

RAPHAEL JONAS CYPRIANO

**RECONHECIMENTO DE PADRÕES SONOROS POR PLANTAS:
UM ESTUDO DA RESPOSTA DE *Impatiens walleriana* AO CANTO
DE *Quesada gigas***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C996r
2013

Cypriano, Raphael Jonas, 1987-

Reconhecimento de padrões sonoros por plantas : um estudo da resposta de *Impatiens walleriana* ao canto de *Quesada gigas* / Raphael Jonas Cypriano. – Viçosa, MG, 2013.
xii, 53f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Flávia Maria da Silva Carmo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Evolução (Biologia). 2. Plantas - Efeito dos sons.
3. Relação inseto-planta. 4. Acústica. 5. Biofísica.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Ecologia. II. Título.

CDD 22. ed. 581.38

RAPHAEL JONAS CYPRIANO

**RECONHECIMENTO DE PADRÕES SONOROS POR PLANTAS:
UM ESTUDO DA RESPOSTA DE *Impatiens walleriana* AO CANTO
DE *Quesada gigas***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de Julho de 2013

Kacilda Naomi Kuki

Eraldo Rodrigues de Lima

Silvio da Costa Ferreira Junior

Flávia Maria da Silva Carmo
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e a todas as boas energias presentes no Universo que me conduziram por esse caminho de desbravar algo novo e tão importante sobre a interação entre seres vivos, num momento em que precisamos respeitar e valorizar cada vez mais todas as formas de vida que nos rodeiam. Agradeço às forças presentes em todas as florestas, jardins, campos, hortas e bosques espalhados por esse mundo que equilibram nosso planeta e nosso ser de uma forma sutil, com a harmonia de suas notas musicais.

Agradeço a minha família, meu grande porto seguro, pela maior manifestação de amor que experimento em minha vida. Gratidão por esse apoio incondicional que vocês têm por mim! Por toda amizade, respeito, confiança e por toda a educação que vocês me proporcionaram com toda sua luta diária, que culminou nesse trabalho. Gratidão Aryvelto Martins Cypriano, Sonia Jonas Cypriano e Juliana Jonas Cypriano.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia que se abriu a compreender o *novum*, coisa que muitos pesquisadores não estão dispostos a entender nos dias de hoje, devido a preconceitos e conservadorismos arraigados em suas mentes e corações. Grato por vocês me acolherem num momento em que estava sem perspectivas de conseguir pessoas que “comprassem a ideia” de que plantas respondem ao som, esse trabalho mostrou que elas não só respondem ao som, como isso pode revolucionar nossa compreensão sobre a própria Ecologia Vegetal. Muito obrigado!

Agradeço a professora Flávia Maria da Silva Carmo, por alimentar dentro de seu ser o real espírito de cientista que se manifesta na curiosidade de compreender o que nós ainda não compreendemos sobre o mundo a nossa volta. Muito grato, Flávia, por toda a orientação desse trabalho, por todo o apoio logístico e teórico, por difundir essa ideia dentro da UFV, mas principalmente por construirmos juntos uma nova ideia, mostrando que os seres vivos podem estar muito mais conectados na natureza do que imaginamos.

A Dr. Kacilda Naomi Kuki que me recebeu de braços abertos durante meu Trabalho de Conclusão de Curso em Biologia, quando estava desistindo de estudar o efeito do som em plantas, devido à dificuldade de se encontrar professores dispostos a orientar um trabalho com esse caráter. Muito obrigado Kuki por todas suas contribuições nesses três anos e meio de parceria que culminaram nesse estudo. Sua participação é central nessa pesquisa e todas as ideias geradas em nossas conversas estão permeando todo esse trabalho.

Agradeço ao Thomas Medeiros, ou melhor, Buldog, por todo o auxílio nesses três anos e meio. Você foi e é uma peça fundamental na construção de todas as ideias dessa pesquisa. Gratidão por todas as aulas informais de música e sons que me auxiliaram a compreender melhor toda a beleza contida nas ondas sonoras. Agradeço pelo trabalho de arquiteto das câmaras acústicas, pela gravação do som e por todo apoio logístico durante a realização de todo o Mestrado.

Agradeço ao professor Eraldo Rodrigues de Lima por acreditar em minha ideia e abrir seu laboratório para estudarmos o efeito do som na produção de voláteis em plantas. Infelizmente nosso experimento deu problema, mas a ideia ainda está no ar para ser estudada. Agradeço ao professor Silvio da Costa Ferreira Júnior pelo interesse no trabalho e pelas contribuições na parte física do estudo.

Ao Thiago, pela orientação na parte de fotossíntese, à Sandra, pelo auxílio na parte de voláteis, e ao André, pela ajuda com as fotos.

Agradeço a todos (as) do Laboratório de Ecologia, especialmente, à Silvia, ao Chiquinho, ao xará Raphael, ao Ricardo e a galera da genética que faziam o trabalho virar uma grande brincadeira, com muitas risadas e descontrações. Agradeço também aos colegas do PPG-Eco.

Ao Reinaldo e Alice, grandes amigos (as), que desde o primeiro momento acreditaram nessa ideia e sempre me estimularam nesse caminho, me coorientando na monografia e contribuindo em cada conversa na mesa de bar com a realização desse sonho. Muito obrigado!

Agradeço a todos (as) amigos e amigas que fizeram e fazem parte da minha caminhada em Friburgo e em Viçosa. Agradeço a minha família espiritual que sempre esteve e está ao meu lado, gratidão Jorge, Flora e Letícia por todo amor que compartilhamos entre nós. Gratidão, do fundo do coração aos meus eternos irmãos e irmãs de república e da vida, Júlio, Mariana, João, Camilo, Tatiana, Vítor, Emanuel por todo o compartilhar da vida. Não posso deixar de agradecer a Julicka, Zito, Zé Hilário, Chapola, Nina, Jú de BH, Lelé, Sassá, Pablito, Johnny, Pitt, Tigu, Siça, Lina, Maria Alice, Jackie, Douglas, dentre outros (as) grandes parceiros (as) da vida... porque sem vocês a vida não tem graça nenhuma!

Agradeço a Dona Rita, a Cida e Dona Rosilda por tantos banquetes inigualáveis que alimentavam não só meu corpo, como minha mente e meus sonhos. Grato por todos os sabores e saberes dos grupos de almoço que me acolheram nesses oito anos e meio de caminhada.

Agradeço a Viçosa, um lugar que me proporcionou vivenciar de tudo um pouco, tanto as belezas como as tristezas da vida, que me formaram como ser humano para o mundo. Gratidão Viçosa!

Agradeço ao Povo Mineiro que com seus impostos auxiliaram a pagar minha Bolsa de Mestrado que proporcionou a realização desse trabalho. Agradeço ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento deste trabalho, junto ao PPG-Eco, com uma Bolsa de Mestrado.

Por último, agradeço aos sonhos, sim, os sonhos que tanto alimentam nosso ser, que movem nossas vidas, que nos fazem viver para realizá-los, que nos desafiam diariamente, que nos instigam a alcançá-los, que surgem de repente e que podem levar uma vida inteira para vê-los tornar realidade. Esse trabalho é a realização de um sonho, ou melhor, de parte dele, porque ele ainda é muito maior que essa dissertação de mestrado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ANEXOS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências	7
CAPÍTULO 1: Abordagem metodológica para estudos de efeitos sonoros em plantas .	12
1. Introdução	12
2. Material e Métodos	13
2.1. Câmaras acústicas com isolamento sonoro	13
2.2. Gravação do som	16
2.3. Testes experimentais nas câmaras acústicas	17
2.4. Análise estatística	19
3. Resultados	19
4. Discussão	20
5. Referências	23
CAPÍTULO 2: Plantas reconhecem sons produzidos por insetos	26
1. Introdução	26
2. Material e Métodos	27
2.1. Gravação e análise do som	27
2.2. Câmaras acústicas com isolamento sonoro	29
2.3. Germinação e Desenvolvimento Inicial de <i>I. walleriana</i>	29
2.4. Trocas gasosas	30
2.5. Análise estatística	33
3. Resultados	33
3.1. Germinação e Desenvolvimento Inicial	33
3.2. Trocas gasosas	33
4. Discussão	37
5. Referências	41
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
Referências	49
ANEXOS	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Câmaras acústicas. A) Caixa externa com revestimento interno de lã de vidro. B) Caixas internas e externas, separadas pela camada de lã de vidro, e as dimensões da câmara acústica. 14

Figura 2: Tampas das caixas interna e externa das câmaras acústicas. A) À esquerda, tampa da caixa externa revestida com lã de vidro e com borracha esponjosa nas laterais; à direita, tampa da caixa interna composta por uma caixa de som e duas fitas de LED de 20cm. B) Câmara acústica completa: mais abaixo na imagem, as duas caixas separadas por uma camada de lã de vidro, e mais acima a tampa da caixa interna apoiada na tampa da caixa externa. C) Foto tirada de dentro da câmara acústica em funcionamento. 15

Figura 3: Planta no interior da câmara acústica. As plantas foram inseridas nas câmaras e as tampas das caixas interna e externa foram fechadas para exposição aos Tratamentos Sem exposição ao Som (TSS) e Tratamento Som das Cigarras (TSC). 19

Figura 4: Média (\pm Erro Padrão) da: (A) Taxa Fotossintética ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), (B) Relação Carbono interno/Carbono externo (Ci/Ca), (C) Condutância Estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e (D) Taxa de Transpiração ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em função dos Tratamentos Sem exposição ao Som (TSS) e Tratamento Som das Cigarras (TSC). Valores de significância: **= $P < 0,01$ e ***= $P < 0,001$. Foram feitas quatro medições de trocas gasosas ao longo do tempo, em cada planta, com o Analisador de Gás no Infra-Vermelho (IRGA), (ADC BioScientific, modelo LC-pro SD). 20

Figura 5: Curva de luz das plantas de *Impatiens walleriana*. Medição da taxa fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em função da radiação fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). A coleta dos dados foi realizada com o Analisador de Gás no Infra-Vermelho (IRGA), (ADC BioScientific, modelo LC-pro SD), em cinco plantas de *I. walleriana*. 31

Figura 6: Média (\pm Erro Padrão) da Taxa Fotossintética ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), em A e B, e da Relação Carbono interno/Carbono externo (Ci/Ca), em C e D, em função do Tratamento Som das Cigarras (TSC) e Tratamento Som das Cigarras Misturado (TSCM), comparados com o controle, Tratamento Sem exposição ao Som (TSS). Valores de significância: *= $P < 0,05$; **= $P < 0,01$ e ***= $P < 0,001$. Foram feitas

quatro medições de trocas gasosas ao longo do tempo, em cada planta, com o Analisador de Gás no Infra-Vermelho (IRGA), (ADC BioScientific, modelo LC-pro SD).34

