007), ambos com milho, foram utilizados apenas um eletrodo de medida, mas mesmo assim foi demonstrada a direção acrópeta de propagação do sinal. Macedo (2015) também encontrou, em tomateiro, PA apenas na direção acrópeta após irrigação.

Existe a possibilidade de um sinal hidráulico, que tem velocidade de propagação maior que o elétrico (HUBER; BAUERLE, 2016), ter induzido a geração de PA na folha ao ativar canais mecanossensíveis nas membranas das células adjacentes ao vaso do xilema (CHRISTMANN; GRILL; HUANG, 2013). Esse sinal então pode ter atingido o floema e ter sido direcionado para o caule por essa rota de propagação, já demonstrada por Hedrich, Salvador-Recatalà e Dreyer (2016).

Uma planta que gerou PA em direção basípeta, e somente ela entre todas avaliadas, o fez mesmo sem passar por déficit hídrico. Ela foi a que mais rápido respondeu à irrigação, 18 s. Quando em déficit hídrico uma planta pode estar mais susceptível a gerar PA se suas membranas estiverem em um estado relativamente despolarizado. Isso faria com que qualquer estímulo atingisse mais facilmente o limiar de excitação para geração do PA. Isso já foi demonstrado para as plantas que ficaram em condição de escuro (STANKOVIC et al., 1998).

Neste estudo houve um decréscimo de amplitude do PA quando os sinais atingiram o caule ao sair das folhas (Plantas 9 e 10). Em outras situações (Plantas 5 e 6) o sinal aumentou de amplitude ao atingir a folha o que pode ser um mecanismo de amplificação do sinal. No presente trabalho, a variação de amplitude do PA ao longo da planta pode ter ocorrido devido ao fato de o eletrodo não ter atingido os vasos condutores apropriadamente.

Há alguma discrepância na literatura acerca de PAs mostrando ou amplitude constante durante sua propagação ao longo do caule de girassol (STANKOVIC et al., 1998) ou sofrendo atenuações bem como amplificações (ZAWADZKI et al., 1991). Os resultados de Stahlberg et al. (2006) demonstram que dentro do mesmo órgão (epicótilo superior ou inferior) PAs frequentemente não sofrem alteração de amplitude. Por outro lado, a propagação de PAs a partir do epicótilo para órgãos como raízes e folhas invariavelmente sofreu grande atenuação. Parece fazer sentido que cada órgão reproduza o PA com sua própria amplitude específica (STAHLBERG et al., 2006).

Isso pode ocorrer devido o vaso do floema não ser otimizado para condução de sinais elétricos. Isso por que: (i) a placa crivada com poros constitui uma zona de resistência para a passagem da corrente elétrica e (ii) células companheiras com seu citoplasma rico em eletrólitos não podem funcionar como isolantes. Consequentemente, as células companheiras não reduzem a capacitância da membrana, nem isolam eletricamente o tubo crivado. Ao invés disso, elas podem dissipar parte do sinal elétrico (HEDRICH; SALVADOR-RECATALÀ; DREYER, 2016) o que pode ser interpretado como um “vazamento eletrofisiológico”.

Quanto à duração de cada pico ela foi similar entre as diferentes partes da planta, tanto na propagação basípeta quanto acrópeta (Tabela 1) o que está de acordo com Zawadski et al. (1991), também em girassol. Porém os autores utilizaram estímulo elétrico (choque) de 4V por 3s para estudar as características dos sinais.

Quanto à velocidade de propagação ela variou de 4,5 a 7,4 cm min⁻¹ na propagação basípeta e ficou em torno de 6 cm min⁻¹ na propagação acrópeta (Tabela 2). Estes resultados estão na mesma ordem de grandeza do que foi encontrado por Zawadski et al. (1991) - velocidade média de aproximadamente 8 cm min⁻¹ para ambas as direções.

O fato de ter ocorrido a geração de poucos picos na propagação basípeta inviabilizou uma análise estatística mais profunda.

6 CONCLUSÕES

Plantas de girassol sob déficit hídrico respondem eletricamente à irrigação pela geração de potenciais de ação, únicos ou seriados, tanto na direção acrópeta quanto basípeta, no caule ou na folha. O potencial de ação pode ser gerado também pós-irrigação mesmo a planta não tendo sofrido déficit hídrico, porém isso é mais incomum. Assim, fica evidenciada a importância do PA na sinalização de longa distância em plantas.

REFERÊNCIAS

- BAUER, H.; ACHE, P.; LAUTNER, S.; FROMM, J.; HARTUNG, W.; AL-RASHEID, K.A. S.; SONNEWALD, S.; SONNEWALD, U.; KNEITZ, S.; LACHMANN, N.; MENDEL, R. R.; BITTNER, F.; HETHERINGTON, A. M.; HEDRICH, R. The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis. **Current Biology**, London, v. 23, n. 1, p. 53–57, 2013.
- BRAMLEY, H.; TURNER, N.C.; TURNER, D.W.; TYERMAN, S.D. Comparison between gradient-dependent hydraulic conductivities of roots using the root pressure probe: the role of pressure propagations and implications for the relative roles of parallel radial pathways. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 30, p. 861–874, 2007.
- BURDON SANDERSON, J. Note on the electrical phenomena which accompany irritation of the leaf of *Dionaea muscipula*. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 21, p. 495–496, 1873.
- CHRISTMANN, A.; GRILL, E.; HUANG, J. Hydraulic signals in long-distance signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 16, n. 3, p. 293–300, 2013.
- DAVIES, E. Electrical signals in plants: facts and hypothesis. In: VOLKOV, A.G. (Ed.) **Plant electrophysiology**. Berlin: Springer-Verlag, 2006. p. 407–422.
- DAVIES, E.; ZAWADZKI, T.; WITTERS, D. Electrical activity and signal transmission in plants: how do plants know? In: PENEL, C.; GREPPIN, H. (Ed.). **Plant signalling, plasma membrane and change of state**. Geneva: University of Geneva, 1991. p. 119–137.
- DAVIES, W.J.; ZHANG, J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 55–76, 1991.
- DZIUBIŃSKA, H.; TRĘBACZ, K.; ZAWADZKI, T. The effect of excitation on the rate of respiration in the liverwort *Conocephalum conicum*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 75, n. 3, p. 417–423, 1989.
- ENDO, A.; SAWADA, Y.; TAKAHASHI, H.; OKAMOTO, M.; IKEGAMI, K.; KOIWAI, H.; SEO, M.; TOYOMASU, T.; MITSUHASHI, W.; SHINOZAKI, K.; NAKAZONO, M.; KAMIYA, Y.; KOSHIBA, T.; NAMBARA, E. Drought Induction of Arabidopsis 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Occurs in Vascular Parenchyma Cells. **Plant Physiology**, Washington, v. 147, n. 4, p. 1984–1993, 2008.
- FAVRE, P.; GREPPIN, H.; DEGLI AGOSTI, R. Repetitive action potentials induced in *Arabidopsis thaliana* leaves by wounding and potassium chloride application. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 39, n. 11, p. 961–969, 2001.
- FELLE, H.H.; ZIMMERMANN, M.R. Systemic signalling in barley through action potentials. **Planta**, Berlin, v. 226, n. 1, p. 203–214, 2007.
- FROMM, J. Long-distance electrical signaling and physiological functions in higher plants. In: VOLKOV, A.G. (Ed.). **Plant electrophysiology**. Theory and methods. Berlin: Springer-Verlag, 2006. p. 269–285.