Figura 7: Média (\pm Erro Padrão) da Condutância Estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), em A e B, e da Taxa de Transpiração ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), em C e D, em função do Tratamento Som das Cigarras (TSC) e Tratamento Som das Cigarras Misturado (TSCM), comparados com o controle, Tratamento Sem exposição ao Som (TSS). Foram feitas quatro medições de trocas gasosas ao longo do tempo, em cada planta, com o Analisador de Gás no Infra-Vermelho (IRGA), (ADC BioScientific, modelo LC-pro SD).35

Figura 8: Taxa Fotossintética ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em função do tempo (dias) e dos tratamentos durante os experimentos com som organizado e com som misturado das cigarras. Em preto, o Tratamento Som das Cigarras (TSC), com seu respectivo controle em verde, Tratamento Sem exposição ao Som, TSS (1). Em vermelho o Tratamento Som das Cigarras Misturado (TSCM) e em azul, seu respectivo controle, Tratamento Sem exposição Sonora, TSS (2). Repare que as curvas do primeiro experimento tem uma inclinação positiva ao longo do tempo, enquanto as curvas do segundo experimento decrescem ao longo do tempo. Isso ocorre devido à diferença entre as idades das plantas do primeiro e do segundo experimento. Contudo os TSS dos dois experimentos apresentam uma média semelhante e se cruzam exatamente na metade dos dias de exposição aos tratamentos (quinto dia). Enquanto que as curvas do TSC e do TSCM não se cruzam, mas se afastam ao longo do tempo. Foram feitas quatro medições de trocas gasosas ao longo do tempo, em cada planta, com o Analisador de Gás no Infra-Vermelho (IRGA), (ADC BioScientific, modelo LC-pro SD).36

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Animais emitindo sons na gravação, com suas respectivas banda de frequências (mínima e máxima) e intensidade. As espécies estão organizadas em ordem decrescente de intensidade do som produzido. O som da cigarra *Quesada gigas* apresenta intensidade sonora com uma ordem de grandeza 16 vezes maior que o segundo som, de *Fidicina mannifera*.51

Anexo 2: Oscilograma do Som das Cigarras Organizado (A) e do Som das Cigarras Misturado (B). Imagem feita com o software Avisoft SAS-Lab Lite.52

Anexo 3: Oscilograma (parte superior) e Sonograma (parte inferior) de 47s do Som das Cigarras Organizado (A) e do Som das Cigarras Misturado (B). O espectro de cores representam as variações de intensidade das frequências presentes no som, variando de azul escuro (baixa) até vermelho (alta). Em “A”, percebe uma linha vermelha quase contínua na faixa de 1.100Hz correspondente ao som produzido por *Quesada gigas* e uma faixa grande entre 4.000 e 9.000Hz, mostrando o padrão de canto de *Fidicina mannifera*. Comparando os sonogramas, pode-se identificar o padrão fragmentado das frequências no som misturado. Imagens feitas com o *software* SongScope v.4.1.3A. ...53

RESUMO

CYPRIANO, Raphael Jonas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2013. **Reconhecimento de padrões sonoros por plantas: um estudo da resposta de *Impatiens walleriana* ao canto de *Quesada gigas*.** Orientadora: Flávia Maria da Silva Carmo.

O som é um estímulo ambiental que pode ser detectado pelas plantas, influenciando seu comportamento, contudo, ainda não compreendemos quais são as implicações ecológicas das respostas vegetais ao som. Este trabalho teve por objetivo: (i) avaliar uma nova abordagem metodológica para estudos envolvendo efeitos sonoros em plantas e (ii) testar se sons emitidos por insetos podem ser utilizados pelas plantas como elementos acessórios para detectar condições e recursos ambientais, estimulando respostas fisiológicas sincronizadas. Para tanto, foram construídas dez câmaras com isolamento acústico para condução de três experimentos em condições semicontroladas de laboratório, com plantas de *Impatiens walleriana* divididas em tratamentos sonoros, expostos ao som por duas horas diárias, e tratamentos sem exposição ao som. No primeiro experimento, sementes foram submetidas ao som das cigarras por 16 dias, sendo avaliados padrões de germinação e desenvolvimento inicial. No segundo, plantas foram submetidas ao som das cigarras por dez dias, sendo analisados os efeitos do som nas trocas gasosas. E no último experimento, plantas foram expostas ao som das cigarras misturado, com o padrão sonoro desorganizado, por dez dias, sendo também avaliado seus efeitos nas trocas gasosas. Não foram verificadas diferenças significativas nos padrões germinativos e de desenvolvimento inicial das sementes expostas ao som das cigarras quando comparadas com o controle. Por outro lado, foi registrado um aumento significativo na Taxa Fotossintética nas plantas expostas ao som das cigarras, com redução na Relação Carbono interno/Carbono externo (Ci/Ca). Enquanto no tratamento exposto ao som das cigarras misturado foi verificada uma redução significativa na Taxa Fotossintética, sem alterações na Relação Ci/Ca. A metodologia proposta se mostrou eficaz para condução de experimentos avaliando o efeito de sons em plantas. Os resultados experimentais indicam que a influência do som das cigarras em *I. walleriana* dependem do estágio de desenvolvimento das plantas. Além disso, os dados de trocas gasosas sugerem que plantas podem reconhecer o som das cigarras como uma informação ambiental, uma vez que este som estimulou a atividade fotossintética, enquanto o som das cigarras desorganizado gerou uma resposta fisiológica inversa. A capacidade de perceber sons pode ser evolutivamente fixada entre

as plantas, sendo o processo de percepção do som ambiental, assimilação da mensagem acústica e disparo de respostas fisiológicas um mecanismo complexo com um significado ecológico em termos de integração das plantas com o ambiente que as rodeia.

ABSTRACT

CYPRIANO, Raphael Jonas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Recognition of sound patterns by plants: a study of the response of *Impatiens walleriana* to the singing of *Quesada gigas*.** Adviser: Flávia Maria da Silva Carmo.

Sound is an environmental stimulus that can be detected by plants, affecting their behavior. However, we still do not understand what are the ecological implications of plant responses to the sound. This search aimed: (i) to evaluate a new methodological approach for studies involving sound effects in plants and (ii) to test whether sounds emitted by insects may be used by plants as accessory elements to detect environmental conditions and resources, stimulating physiological responses synchronized. Ten chambers with acoustic isolation were constructed to conduct three experiments in semi-controlled conditions in laboratory with plants of *Impatiens walleriana*, divided into sound treatments exposed to the sound for two hours daily and treatments without sound exposure. In the first experiment, seeds were exposed to the sound of cicadas for 16 days and patterns of germination and initial development were evaluated. In the second, plants were subjected to the sound of cicadas for ten days and the effects of sound in gas exchange were analyzed. And in the last experiment, plants were exposed to the mixed sound of cicadas with the sound pattern disorganized for ten days and the effects in gas exchange were also evaluated. Compared to the control no significant differences in the patterns of germination and initial development of seeds exposed to the sound of cicadas were observed. Significant increases in the Photosynthetic Rate in plants exposed to the sound of cicadas were observed, followed by a reduction in Inner carbon/Outer carbon Ratio (C_i / C_a). On the other hand, plants exposed to the mixed sound of cicadas demonstrated a significant reduction in Photosynthetic Rate without changes in C_i/C_a Ratio. The methodological approach was efficient to conduct experiments evaluating the effect of sounds in plants. The experimental results indicate that the influence of the sound of cicadas in *I. walleriana* depends on the stage of plant development. Furthermore, gas exchange data suggests that plants can recognize the sound of cicadas as environmental information, since this sound stimulated photosynthetic activity while the mixed sound of cicadas generated a reversed physiological response. The ability to perceive sounds can be evolutionarily fixed among plants and the perception of environmental sounds, the assimilation of acoustic message and the trigger of physiological responses may be complex with an ecological significance in terms of integration of plants with the environment.

INTRODUÇÃO GERAL

Todos os seres vivos se relacionam com o ambiente ao seu redor, interagindo com componentes abióticos, tais como umidade, luz, temperatura e gravidade, e com outros organismos vivos, como predadores, presas, herbívoros, parasitas, mutualistas e indivíduos co-específicos. Durante o curso da evolução biológica desses seres vivos, adaptações que proporcionaram a obtenção de informações sobre condições e recursos ambientais foram sendo selecionadas, ajustando seu comportamento, sobrevivência e reprodução ao ambiente. O som é um desses estímulos ambientais que pode ser detectado por organismos vivos e influenciar seu desenvolvimento (Greenfield 2002; Reguera 2011; Aggio *et al.* 2012; Gagliano 2012).

O som é um tipo de onda mecânica longitudinal gerada por objetos em vibração. A vibração sonora emitida pela fonte é propagada por um meio material sólido, líquido ou gasoso, podendo ser percebida por organismos vivos (Claridge 2006).

A frequência do som é dada pelo número de oscilações da onda mecânica por segundo e está relacionada com o comprimento de onda. Esses dois parâmetros determinam a altura do som que pode ser grave, com frequências baixas, ou aguda, com frequências altas. Há vibrações sonoras não audíveis por seres humanos como infrassons, com frequências na faixa de 0 a 20 Hz, e ultrassons, localizados acima de 20.000 Hz. Já a intensidade sonora se relaciona com a amplitude de pressão da onda no meio em que se desloca e representa a energia mecânica contida na vibração. A duração, por sua vez, é dada pelo tempo de emissão do som pela fonte e pela duração da vibração no ambiente (Costa 2003; Claridge 2006). A qualidade sonora (ou timbre) é determinada pelo conjunto formado pela frequência fundamental e pelos seus harmônicos, frequências múltiplas inteiras da fundamental que soam com menor intensidade no som, gerando, assim, características peculiares contidas nas ondas sonoras que podem ser distinguíveis como informações por um organismo receptor do som (Claridge 2006; Petraglia 2008).

O som é produzido de maneira rápida e carrega em suas ondas tanto energia mecânica como informações, contidas em seus conjuntos de frequências, na sua duração e em suas variações de intensidades. Via de regra, essa vibração sonora é produzida com baixo gasto energético em comparação à produção de sinais químicos e quando o sinal é emitido com intensidade alta, pode atingir longas distâncias no ambiente, de forma rápida. Além disso, sons são rapidamente dissipados, permanecendo por pouco tempo no ambiente próximo ao organismo emissor, ao contrário de compostos químicos que

são mais duradouros e podem, por exemplo, atrair predadores. A detecção dos sinais sonoros e sua posterior tradução como informações ocorrem também de maneira instantânea para os organismos receptores da mensagem. Desta forma, sinais acústicos se constituem num mecanismo efetivo de comunicação entre organismos vivos, transmitindo informação em tempo real (Greenfield 2002; Gagliano 2012).

Em geral a mensagem sonora na natureza é composta pela mistura da frequência fundamental e de seus harmônicos. Os seres vivos não emitem tons puros, ou seja, não encontramos na natureza sons formados por apenas uma frequência. O som que mais se aproxima de um tom puro é aquele emitido por grilos (Greenfield 2002).

A utilização do som para comunicação foi evolutivamente selecionada no táxon dos animais, a partir de estruturas que se tornaram especializadas tanto na produção, como na recepção e tradução dos sinais sonoros. As vibrações sonoras são empregadas na comunicação entre indivíduos da mesma espécie, sendo importantes mediadores de interações sociais, como comportamentos agressivos, sinais de alerta e, principalmente, em processos de coorte. Esses sons podem também ser utilizados por outras espécies da comunidade, como predadores, que localizam suas presas através do som específico emitido por elas (Greenfield 2002; Drosopoulos & Claridge 2006).

Contudo, a habilidade de produção e de resposta às ondas sonoras parece não ser uma exclusividade dos animais, podendo ser uma característica ancestral comum aos seres vivos, constituindo uma modalidade sensorial primária de percepção do ambiente, a exemplo de mecanismos de detecção e respostas morfo-fisiológicas e comportamentais à luz, temperatura e umidade (Reguera 2011; Gagliano 2012).

Matsushashi *et al.* (1998) verificaram que a eficiência na formação de colônias de bactérias da espécie *Bacillus carboniphilus* aumentaram quando estas foram expostas à sons em intervalos de frequência entre 6-10, 18-22 e 28-38 KHz. Shaobin *et al.* (2010) também detectaram aumento na eficiência de formação de colônias de *Escherichia coli* nas frequências de 1,0, 5,0 e 10,0 KHz. Vargas *et al.* (2004), por sua vez, constataram que a atividade da enzima invertase de *Aspergillus niger* foi estimulada quando estes foram expostos à frequência sonora de 20 KHz. Enquanto que Aggio *et al.* (2011) obtiveram resultados expressivos da atuação sonora em *Saccharomyces cerevisiae*, demonstrando que tanto música quanto sons de 100 Hz e 10.000 Hz de frequência, influenciaram de forma muito significativa a atividade de 16 compostos de natureza protéica. Essas respostas variaram de acordo com o som aplicado e com o composto analisado, resultando tanto em estímulo como em redução da atividade desses compostos.

A produção de vibrações mecânicas e sons também foi registrada em outros organismos fora do táxon dos animais. Pelling *et al.* (2004), demonstraram que paredes celulares de células vivas de *Saccharomyces cerevisiae* exibem movimentações periódicas com amplitudes nanométricas de $3,0(\pm 0,5)$ nm. As frequências dessas vibrações mecânicas variam de acordo com a temperatura, oscilando de 873 Hz à 22°C, até 1.634 Hz à 30°C. Quando é aplicado NaN_3 , um inibidor metabólico, a vibração celular cessa, sugerindo que esta é decorrente da atividade metabólica. Matsushashi *et al.* (1998), gravaram o som produzido por *Bacillus subtilis* e apontaram que as colônias desta espécie emitem sons com frequência fundamental localizada entre 8,5 e 9 KHz, coincidindo com o mesma faixa de frequência em que ocorrem as respostas em *B. carboniphilus*. Enquanto Gagliano *et al.* (2012) demonstraram que raízes de plântulas de milho (*Zea mays*) produzem ondas sonoras na forma de *clicks* frequentes.

Nessa perspectiva, Reguera (2011) e Gagliano (2012) propõem, respectivamente, que micro-organismos e plantas produzem ondas sonoras geradas por vibrações nanomecânicas oriundas da movimentação de elementos intracelulares e de contato e atrito de estruturas, tanto no meio intra como extracelular. Alguns processos que poderiam produzir ondas sonoras seriam: a atividade do citoesqueleto, de proteínas motoras e transmembrana (como a bomba de Na^+/K^+), reações enzimáticas, replicação, transcrição e tradução, bem como processos de divisão celular, de movimentação da seiva pelos vasos condutores e de dobramento e desdobramento de estruturas, como paredes celulares. As plantas, então, assim como outros organismos, parecem apresentar a capacidade de produzir ondas sonoras. Mas a grande questão é como elas podem detectar o estímulo sonoro presente no ambiente.

A sensibilidade ao som exige a presença de elementos adequados a sua captação e diferentes estruturas vegetais podem ser funcionalmente adaptadas para executar a tarefa biofísica de detectar essa vibração no ambiente. Também, a exemplo de outros seres vivos, estruturas presentes nas superfícies corporais podem ser sensíveis às ondas sonoras. Larvas de corais *Montastraea faveolata*, animais sem sistema nervoso nem órgãos auditivos especializados, nadam em direção a sons emitidos por recifes de corais, o que sugere que elas utilizam o som como um sinal para localizar um substrato para fixação (Vermeij *et al.* 2010). Cílios presentes na superfície corporal das larvas podem apresentar sensibilidade a ondas sonoras, um mecanismo análogo a pêlos espalhados no corpo de insetos, que são sensíveis a vibrações sonoras do ambiente (Greenfield 2002; Vermeij *et al.* 2010). E nas plantas, podemos destacar os tricomas, principais apêndices

epidérmicos vegetais, como possíveis estruturas sensíveis a vibrações sonoras (Gagliano *et al.* 2012).

Telewski (2006), por sua vez, propôs que componentes vegetais que apresentam propriedades mecânicas de amortecimento, tais como membranas e/ou paredes celulares, também poderiam ser sensíveis a sons. Uchida & Yamamoto (2002), defendem que amiloplastos envolvidos nas respostas gravitrópicas poderiam também ser estruturas sensíveis ao som, uma vez que sementes de *Arabidopsis thaliana* respondem às ondas sonoras, enquanto que sementes da mesma espécie, deficientes na produção de amido, não exibem alterações nos padrões germinativos.

Uma vez que plantas podem detectar ondas sonoras é lícito se pensar que podem também responder ao estímulo sonoro ambiental.

Nas décadas de 60 e 70 foram realizados os primeiros estudos científicos avaliando respostas das plantas à aplicação de sons (Measures & Weinberger 1970; Hageseth 1974). Ao mesmo tempo, foi publicado o livro “*A vida secreta das plantas*”, de Tompkins e Bird (1973), que relatava pesquisas realizadas por agricultores indicando aumento do crescimento e produtividade vegetais em resposta à aplicação de sons e músicas. Contudo somente na última década houve um aumento no número desses trabalhos científicos.

Porém, a maior parte dos estudos que foram realizados até o momento tinha como objetivo avaliar o efeito de frequências sonoras puras em cultura de tecidos vegetais. Essas pesquisas apontaram que as vibrações sonoras podem interferir na fisiologia, atuando sobre a síntese de hormônios, como AIA e ABA (Bochu *et al.* 2004), na estrutura e fluidez da membrana plasmática (Zhao *et al.* 2002a; Zhao *et al.* 2002b), na divisão celular (Xiujuan *et al.* 2003a) e no conteúdo de ATP, carboidratos, proteínas e enzimas, tais como H⁺ATPase, AIA oxidase, superóxido dismutase, catalase, peroxidase, ascorbato peroxidase (Wang *et al.* 2002; Yang *et al.* 2002; Xiaocheng *et al.* 2003; Xiujuan *et al.* 2003b; Yi *et al.* 2003; Zhao *et al.* 2003; Li *et al.* 2008). Outros trabalhos mostraram que sons podem afetar a germinação e desenvolvimento inicial (Uchida & Yamamoto 2002; Bochu *et al.* 2003; Petraglia 2008) e aumentar o conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e a taxa fotossintética de plantas (Meng *et al.* 2012; Cypriano *et al.* dados não publicados). Além disso, sons podem ocasionar alterações a nível molecular, interferindo na expressão gênica (Xiujuan *et al.* 2003c; Jeong *et al.* 2007; Hongbo *et al.* 2008) e produzindo respostas morfológicas, como o curvamento em direção à vibração (Gagliano *et al.* 2012), sugerindo que plantas podem apresentar um tipo de tropismo sonoro.

Todos esses estudos relatados acima indicam que plantas respondem às ondas sonoras. Essas respostas parecem variar de acordo com as características do som aplicado, como sua frequência e intensidade. A duração do estímulo, bem como a espécie avaliada e o estágio de desenvolvimento do organismo vegetal também são aspectos que devem ser considerados. A resposta das plantas à vibração sonora pode ser positiva, estimulando, ou negativa, inibindo seu desenvolvimento. Essas evidências demonstram que a influência do som em organismos vegetais depende de muitos fatores e a combinação de todas essas variáveis gera múltiplas possibilidades de estudos (Yang *et al.* 2002; Petraglia 2008; Gagliano 2012).

Mas haveria um sentido ecológico destas respostas vegetais às ondas sonoras? O som detectado pelas plantas pode ser traduzido pelas plantas como informações sobre o ambiente?

Recentemente Gagliano (2012) propôs que plantas podem ter desenvolvido sensibilidade ao som durante a evolução, como um modo de perceber o ambiente que as rodeia, e que essa característica pode ter sido evolutivamente fixada no grupo. A autora defende que plantas não só respondem a sons produzidos por animais, como as vibrações sonoras produzidas pelas próprias plantas podem ser empregadas na comunicação vegetal, indo ao encontro das ideias propostas por Reguera (2011), para micro-organismos.

Uma das principais abordagens que podemos derivar dessa hipótese se aplica à interação entre animais e plantas nos ecossistemas.

Os animais são grandes produtores de sons na natureza, sendo organismos intimamente relacionados com plantas, com as quais coevoluem há milhões de anos, formando tanto relações mutualistas como antagonistas. Nessas interações podem atuar forças seletivas recíprocas, gerando sincronização de modificações estruturais, fisiológicas e comportamentais das espécies envolvidas. A relação entre plantas e animais é altamente dependente dos sinais emitidos por ambos os grupos. Sinais visuais e químicos, por exemplo, comunicam a localização, a qualidade e a abundância de néctar e pólen requeridos por polinizadores. Em contrapartida, insetos apresentam órgãos, comportamentos e fisiologias adaptados à captação e tradução desses sinais. Nesse processo de co-evolução entre pares, plantas e animais obtêm vantagens que podem aumentar sobrevivência e sucesso reprodutivo de ambos (Mello, 2002; Schaefer *et. al.*, 2004; Bronstein, 2006; Karban 2008). Assim, a percepção da presença, por exemplo, de polinizadores ou herbívoros no ambiente pode ser um fator importante para a sincronização dessas relações ecológicas (Bronstein, 2006; Karban, 2008) e um dos

meios pelos quais isso pode ocorrer é através da detecção pelas plantas de sons emitidos por animais.

Um indício da recepção pelas plantas de ondas sonoras produzidas por animais ocorre na interação entre plantas e morcegos nectarívoros. Ao longo da evolução da quiropterifilia, plantas de *Marcgravia* desenvolveram folhas côncavas, com formato de antena parabólica, localizadas imediatamente acima das inflorescências, que refletem ultrassons emitidos por morcegos vindos de várias direções no ambiente, auxiliando-os na ecolocalização dessas flores na vegetação (Simon *et al.* 2006; Simon *et al.* 2011).