- FROMM, J.; ESCHRICH, W. Electric Signals Released from Roots of Willow (*Salix viminalis* L.) Change Transpiration and Photosynthesis. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 141, n. 6, p. 673–680, 1993.
- FROMM, J.; FEI, H. Electrical signaling and gas exchange in maize plants of drying soil. **Plant Science**, Limerick, v. 132, n. 2, p. 203–213, 1998.
- FROMM, J.; HAJIREZAEI, M.; WILKE, I. The biochemical response of electrical signaling in the reproductive system of hibiscus plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 109, n. 2, p. 375–384, 1995.
- FROMM, J.; LAUTNER, S. Electrical signals and their physiological significance in plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 249–57, 2007.
- FROMM, J.; SPANSWICK, R. Characteristics of action potentials in willow (*Salix-viminalis* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 264, p. 1119–1125, 1993.
- FROST, C.J.; APPEL, H.M.; CARLSON, J.E.; De MORAES, C.M.; MESCHER, M.C.; SCHULTZ, J.C. Within-plant signalling via volatiles overcomes vascular constraints on systemic signalling and primes responses against herbivores. **Ecology Letters**, Oxford, v. 10, p. 490–498, 2007.
- GALLÉ, A.; LAUTNER, S.; FLEXAS, J.; FROMM, J. Environmental stimuli and physiological responses: The current view on electrical signaling. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 114, p. 15–21, 2015.
- GIL, P. M.; GUROVICH, L.; SCHAFFER, B.; GARCÍA, N.; ITURRIAGA, R. Electrical signaling, stomatal conductance, ABA and ethylene content in avocado trees in response to root hypoxia. **Plant Signaling and Behavior**, Philadelphia, v. 4, n. 2, p. 100–108, 2009.
- GILROY, S.; BIAŁASEK, M.; SUZUKI, N.; GÓRECKA, M.; DEVIREDDY AMITH, R.; KARPIŃSKI, S.; MITTLER, R. ROS, Calcium and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 171, n. 84, p. 1606–1615, 2016.
- GOLLAN, T.; PASSIOURA, J.B.; MUNN, R. Soil water status affects the stomatal conductance of fully turgid wheat and sunflower leaves. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 13, p. 459–464, 1986.
- GOWING, D.J.G.; DAVIES, W.J.; JONES, H.G. A positive root-sourced signal as an indicator of soil drying in apple, *Malus domestica* Borkh. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, p. 1535–1540, 1990.
- GRAMS, T.E.E.; KOZIOLEK, C.; LAUTNER, S.; MATYSSEK, R.; FROMM, J. Distinct roles of electric and hydraulic signals on the reaction of leaf gas exchange upon re-irrigation in *Zea mays* L. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 79–84, 2007.
- GUROVICH, L.A.; HERMOSILLA, P. Electric signalling in fruit trees in response to water applications and light-darkness conditions. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 166,

n. 3, p. 290–300, 2009.

HEDRICH, R.; SALVADOR-RECATALÀ, V.; DREYER, I. Electrical Wiring and Long-Distance Plant Communication. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 376–387, 2016.

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.

JIA, W.; ZHANG, J. Stomatal movements and long-distance signaling in plants. **Plant Signaling and Behavior**, Philadelphia, v. 3, n. 10, p. 772–777, 2008.

JOHNSON, B. R.; WYTTEBACH, R. A.; WAYNE, R.; HOY, R. R. Action potentials in a giant algal cell: a comparative approach to mechanisms and evolution of excitability. **Journal of Undergraduate Neuroscience Education**, Ithaca, v. 1, n. 1, p. 23–27, 2002.

KAISER, H.; GRAMS, T.E.E. Rapid hydropassive opening and subsequent active stomatal closure follow heat-induced electrical signals in *Mimosa pudica*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 9, p. 2087–2092, 2006.

KOSELKI, M.; TRĘBACZ, K.; DZIUBIŃSKA, H.; KRÓL, E. Light- and dark-induced action potentials in *Physcomitrella patens*. **Plant Signaling and Behavior**, Philadelphia, v. 3, n. 1, p. 13–18, 2008.

KOZIOLEK, C.; GRAMS, T.E.E.; SCHREIBER, U.; MATYSSEK, R.; FROMM, J. Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals. **New Phytologist**, Cambridge, v. 161, p. 715–722, 2003.

KRÓL, E.; DZIUBIŃSKA, H.; TRĘBACZ, K. What do plants need action potentials for? In: DUBOIS, M.L. (Ed.). **Action potential: biophysical and cellular context, initiation, phases, and propagation**. New York: Nova Science Publisher, 2010. p. 1-26.

LUNEVSKY, V.Z.; ZHERELOVA, O.M.; VOSTRIKOV, I.Y.; BERESTOVSKY, G.N. Excitation of Characeae cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels. **The Journal of Membrane Biology**, New York, v. 72, n. 12, p. 43–58, 1983.

MACEDO, F.C.O.; DZIUBIŃSKA, H.; TRĘBACZ, K.; OLIVEIRA, R.F.; MORAL, R. a. Action potentials in abscisic acid-deficient tomato mutant generated spontaneously and evoked by electrical stimulation. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 37, n. 10, p. 1-9, 2015.