A polinização por vibração (*buzz pollination*), encontrada em mais de 20.000 espécies de plantas, é mais um exemplo de coevolução entre animais e plantas mediada pelo som. Nessa interação inseto-planta, a vibração sonora produzida pelos músculos de voo de abelhas de médio e grande porte, como *Bombus*, *Xylocopa* e *Anthophora*, em frequências e intensidades adequadas, estimulam a abertura de anteras poricidas e a liberação de pólen. Enquanto que abelhas que produzem sons em frequências e intensidades diferentes, como *Apis mellifera*, não estimulam a abertura das anteras (Buchmann & Hurley 1978; Silva *et al.* 2010; De Luca & Vallejo-Marín 2013), mostrando o quanto ondas sonoras estão envolvidas na sincronização de interações ecológicas entre insetos e plantas e sua especificidade.

Além disso, muitos insetos utilizam as folhas como um elemento de propagação de vibrações mecânicas e sonoras, sendo a planta um substrato de difusão do som, absorvendo a energia das vibrações que interagem com seus tecidos foliares (Martens & Michelsen 1981; Magal *et al.* 2000). Contudo ainda não sabemos se sons absorvidos pela lâmina foliar podem gerar alterações no interior das plantas nem quais seriam os mecanismos envolvidos.

Embora ainda existam muitas perguntas sem resposta, está claro que a coevolução de insetos e de plantas e a produção de sons por insetos é antiga na natureza.

O surgimento de estruturas produtoras de sons em insetos ocorreu em torno de 100 milhões de anos antes do aparecimento do grupo das Angiospermas, de acordo com os registros fósseis. Órgãos produtores de sons (estridulação) foram encontrados no grupo Orthoptera do Triássico, há 245 milhões de anos (Otte 1992; Plotnick & Smith 2012), enquanto que o surgimento das Angiospermas ocorreu somente no Cretáceo, há 145 milhões de anos (Taylor *et al.* 2009). Desta forma, quando as angiospermas começaram a se diversificar e coevoluir com insetos, estes já se comunicavam através de vibrações sonoras. Assim sendo, a percepção de sons produzidos por insetos pode ser uma característica ancestral no grupo dos vegetais.

Baseado no que foi explicitado acima, este trabalho teve por objetivo testar se sons emitidos por insetos podem ser utilizados pelas plantas como elementos acessórios para detectar condições e recursos ambientais, estimulando respostas fisiológicas sincronizadas.

O trabalho foi dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo é apresentada uma nova proposta metodológica de se estudar o efeito do som em plantas, empregando câmaras isoladas acusticamente para a condução de experimentos em condições semi-controladas. Já no segundo capítulo são descritos os experimentos realizados com as câmaras acústicas e os dados experimentais são analisados e discutidos, à luz da hipótese proposta.

Referências

- Aggio, R.B.M., Obolonkin, V. & Villas-Bôas, S.G. (2011). Sonic vibration affects the metabolism of yeast cells growing in liquid culture: a metabolomic study. *Metabolomics*, 8, 670–678.
- Bochu, W., Jiping, S., Biao, L., Jie, L. & Chuanren, D. (2004). Soundwave stimulation triggers the content change of the endogenous hormone of the *Chrysanthemum* mature callus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 37, 107–112.
- Bronstein, J.L., Alarcón, R. & Geber, M. (2006). The evolution of plant-insect mutualisms. *The New Phytologist*, 172, 412–428.
- Buchmann, S.L. & Hurley, J.P. (1978). A biophysical model for buzz pollination in angiosperms. *Journal of Theoretical Biology*, 72, 639–657.
- Claridge (2006). Insect sounds and communication – an introduction. In: *Insect sounds and communication: physiology, behaviour, ecology and evolution*. (eds. Drosopoulos, S. & Claridge, M.F). Taylor & Francis Group, USA. pp. 3-10.
- Costa, E. C. (2003) *Acústica Técnica*. Edgard Blücher, São Paulo.
- De Luca, P. & Vallejo-Marín, M. (2013). What's the “buzz” about? The ecology and evolutionary significance of buzz-pollination. *Current Opinion in Plant Biology*, 16, 1–7.

- Drosopoulos, S. & Claridge, M.F. (2006). *Insect sounds and communication: physiology, behaviour, ecology and evolution*. Taylor & Francis Group, USA.
- Gagliano, M. (2012). Green symphonies: a call for studies on acoustic communication in plants. *Behavioral Ecology*, 1–7.
- Gagliano, M., Mancuso, S. & Robert, D. (2012). Towards understanding plant bioacoustics. *Trends in Plant Science*, 17, 323–325.
- Greenfield, M.D. (2002). *Signalers and Receivers: mechanisms and evolution of Arthropod communication*. Oxford University Press, New York (USA).
- Hageseth, G.T. (1974). Effect of sound on the germination rate of turnip seeds. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 55, 886–887.
- Hongbo, S., Biao, L., Bochu, W., Kun, T. & Yilong, L. (2008). A study on differentially expressed gene screening of *Chrysanthemum* plants under sound stress. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 329–333.
- Jeong, M. J., Shim, C. K., Lee, J. O., Kwon, H. B., Kim, Y. H., Lee, S. K., *et al.* (2007). Plant gene responses to frequency-specific sound signals. *Molecular Breeding*, 21, 217–226.
- Karban, R. (2008). Plant behaviour and communication. *Ecology Letters*, 11, 727–739.
- Li, B., Wei, J., Wei, X., Tang, K., Liang, Y., Shu, K., *et al.* (2008). Effect of sound wave stress on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of *Dendrobium candidum*. *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces*, 63, 269–75.
- Magal, C., Schöller, M., Tautz, J. & Casas, J. (2000). The role of leaf structure in vibration propagation. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 108, 2412–2418.
- Martens, M.J.M. & Michelsen, A. (1981). Absorption of acoustic energy by plant leaves. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 69, 303–306.
- Matsushashi, M., Pankrushina, A.N.L., Takeuchi, S., Ohshima, H., Miyoi, H., Endoh, K., *et al.* (1998). Production of sound waves by bacterial cells and the response of

- bacterial cells to sound. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 44, 49–55.
- Measures, M. & Weinberger, P. (1970) Effects of an audible sound frequency on total amino acids and major free alcohol soluble amino acids of Rideau wheat grain. *Canadian Journal of Plant Science*, 53, 737-742.
- Mello, M.O. & Silva-filho, M.C. (2002). Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology.*, 14, 71–81.
- Meng, Q., Zhou, Q., Zheng, S. & Gao, Y. (2012). Responses on Photosynthesis and Variable Chlorophyll Fluorescence of *Fragaria ananassa* under Sound Wave. *Energy Procedia*, 16, 346–352.
- Otte, D. (1992). Evolution of cricket songs. *Journal of Orthoptera Research*, 1, 25–49.
- Pelling, A.E., Sehati, S., Gralla, E.B., Valentine, J.S. & Gimzewski, J.K. (2004). Local nanomechanical motion of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (New York, N.Y.)*, 305, 1147–1150.
- Petraglia, M.S. (2008). *Estudo sobre a ação de vibrações acústicas e música em organismos vegetais*. Dissertação de Mestrado (Biologia Geral e Aplicada), Unesp – Botucatu.
- Plotnick, R.E. & Smith, D.M. (2012). Exceptionally Preserved Fossil Insect Ears from the Eocene Green River Formation of Colorado. *Journal of Paleontology*, 86, 19–24.
- Reguera, G. (2011). When microbial conversation get physical. *Trends in Microbiology*, 19, 105–113.
- Schaefer, H., Schaefer, V. & Levey, D. (2004). How plant-animal interactions signal new insights in communication. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 577–584.
- Shaobin, G., Wu, Y., Li, K., Li, S., Ma, S., Wang, Q., *et al.* (2010). A pilot study of the effect of audible sound on the growth of *Escherichia coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 78, 367–371.

- Silva, P.N., Hrnčir, M. & Fonseca, V.L.I. (2010). A Polinização Por Vibração. *Oecologia Australis*, 14, 140–151.
- Simon, R., Holderied, M.W. & von Helversen, O. (2006). Size discrimination of hollow hemispheres by echolocation in a nectar feeding bat. *The Journal of Experimental Biology*, 209, 3599–3609.
- Simon, R., Holderied, M.W., Koch, C.U. & von Helversen, O. (2011). Floral acoustics: conspicuous echoes of a dish-shaped leaf attract bat pollinators. *Science (New York, N.Y.)*, 333, 631–633.
- Taylor, T.N., Taylor, E.L. & Krings, M. (2009). *Paleobotany: the biology and evolution on fossil plants*. 2nd edn. Elsevier: USA.
- Telewski, F.W. (2006). A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *American Journal of Botany*, 93, 1466–1476.
- Tompkins, P. & Bird, C. (1973) *The secret life of plants*. Harper & Row, New York (USA).
- Uchida, A. & Yamamoto, K.T. (2002). Effects of mechanical vibration on seed germination of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant & Cell Physiology*, 43, 647–651.
- Vargas, L.H.M. & Pia, A.C.S. (2004). Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20, 137–142.
- Vermeij, M.J. a, Marhaver, K.L., Huijbers, C.M., Nagelkerken, I. & Simpson, S.D. (2010). Coral larvae move toward reef sounds. *PloS One*, 5, 1–4.
- Wang, B., Zhao, H., Wang, X., Duan, C., Wang, D. & Sakanishi, A. (2002). Influence of sound stimulation on plasma membrane H⁺ ATPase activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 25, 183–188.
- Xiaocheng, Y., Bochu, W. & Chuanren, D. (2003). Effects of sound stimulation on energy metabolism of *Actinidia chinensis* callus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 30, 67–72.

- Xiujuan, W., Bochu, W., Yi, J., Danqun, H. & Chuanren, D. (2003a). Effect of sound stimulation on cell cycle of chrysanthemum (*Gerbera jamesonii*). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 29, 103–107.
- Xiujuan, W., Bochu, W., Yi, J., Defang, L. & Chuanren, D. (2003b). Effects of sound stimulation on protective enzyme activities and peroxidase isoenzymes of chrysanthemum. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 27, 59–63.
- Xiujuan, W., Bochu, W., Yi, J., Chuanren, D. & Sakanishi, A. (2003c). Effect of sound wave on the synthesis of nucleic acid and protein in chrysanthemum. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 29, 99–102.
- Yang, X., Wang, B., Liu, Y., Duan, C. & Dai, C. (2002). Biological effects of *Actinidia chinensis* callus on mechanical vibration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 25, 197–203.
- Yi, J., Bochu, W., Xiujuan, W., Chuanren, D. & Xiaocheng, Y. (2003). Effect of sound stimulation on roots growth and plasmalemma H⁺ATPase activity of chrysanthemum (*Gerbera jamesonii*). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 27, 65–69.
- Zhao, H., Wang, B., Cai, S. & Xi, B.S. (2002a). Effect of sound stimulation on the lipid physical states and metabolism of plasma membrane from *Chrysanthemum* callus. *Acta Botanica Sinica*, 44, 799–803.
- Zhao, H., Wu, J., Xi, B. & Wang, B. (2002b). Effects of sound-wave stimulation on the secondary structure of plasma membrane protein of tobacco cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 25, 29–32.
- Zhao, H.C., Wu, J., Zheng, L., Zhu, T., Xi, B.S., Wang, B., *et al.* (2003). Effect of sound stimulation on *Dendranthema morifolium* callus growth. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 29, 143–147.

CAPÍTULO 1

Abordagem metodológica para estudos de efeitos sonoros em plantas

1. Introdução

Plantas são influenciadas por diversos fatores ambientais, sendo sensíveis a forças intensas até distúrbios muito sutis. Estes organismos desenvolveram, ao longo do tempo evolutivo, mecanismos eficazes na detecção do ambiente a sua volta, respondendo de forma específica a diferentes estímulos bióticos e abióticos (Trewavas 2005; Karban 2008). Exposição ao vento, contato com barreiras físicas e predação são exemplos de estímulos mecânicos que influenciam as plantas. As respostas vegetais a esses elementos são denominadas tigmomorfogênese (Jaffe 1973; Chelab *et al.* 2009). O som é mais uma força mecânica presente na natureza que pode influenciar o desenvolvimento de organismos vegetais (Uchida & Yamamoto 2002; Telewski 2006; Jeong *et al.* 2007; Gagliano *et al.* 2012).

Estudos avaliando o efeito das vibrações sonoras em plantas são recentes. As pesquisas mostram que o som pode influenciar a germinação (Uchida & Yamamoto 2002), a fotossíntese (Meng *et al.* 2012; Cypriano *et al.* dados não publicados), o crescimento de raízes (Gagliano *et al.* 2012), a atividade de hormônios (Bochu *et al.* 2004) e enzimas (Yi *et al.* 2003; Li *et al.* 2008), bem como a expressão gênica (Jeong *et al.* 2007; Hongbo *et al.* 2008). Segundo Gagliano (2012), plantas podem ter desenvolvido sensibilidade ao som durante a evolução como uma forma de perceber e interagir com o ambiente a sua volta.

Uma variável importante em estudos que avaliem efeitos de estímulos ambientais em plantas é a taxa fotossintética. A fotossíntese é uma das principais atividades vegetais, estando diretamente relacionada ao crescimento da planta. Sua medição é pontual, instantânea, não destrutiva e muito sensível a alterações nas condições ambientais, tais como modificações na luminosidade, temperatura, umidade e concentração de gases. Dessa forma, a medição da taxa fotossintética pode ser importante em estudos que busquem avaliar efeitos de vibrações sonoras em plantas.

Por ser uma área de estudos ainda em desenvolvimento não há uma metodologia unificadora para a realização de experimentos utilizando-se sons e na literatura científica, encontramos diferentes abordagens metodológicas (Uchida e Yamamoto 2002; Bochu *et al.* 2004; Petraglia 2008; Bai *et al.* 2010; Gagliano *et al.* 2012; Meng *et*

al. 2012). Em comum, porém, ten Cate (2012), Bailey (2013) e Gagliano (2013) defendem a condução de experimentos sob condições semi-controladas, com reprodução de sons gravados. Para tanto, é necessário a utilização de estruturas fechadas e isoladas acusticamente, com fontes sonora e luminosa, uma vez que o som é uma vibração mecânica que se propaga por todo o meio, e a ausência de isolamento sonoro pode gerar “contaminações” entre diferentes tratamentos.

Neste estudo é descrita a metodologia para a construção de câmaras acústicas destinadas a realização de experimentos com plantas submetidas a estímulos sonoros, visando à obtenção de respostas nas trocas gasosas.

2. Material e Métodos

2.1. Câmaras acústicas com isolamento sonoro

Foram construídas 10 câmaras com isolamento acústico para realização de experimentos em laboratório, sob condições semi-controladas, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, Brasil.

Foram construídas 20 caixas de madeira compensada com 10 mm de espessura, em dois tamanhos: 10 caixas com 62 x 62 x 86 cm (caixa externa) e 10 caixas com 45 x 45 x 76 cm (caixa interna). Todas as caixas foram construídas com abertura na parte superior, onde posteriormente se encaixavam as tampas.

O interior das caixas externas foi revestido com lã de vidro (Isover Saint-Gobain) de densidade de 16 Kg/m³ e 50 mm de espessura. A face da lã de vidro contendo papel Kraft foi colada com fita adesiva dupla face (Scotch) nas paredes internas e assoalho das caixas (Figura 1A). Após o revestimento com lã de vidro, as caixas internas foram inseridas nas caixas externas e, para impedir o contato direto entre elas e evitar o vazamento de vibrações, foram colados calços de isopor, nas dimensões 7,0 x 7,0 x 4,0 cm, nas quatro extremidades inferiores das caixas internas (Figura 1B).

Foram confeccionadas tampas tanto para as caixas externas quanto para as internas. As tampas das caixas externas foram preparadas com dimensões de 66 x 66 cm, com bordas de 2 cm para encaixe. Na parte interna das tampas, justaposta internamente à borda, foi presa uma fita de borracha esponjosa de 1,0 x 2,0 cm e distando 3,5 cm da fita de borracha, foi colado um quadrado de 55 x 55 cm de lã de vidro, para evitar o vazamento do som (Figura 2A). As tampas das caixas internas foram confeccionadas nas dimensões de 47 x 47 cm, com altura de borda de 2 cm, nas quais não foram coladas fitas de borracha esponjosa.

Para a instalação sonora e luminosa nas câmaras acústicas, foram feitas aberturas circulares de 3,5 cm de diâmetro, nas caixas externas e internas. Foram feitos furos no centro da tampa da caixa interna e numa das laterais da caixa externa, a 25 cm da borda superior e a 12cm da lateral, de forma a não estarem na mesma direção e portanto, evitando escape de som. Quando as caixas internas foram fechadas, os fios emergiam do ponto central nas tampas e seguiam para as aberturas nas laterais das caixas externas, passando entre a lã de vidro e a lâmina de madeira, surgindo externamente. Após a passagem dos fios, as aberturas foram fechadas com silicone adesivo. Ao conjunto de duas caixas, externa e interna, com suas respectivas tampas, deu-se o nome de câmara acústica (Figura 2B).

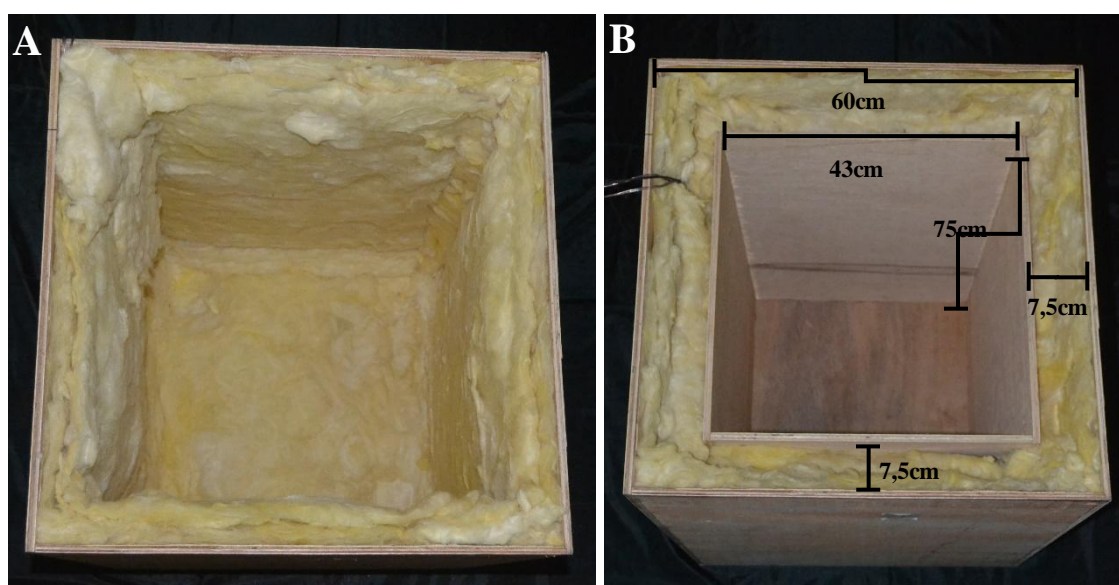


Figura 1: Câmaras acústicas. A) Caixa externa com revestimento interno de lã de vidro. B) Caixas internas e externas, separadas pela camada de lã de vidro, e as dimensões da câmara acústica.

2.1.1. Fonte sonora

As fontes sonoras das câmaras acústicas foram constituídas por caixas de som (WX-201, modelo multimedia 3 W), responsiva a frequências entre 100 e 20.000Hz. Cada câmara acústica recebeu uma caixa de som, que funcionavam em pares, sendo uma principal e a outra secundária. As caixas de som principais apresentavam três saídas, uma P2 para alimentação sonora, outra USB para entrada de energia e um cabo de conexão com a caixa secundária. No cabo de conexão entre as caixas principais e as secundárias foram inseridos conectores RCA que possibilitaram a conexão e desconexão entre duas caixas de som, principal e secundária.

As caixas de som foram fixadas com fita adesiva exatamente no centro da tampa das caixas internas (Figura 2). Os cabos USB foram conectados em extensões USB

macho-fêmea, de 1,8 m, que foram ligadas a um notebook (Dell, modelo PP41L). As saídas P2 foram conectadas a extensões P2 macho-fêmea, também de 1,8 m, que por sua vez foram ligadas a um amplificador. E a terceira saída das caixas de som principais foram conectadas às caixas de som secundárias, instaladas em outra câmara acústica.