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

- MANCUSO, S. Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in *Vitis vinifera*. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 26, n. 1, p. 55, 1999.
- MANCUSO, S.; MUGNAI, S. Long-distance signal transmission in trees. In: BALUSKA, F.; MANCUSO, S.; VOLKMANN, D. (Ed.). **Communication in plants**. Neuronal aspects of plant life. New York: Springer, 2006. p. 291–308.
- MILLER, G.; SCHLAUCH, K.; TAM, R.; CORTES, D.; TORRES, M.A.; SHULAEV, V.; DANGL, J.L.; MITTLER, R. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. **Science Signaling**, Washington, v. 2, p. 1–10, 2009.
- MINORSKY, P.V. Temperature sensing by plants: a review and hypothesis. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 119–135, 1989.
- MITTLER, R.; BLUMWALD, E. The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 27, p. 64–70, 2015.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; TOGNETTI, V.B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 16, p. 300–309, 2011.
- OYARCE, P.; GUROVICH, L. Electrical signals in avocado trees: responses to light and water availability conditions. **Plant Signaling and Behavior**, Philadelphia, v. 5, n. 1, p. 34–41, 2010.
- OYARCE, P.; GUROVICH, L. Evidence for the transmission of information through electric potentials in injured avocado trees. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, n. 2, p. 103–108, 2011.
- PASZEWSKI, A.; DZIUBIŃSKA, H.; TRĘBACZ, K.; ZAWADZKI, T. Electrical activity of the liverwort *Conocephalum conicum*: method of investigation and general characteristics of excitation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 54, p. 83–87, 1982.
- PAVLOVIC, A.; SLOVÁKOVÁ, L.; PANDOLFI, C.; MANCUSO, S. On the mechanism underlying photosynthetic limitation upon trigger hair irritation in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 6, p. 1991–2000, 2011.
- PICKARD, B. Action Potentials in higher plants. **The Botanical Review**, Boston, v. 39, n. 2, p. 172–201, 1973.
- REDDY, A.S.N.; ALI, G.S.; CELESNIK, H.; DAY, I.S. Coping with stresses: roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 6, p. 2010–2032, 2011.
- ROUSSET, M.; DE ROO, M.; LE GUENNEC, J.Y.; PICHON, O. Electrophysiological characterization of tomato hypocotyl putative action potentials induced by cotyledon heating. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, n. 2, p. 197–203, 2002.

SALIENDRA, N.; SPERRY, J.; COMSTOCK, J. Influence of leaf water status on stomatal response to humidity, hydraulic conductance, and soil drought in *Betula occidentalis*. **Planta**, Berlin, v. 196, p. 357–366, 1995.

SHIMMEN, T. Electrical Perception of “Death Message” in *Chara*: Involvement of Turgor Pressure. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 42, n. 4, p. 366–373, 2001.

SHVETSOVA, T.; MWESIGWA, J.; LABADY, A.; KELLY, S.; THOMAS, D.; LEWIS, K.; VOLKOV, A.G. Soybean electrophysiology: effects of acid rain. **Plant Science**, Limerick, v. 162, p. 723–731, 2002.

STAHLBERG, R.; CLELAND, R.E.; van VOLKENBURGH, E. Slow wave potentials -a propagating electrical signal unique to higher plants. In: BALUSKA, F.; MANCUSO, S.; VOLKMANN, D. (Ed.). **Communication in plants**. Neuronal aspects of plant life. New York: Springer, 2006. p. 291–308.

STAHLBERG, R.; COSGROVE, D.J. The Propagation of Slow Wave Potentials in Pea Epicotyls. **Plant Physiology**, Washington, v. 113, n. 1, p. 209–217, 1997.

STAHLBERG, R.; COSGROVE, D.J. Comparison of electric and growth responses to excision in cucumber and pea seedlings. I. Short-distance effects are a result of wounding. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 17, p. 1143–1151, 1994.

STANKOVIC, B.; WITTERS, D. L.; ZAWADZKI, T.; DAVIES, E. Action potentials and variation potentials in sunflower - An analysis of their relationships and distinguishing characteristics. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 103, p. 51–58, 1998.

STANKOVIC, B.; ZAWADZKI, T.; DAVIES, E. Characterization of the Variation Potential in Sunflower. **Plant Physiology**, Washington, v. 115, n. 3, p. 1083–1088, 1997.

STOLARZ, M.; KRÓL, E.; DZIUBIŃSKA, H.; KURENDA, A. Glutamate induces series of action potentials and a decrease in circumnutation rate in *Helianthus annuus*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 138, n. 3, p. 329–338, 2010.

SUKHOV, V.; SUROVA, L.; SHERSTNEVA, O.; BUSHUEVA, A.; VODENEEV, V. Variation potential induces decreased PSI damage and increased PSII damage under high external temperatures in pea. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 42, p. 727–736, 2015.