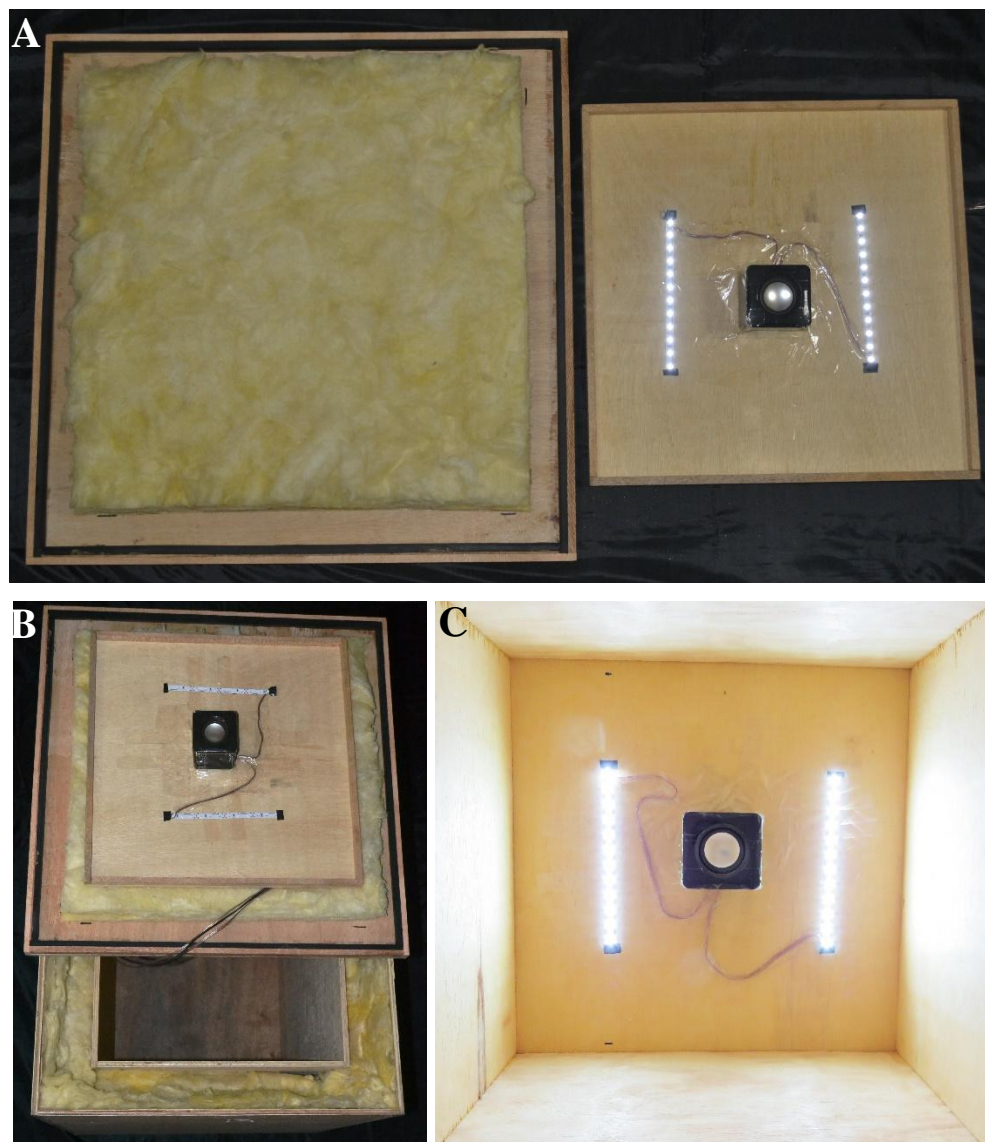


Figura 2: Tampas das caixas interna e externa das câmaras acústicas. A) À esquerda, tampa da caixa externa revestida com lã de vidro e com borracha esponjosa nas laterais; à direita, tampa da caixa interna composta por uma caixa de som e duas fitas de LED de 20cm. B) Câmara acústica completa: mais abaixo na imagem, as duas caixas separadas por uma camada de lã de vidro, e mais acima a tampa da caixa interna apoiada na tampa da caixa externa. C) Foto tirada de dentro da câmara acústica em funcionamento.

Foi utilizado um amplificador estéreo (Behringer, modelo micro AMP HA 400) com quatro canais, para a recepção e a distribuição do som para as câmaras acústicas. Este foi ligado ao laptop por um cabo P2/P10. O som reproduzido no laptop foi enviado

para o amplificador e deste foi distribuído simultaneamente para as caixas de som dentro das câmaras acústicas.

Foram feitas leituras da intensidade máxima e mínima do som e calculada a média desses valores para cada uma das 10 câmaras acústicas, obtendo-se intensidade média máxima de 92,01 dB e mínima de 65,55 dB dentro das câmaras acústicas. Para isso foi utilizado um decibelímetro digital (ICEL, modelo DL-4200), responsivo a intensidades de som entre 30 e 130 dB.

2.1.2. Fonte de luz

Nas tampas das caixas internas foram instalados dois fragmentos de fitas de LED (Starlux, tipo SMD 3528) de luz branca-fria, com potência 22,5 W e temperatura de cor 6.000 K, de 20 cm e contendo 12 LEDs cada um. Os fragmentos das fitas de LED foram soldados a cabos elétricos de 0,5 mm, com 2 m de comprimento cada, que foram passados através dos orifícios nas tampas das caixas internas e nas laterais das caixas externas, surgindo externamente nas caixas acústicas. Esses cabos elétricos foram então ligados em paralelo, com um cabo de 1,5 mm, a um driver para LED de 30 W, conectado à fonte de eletricidade. As duas fitas de 20 cm foram instaladas nas tampas das caixas internas das câmaras, distando lateralmente 8 cm da caixa de som (Figura 2).

A radiação dentro das câmaras acústicas foi medida com um radiômetro (Li-Cor modelo Li-185B), obtendo-se irradiância média de 3,5 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

2.2. Gravação do som

O som utilizado nos experimentos para testar a eficiência das câmaras acústicas foi gravado no *campus* da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, no interior de um fragmento de Floresta Estacional Semidecídua conhecido como Reserva da Biologia da UFV. A gravação foi realizada em outubro de 2011, época de reprodução das cigarras (Insecta, Cicadidae) em Viçosa, obtendo-se nas gravações os sons característicos daquela mata com predominância absoluta do som emitido pelas cigarras. A gravação foi feita com um microfone condensador (Shure, modelo Ksm44 SL) localizado a 1,6m do chão, na figura polar Omni direcional, numa placa de áudio externa (M-Audio Fast Track Pro), com taxas de 24 bits e 48 Khz, utilizando o *software* Soundforge. Foram obtidos 18 min e 39 s de gravação contínua, onde o som emitido pela espécie de cigarra *Quesada gigas* (Oliver) foi responsável pelo “tom do som” (frequência fundamental), com uma frequência contínua de alta intensidade localizada entre 1.015 e 1.210 Hz. O som desta espécie teve uma intensidade sonora com ordem de grandeza 16 vezes maior que o segundo som mais intenso na gravação, o da espécie de

cigarra *Fidicina mannifera* (Fabricius), que emitiu um único sinal de 16 s ao longo de toda a gravação.

2.3. Testes experimentais nas câmaras acústicas

O experimento foi realizado com plantas de *Impatiens walleriana* Hook. F. (Balsaminaceae). Essas são plantas originárias do Leste da África tropical, da Tanzânia a Moçambique, herbáceas, anuais, atingindo de 25 a 60 cm de altura, ocupando ambientes sombreados ou com pouca luz. Apresentam folhas lanceoladas de 3 a 12 cm por 2-5 cm de largura e flores de 2-5 cm de diâmetro, com 5 pétalas (Mandle *et al.* 2010). A escolha dessa espécie de plantas para a realização dos experimentos baseou-se em: (i) em seu pequeno porte (herbáceo), necessário para logística de inserção dos indivíduos nas câmaras acústicas; (ii) por ser uma planta de sombra que se adequa bem à condição de luminosidade artificial das salas de crescimento e das câmaras acústicas; (iii) por terem folhas finas, que podem ser mais sensíveis ao efeito das vibrações sonoras, e de tamanho adequado para medição de trocas gasosas utilizando o IRGA; e (iv) por germinarem, se desenvolverem e reproduzirem principalmente durante a primavera, época em que as cigarras estão “cantando” em Viçosa (MG).

Sementes de *I. walleriana*, provenientes de populações naturais, foram coletadas no Horto Botânico e no Setor de Jardinagem da UFV, e secas em sala de crescimento à 25°C. As sementes foram semeadas em 30 vasos de 1L cada, contendo uma mistura 1:1 de solo (horizonte B) e substrato para plantas tropstrato®. Foram depositadas 8 sementes por vaso e 28 dias após o plantio procedeu-se o desbaste, deixando-se uma planta por vaso. As plantas foram mantidas sob sombrite durante 65 dias após a germinação, quando foram transferidas para a sala de crescimento, onde foram mantidas a 25°C, sob fotoperíodo de 12h de luz, fornecido por 8 lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia, de 40 W cada. Para incrementar o oferecimento de luz na faixa de comprimento de onda do vermelho, foram posicionadas 3 tiras de acrílico vermelho de dimensões de 100 x 10 x 0,2 cm sob a lâmpadas, que estavam suspensas, presas em uma estrutura de madeira. Esse sistema de iluminação forneceu irradiância média de 80 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para as plantas, que foram regadas com 150 ml de água a cada três dias.

Dez indivíduos de *I. walleriana* aclimatados por 17 dias na sala de crescimento e, portanto, com 82 dias de idade foram selecionados para a realização de um experimento utilizando as emissões sonoras das cigarras, gravadas como mencionado acima. Antes de as plantas serem submetidas aos tratamentos, foram coletados dados de cinco plantas de *I. walleriana* objetivando verificar a intensidade luminosa ideal a ser

empregada durante o experimento e o tempo de estabilização da taxa fotossintética das plantas. As taxas fotossintéticas das plantas destinadas aos dois tratamentos também foram medidas, com o intuito de verificar possíveis diferenças na fisiologia das plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas no padrão fotossintético das plantas destinadas a ambos os tratamentos ($F=0.0427$; $p=0.8415$).

As dez plantas foram divididas em dois grupos e submetidas a dois tratamentos, com cinco repetições cada: Tratamento Som das Cigarras (TSC) e Tratamento controle, Sem exposição ao Som (TSS). Durante o tempo experimental, as plantas foram mantidas na sala de crescimento durante todo o dia, exceto nos períodos em que foram submetidas aos tratamentos, quando foram então transferidas para dentro das câmaras acústicas.

As plantas foram inseridas nas câmaras, estas foram fechadas e o som foi ligado somente nas câmaras contendo plantas do TSC (Figura 3). Enquanto nas câmaras contendo plantas do TSS, no qual as plantas não foram expostas ao som, as caixas de som foram ligadas, contudo sem reprodução sonora. Ao final da exposição, as caixas de som foram desligadas e as plantas foram conduzidas novamente para a sala de crescimento. As plantas foram expostas aos tratamentos por duas horas diariamente, 1h durante a manhã (9:00 às 10:00h) e 1h durante a tarde (16:00 às 17:00h), durante 10 dias consecutivos. A ordem de inserção e de retirada das plantas das câmaras foi feita de maneira aleatória em cada período de exposição ao som. As plantas foram revezadas entre as câmaras durante o experimento, ou seja, de um dia para o outro cada planta foi modificada de câmara acústica, mantendo seu respectivo tratamento (com ou sem som). Dessa forma, cada planta passou por todas as câmaras acústicas e permaneceu o mesmo tempo, de 2h, em cada uma.

Foram avaliadas a Taxa Fotossintética (A), a Condutância Estomática (g_s), a Relação Carbono interno/Carbono externo (C_i/C_a) e a Taxa de Transpiração (E), empregando-se um Analisador de Gás no Infra-Vermelho (IRGA) (ADC BioScientific, modelo LC-pro SD) acoplado a uma de câmara foliar de $6,25 \text{ cm}^2$, dotada de sistema de iluminação e refrigeração. O ar de referência do IRGA foi captado e direcionado para um vasilhame homogeneizador de 20L (*buffer*), antes de alcançar a câmara foliar, a fim de evitar grandes oscilações no CO_2 de referência. Os dados referentes às avaliações de trocas gasosas foram coletados no período da manhã, após a primeira exposição ao som. Foram feitas quatro avaliações, no primeiro, quarto, oitavo e décimo dias de experimento nas plantas dos dois tratamentos, em uma folha íntegra por planta, sem

danos físicos ou sinais de herbivoria, localizada nos oito últimos nós do ramo principal. As quatro medições, ao longo do tempo, foram feitas na mesma folha de cada planta. Foi empregada radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de $600 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura da câmara foliar de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ para as análises, sendo estipulado um tempo de 2min para estabilização, após o qual foram feitas cinco leitura no IRGA, a cada 10s. Foi utilizada a média dos cinco registros de cada planta na análise estatística.



Figura 3: Planta no interior da câmara acústica. As plantas foram inseridas nas câmaras e as tampas das caixas interna e externa foram fechadas para exposição aos Tratamentos Sem exposição ao Som (TSS) e Tratamento Som das Cigarras (TSC).

2.4. Análise estatística

Para avaliar os efeitos dos tratamentos nas trocas gasosas das plantas, e portanto a eficiência das câmaras acústicas, foram realizadas análises de variância (ANOVA) utilizando as medições de trocas gasosas registradas nos quatro dias, gerando ao todo 20 medidas por tratamento para cada variável analisada. As variáveis resposta avaliadas foram a taxa fotossintética, a relação Carbono interno/Carbono externo (Ci/Ca), a condutância estomática e a taxa de transpiração. Todas as análises foram feitas adotando-se Modelos Lineares Generalizados (GLM), com distribuição de erros tipo Normal, utilizando-se o *software R* (R Development Core Team, 2007).

3. Resultados

Foram registrados aumentos estatisticamente significativos nas taxas fotossintéticas ($F=10.262$; $p=0.002748^{**}$), acompanhados por decréscimos também estatisticamente significativos na relação Ci/Ca ($F=15.034$; $p=0.0004056^{***}$) das plantas do TSC em comparação ao TSS. Não houve alterações significativas na

condutância estomática ($F=0.2423$; $p=0.6254$), nem na taxa de transpiração ($F=1.0403$; $p=0.3142$), (Figura 4).

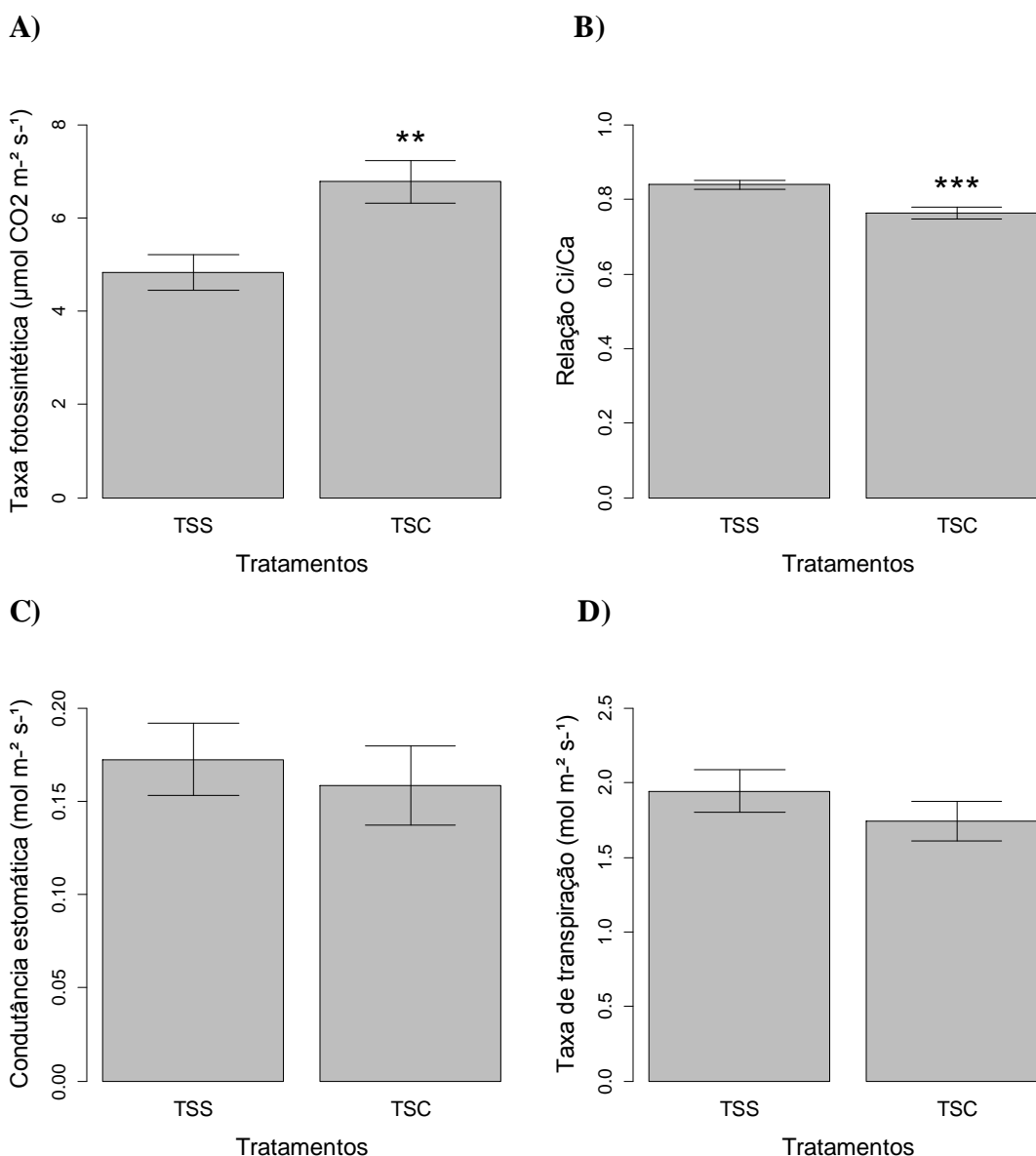


Figura 4: Média (\pm Erro Padrão) da: (A) Taxa Fotossintética ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), (B) Relação Carbono interno/Carbono externo (Ci/Ca), (C) Condutância Estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e (D) Taxa de Transpiração ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em função dos Tratamentos Sem exposição ao Som (TSS) e Tratamento Som das Cigarras (TSC). Valores de significância: **= $P < 0,01$ e ***= $P < 0,001$. Foram feitas quatro medições de trocas gasosas ao longo do tempo, em cada planta, com o Analisador de Gás no Infravermelho (IRGA), (ADC BioScientific, modelo LC-pro SD).

4. Discussão

O sistema proposto para estudar o efeito do som em plantas se mostrou eficaz. Houve modificações significativas nas trocas gasosas nas plantas sob o Tratamento Som das Cigarras (TSC) quando comparadas com aquelas sob o tratamento Sem exposição

ao Som (TSS). Os dados mostram que o ambiente sonoro criado dentro das câmaras acústicas é apropriado para estudos objetivando avaliar as respostas das plantas, fisiológicas e/ou morfológicas e comportamentais, a sons.

Experimentos avaliando efeitos de sons em plantas envolvem uma série de dificuldades. A primeira se relaciona com a característica física do som, uma vez que a vibração sonora se propaga pelo ar rapidamente, atingindo longas distâncias. Dessa forma é necessário algum tipo de isolamento acústico para evitar possíveis contaminações sonoras entre tratamentos. Para tanto, este trabalho propõem a utilização de câmaras acústicas construídas com madeira compensada e lã de vidro.

A madeira compensada apresenta a capacidade de refletir sons, especialmente na faixa de frequências médias e agudas (Yang *et al.* 2003), onde se localiza predominantemente as frequências produzidas pelo som das cigarras, proporcionando a reflexão do som dentro da câmara acústica e uma possível amplificação sonora. A lã de vidro, por sua vez, é um material de absorção sonora composta por fibras sintéticas minerais arranjadas em um conjunto de filamentos contínuos, que formam poros onde o ar fica preso (Arenas & Crocker 2010). A atenuação do som (dB/m) da lã de vidro é mais eficiente em frequências médias e agudas, correspondente ao som aplicado, sendo um material menos eficiente na absorção sonora de baixas frequências (Tarnow 2002).

Nessa perspectiva, tanto a lã de vidro como a madeira compensada demonstraram-se ser materiais com propriedades acústicas adequadas para o tipo de experimento proposto, uma vez que o som não vazou para fora das caixas e, logo, não houve contaminação sonora do tratamento controle pelo som reproduzido nas câmaras contendo plantas do tratamento com som das cigarras. Contudo durante a abertura e fechamento das caixas, a lã de vidro era ligeiramente friccionada, soltando um pó inerte que atingia as plantas; esse estresse ocorreu para ambos os tratamentos. Outros tipos de materiais isolantes acústicos podem ser empregados nas câmaras (Arenas & Crocker 2010). É indicado, porém, que antes da construção das mesmas sejam verificadas as características de absorção sonora mais adequadas para o tipo de som empregado no experimento.

A segunda dificuldade experimental se relaciona com o fechamento total do ambiente isolado, com reduzida saída ou entrada de ar. Essa condição gera uma concentração de gases no meio interno das câmaras que pode prejudicar o metabolismo vegetal. Assim sendo, as plantas não podem permanecer durante todo o dia ou por muito tempo no interior das câmaras acústicas. Uma possibilidade alternativa é a utilização de ambientes maiores, como salas isoladas acusticamente, contudo essa estrutura além de

ser muito cara, exibe uma dificuldade logística, uma vez que seriam necessárias várias salas próximas, todas isoladas acusticamente.

A pseudoreplicação espacial entre as unidades experimentais é mais uma dificuldade a ser enfrentada. Esse problema é neutralizado com o revezamento das plantas entre as câmaras, com cada uma delas passando por todas as câmaras e permanecendo o mesmo tempo em cada uma delas. Desta maneira anula-se o efeito das câmaras acústicas sobre as plantas e conseqüentemente, sobre possíveis vieses nos dados coletados.

Em relação à fonte sonora, um fator a se ressaltar é a alimentação elétrica das caixas de som. As caixas de som das câmaras contendo plantas do tratamento controle devem permanecer ligadas na energia elétrica, uma vez que organismos vegetais respondem a campos eletromagnéticos, como o produzido pela passagem de eletricidade (Galland & Pazur 2005). Dessa forma, se as fontes sonoras do tratamento controle não forem ligadas, não podemos afirmar que diferenças registradas entre plantas expostas ao som e ao tratamento controle foram devido ao som ou ao campo eletromagnético.

As caixas de som empregadas nas câmaras possuíam autofalantes pequenos, reproduzindo somente frequências a partir de 100 Hz. Essa escolha baseou-se nas frequências do som das cigarras que não alcançam valores abaixo de 100 Hz. Para experimentos que avaliem frequências mais graves, é indicada a utilização de caixas de som com autofalantes maiores que reproduzam frequências baixas. Importante ressaltar que o volume do som foi distribuído de forma uniforme entre as estruturas que controlavam a intensidade sonora, para não danificar o amplificador das caixas de som e gerar falhas experimentais. Assim, o volume do laptop, do amplificador e das caixas de som foram controlados entre 50 e 70% da capacidade de cada um.