TAIZ, L. Regulation of cell wall mechanical properties. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 35, p. 585–657, 1984.

TANG, A.; BOYER, J.S. Growth-induced water potentials and the growth of maize leaves. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 489–503, 2002.

TRĘBACZ, K.; DZIUBIŃSKA, H.; KRÓL, E. Electrical signals in long-distance communication in plants. In: BALUSKA, F.; MANCUSO, S.; VOLKMANN, D. (Ed.). **Communication in plants**. Neuronal aspects of plant life. Berlin: Springer-Verlag, 2006. p. 277–290.

TRĘBACZ, K.; STOLARZ, M.; DZIUBIŃSKA, H.; ZAWADSKI, T. Electrical control of plant development. In: GREPPIN, H.; PENNEL, C.; SIMON, P. (Ed.). **Traveling shot on plant development**. Geneva: University of Geneva, 1997. p. 168-181.

VODENEEV, V.; AKINCHITS, E.; SUKHOV, V. Variation potential in higher plants: Mechanisms of generation and propagation. **Plant Signaling and Behavior**, Philadelphia, v. 10, n. 9, p. e1057365, 2015.

VOLKOV, A.G.; COLLINS, D.J.; MWESIGWA, J. Plant electrophysiology: Pentachlorophenol induces fast action potentials in soybean. **Plant Science**, Limerick, v. 153, n. 2, p. 185–190, 2000.

VOLKOV, A.G.; DUNKLEY, T.C.; MORGAN, S. a.; RUFF, D.; BOYCE, Y.L.; LABADY, A. J. Bioelectrochemical signaling in green plants induced by photosensory systems. **Bioelectrochemistry**, Amsterdam, v. 63, n. 1/2, p. 91–94, 2004.

VOLKOV, A. G.; O'NEAL, L.; VOLKOVA, M. I.; MARKIN, V. S. Morphing structures and signal transduction in *Mimosa pudica* L. induced by localized thermal stress. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 170, n. 15, p. 1317–1327, 2013.

WESTGATE, M.E.; BOYER, J.S. Transpiration- and growth-induced water potentials in maize. **Plant Physiology**, Washington, v. 74, p. 882–889, 1984.

WHITEHEAD, D. Regulation of stomatal conductance and transpiration in forest canopies. **Tree Physiology**, Oxford, v. 18, p. 633–644, 1998.

WHITEHEAD, D.; LIVINGSTON, N.J.; KELLIHER, F.M.; HOGAN, K.P.; PEPIN, S.; MCSEVENY, T.M.; BYERS, J.N. Response of transpiration and photosynthesis to a transient change in illuminated foliage area for a *Pinus radiata* D. Don tree. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 19, p. 949–957, 1996.

WILDON, D.C.; THAIN, J.F.; MINCHIN, P.E.H.; GUBB, I.R.; REILLY, A.J.; SKIPPER, Y.D.; DOHERTY, H.M.; O'DONNELL, P.J.; BOWLES, D. Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. **Nature**, London, v. 360, p. 62–65, 1992.

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**, New York, v. 19, n. 5, p. 531–541, 2009.

YAO, C.; MORESHET, S.; ALONI, B. Water relations and hydraulic control of stomatal behaviour in bell pepper plant in partial soil drying. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, p. 227–235, 2001.

ZAWADZKI, T.; DAVIES, E.; DZIUBIŃSKA, H. Characteristics of action potentials generated spontaneously in *Helianthus annuus*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 93, n. 2, p. 291–297, 1995.

ZAWADZKI, T.; DAVIES, E.; DZIUBIŃSKA, H.; TRĘBACZ, K. Characteristics of action potentials in *Helianthus annuus*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 83, n. 4, p. 601–

604, 1991.

ZEBELO, S.A.; MAFFEI, E.M. Signal transduction in plant–insect interactions: from membrane potential variations to metabolomics. In: VOLKOV, A.G. (Ed.). **Plant electrophysiology**. Berlin: Springer-Verlag, 2012. p 33–63.

ZHANG, J.; DAVIES, W.J. Antitranspirant activity in xylem sap of maize plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, p. 317–321, 1991.

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**, Washington, v. 149, n. 3, p. 1593–1600, 2009.

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

ZIMMERMANN, M.H.; BROWN, C.L. **Trees: structure and function**. Berlin: Springer-Verlag, 1971. 336 p.