A instalação luminosa das caixas teve como principal objetivo manter o fotoperíodo das plantas, evitando assim possíveis respostas vegetais indesejadas devido à exposição ao escuro. Foram empregadas lâmpadas de LED's frias, pois as câmaras permanecem totalmente fechadas e, além disso, o ambiente interno das câmaras não era apenas isolado acusticamente, mas também termicamente, uma vez que a lâ de vidro também é um isolante térmico.

O tamanho das câmaras também deve ser adaptado à planta estudada. Plantas de *Impatiens walleriana* utilizadas no experimento possuem pequeno porte, cabendo dentro das câmaras sem que seus ramos precisassem ser dobrados ou torcidos, o que pode gerar algum tipo de estresse.

Os estudos nessa área de pesquisas se concentram na compreensão dos efeitos sonoros na germinação e desenvolvimento inicial (Uchida & Yamamoto 2002; Bochu *et al.* 2003; Petraglia 2008), em plantas adultas (Jeong *et al.* 2007; Bai *et al.* 2010; Meng *et al.* 2012; Gagliano *et al.* 2012; Cypriano *et al.* dados não publicados) e em cultura de tecidos vegetais (Yi *et al.* 2003; Bochu *et al.* 2004; Hongbo *et al.* 2008; Li *et al.* 2008). A estrutura proposta mostrou-se eficaz na condução de experimentos com plantas adultas, contudo as câmaras também podem ser utilizadas em pesquisas em cultura de tecidos e em germinação de sementes. Adequações dessa estrutura podem permitir a obtenção de dados de variáveis fisiológicas durante o tempo de aplicação do som.

Em suma, as câmaras acústicas propostas neste trabalho para a condução de experimentos em condições semi-controladas podem ser importantes tanto na unificação metodológica dos estudos envolvendo o efeito do som em plantas, quanto na expansão de trabalhos nesta área, auxiliando na compreensão de um fenômeno ainda pouco estudado no meio científico.

5. Referências

- Bai, M., Jiang, S., Li, N., Hong, L. & Hong, W. (2010). Effects of insect acoustic and music acoustic frequency on the growth of 6 kinds of vegetables. *Agricultural Science & Technology*, 11, 90–93.
- Bailey, N.W., Fowler-Finn, K.D., Rebar, D. & Rodriguez, R.L. (2013). Green symphonies or wind in the willows? Testing acoustic communication in plants. *Behavioral Ecology*, Invited Commentary, 1–2.
- Bochu, W., Jiping, S., Biao, L., Jie, L. & Chuanren, D. (2004). Soundwave stimulation triggers the content change of the endogenous hormone of the *Chrysanthemum* mature callus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 37, 107–112.
- Chehab, E.W., Eich, E. & Braam, J. (2009). Thigmomorphogenesis : a complex plant response to mechano-stimulation. *Journal of Experimental Botany*, 60, 43–56.
- Cypriano, R.J., Kuki, K.N., Godoy, A.G., Duque-Brasil, R. & Sperber, C. F. Efeito do som na atividade fotossintética de *Solanum lycopersicum* L. (dados não publicados).
- Gagliano, M. (2012). Green symphonies: a call for studies on acoustic communication in plants. *Behavioral Ecology*, 1–7.

- Gagliano, M., Mancuso, S. & Robert, D. (2012). Towards understanding plant bioacoustics. *Trends in Plant Science*, 17, 323–325.
- Gagliano, M. (2013). The flowering of plant bioacoustics: how and why. *Behavioral Ecology*, Invited Commentary, 1–2.
- Hongbo, S., Biao, L., Bochu, W., Kun, T. & Yilong, L. (2008). A study on differentially expressed gene screening of *Chrysanthemum* plants under sound stress. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 329–333.
- Jaffe, M.J. (1973). Thigmomorphogenesis: The response of plant growth and development to mechanical stimulation. *Planta*, 114, 143–157.
- Jeong, M. J., Shim, C. K., Lee, J. O., Kwon, H. B., Kim, Y. H., Lee, S. K., *et al.* (2007). Plant gene responses to frequency-specific sound signals. *Molecular Breeding*, 21, 217–226.
- Karban, R. (2008). Plant behaviour and communication. *Ecology Letters*, 11, 727–739.
- Li, B., Wei, J., Wei, X., Tang, K., Liang, Y., Shu, K., *et al.* (2008). Effect of sound wave stress on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of *Dendrobium candidum*. *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces*, 63, 269–275.
- Meng, Q., Zhou, Q., Zheng, S. & Gao, Y. (2012). Responses on Photosynthesis and Variable Chlorophyll Fluorescence of *Fragaria ananassa* under Sound Wave. *Energy Procedia*, 16, 346–352.
- Petraglia, M.S. (2008). *Estudo sobre a ação de vibrações acústicas e música em organismos vegetais*. Dissertação de Mestrado (Biologia Geral e Aplicada), Unesp, Botucatu.
- R Development Core Team (2007). R: A language and environment for statistical computing. www.r-project.org.
- Tarnow, V. (2002) Measured anisotropic air flow resistivity and sound attenuation of glass wool. *The Journal of Acoustical Society of America* 111 (6): 2735-2739.
- Telewski, F.W. (2006). A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *American Journal of Botany*, 93, 1466–1476.

- ten Cate, C. (2012). Acoustic communication in plants: do the woods really sing? *Behavioral Ecology*, Invited Commentary, 1-2.
- Trewavas, A. (2005). Green plants as intelligent organisms. *Trends in Plant Science*, 10, 413–419.
- Uchida, A. & Yamamoto, K.T. (2002). Effects of mechanical vibration on seed germination of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant & Cell Physiology*, 43, 647–651.
- Yang, H. S., Kim, D. J. & Kim, H. J. (2003). Rice straw-wood particle composite for sound absorbing wooden construction materials. *Bioresource Technology*, 86, 117–121.
- Yi, J., Bochu, W., Xiujuan, W., Chuanren, D. & Xiaocheng, Y. (2003). Effect of sound stimulation on roots growth and plasmalemma H⁺ATPase activity of chrysanthemum (*Gerbera jamesonii*). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 27, 65–69.

CAPÍTULO 2

Plantas reconhecem sons produzidos por insetos

1. Introdução

Plantas são influenciadas por diversos fatores ambientais, sendo sensíveis a forças intensas até distúrbios muito sutis. Estes organismos desenvolveram, ao longo do tempo evolutivo, mecanismos eficazes na detecção do ambiente a sua volta, respondendo de forma específica a diferentes estímulos bióticos e abióticos. Plantas exibem uma acurada percepção e resposta aos sinais ambientais disponíveis (Trewavas 2005; Brenner *et al.* 2007; Karban 2008). As plantas respondem à gravidade (Morita 2010), a variações na quantidade e na qualidade luminosa (Smith 2000; Goyal *et al.* 2013), bem como ao vento, ao contato mecânico (Braam 2005; Chelab *et al.* 2009) e a campos eletromagnéticos (Galland & Pazur 2005). Além disso, modificam seu metabolismo em resposta ao ataque de herbívoros e parasitas, disparando mecanismos de defesa (Mello & Silva-filho 2002) e atraem polinizadores e dispersores através de sinais químicos e visuais (Bronstein *et al.* 2006).

O som, um tipo de onda mecânica longitudinal, pode ser mais um estímulo ambiental influenciando o desenvolvimento de organismos vegetais (Telewski 2006; Jeong *et al.* 2007; Gagliano *et al.* 2012). O som é um fenômeno físico que carrega em suas ondas informações biológicas sobre a identidade, o comportamento e a fisiologia do organismo produtor da mensagem acústica. Essas vibrações são produzidas de maneira rápida e com baixo gasto energético pelo emissor e sua detecção e tradução como informação por organismos receptores também ocorre de maneira instantânea. Desta forma, sinais acústicos se constituem num mecanismo efetivo de comunicação entre organismos vivos, transmitindo informação em tempo real (Greenfield 2002; Gagliano 2012).

As vibrações sonoras podem promover alterações em diversas escalas da organização vegetal, incluindo modificações na germinação (Uchida & Yamamoto 2002); no desenvolvimento inicial (Bochu *et al.* 2003); na fisiologia, atuando sobre a síntese de hormônios (Bochu *et al.* 2004), a fluidez de membrana (Zhao *et al.* 2002a; Zhao *et al.* 2002b), a divisão celular (Xiujuan *et al.* 2003a), no conteúdo de proteínas e enzimas (Yi *et al.* 2003; Li *et al.* 2008), bem como na fotossíntese (Meng *et al.* 2012; Cypriano *et al.* dados não publicados). Além disso, as ondas sonoras podem ocasionar

alterações a nível molecular, interferindo na expressão gênica (Xiujuan *et al.* 2003b; Jeong *et al.* 2007; Hongbo *et al.* 2008).

Gagliano (2012) propõe que plantas podem ter desenvolvido a sensibilidade ao som durante a evolução, como um modo de perceber o ambiente biótico e abiótico que as rodeia. Evidências que corroboram essa hipótese são as interações inseto-planta. Insetos são grandes emissores de mensagens acústicas, sendo intimamente relacionados com plantas, com as quais co-evoluem há milhões de anos, estabelecendo tanto relações mutualistas como antagonistas. As interações entre insetos e plantas são altamente dependentes dos sinais emitidos por ambos os grupos, sendo que os principais mediadores dessa comunicação são substâncias químicas e sinais visuais (Mello, 2002; Bronstein, 2006; Karban 2008; Schaefer *et al.*, 2004). Contudo, a função dos sons também como elementos de integração entre insetos e plantas nas comunidades é desconhecida.

Um indício da resposta das plantas aos sons emitidos por insetos ocorre no processo de polinização por vibração. Nessa interação planta-polinizador, encontrada em mais de 20.000 espécies de plantas, sons produzidos em frequências e intensidades específicas por abelhas polinizadoras estimulam a liberação de pólen por anteras poricidas (Buchmann & Hurley 1978; Silva *et al.* 2010; De Luca & Vallejo-Marín 2013).

É importante ressaltar que o surgimento das primeiras estruturas produtoras de sons em insetos estão associadas ao período Triássico (Otte 1992; Plotnick & Smith 2012), em torno de 100 milhões de anos antes do surgimento das Angiospermas, no Cretáceo (Taylor *et al.* 2009). Desta forma, quando as angiospermas começaram a se diversificar e a coevoluir com insetos, estes já emitiam sons para comunicação.

Nesse contexto, este trabalho tem por objetivo testar se sons produzidos por insetos podem ser utilizados pelas plantas como informações acessórias para detectar condições e recursos ambientais, estimulando respostas fisiológicas sincronizadas.

2. Material e Métodos

2.1. Gravação e análise do som

O som utilizado nos experimentos foi gravado no *campus* da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, no interior de um fragmento de Floresta Estacional Semidecídua conhecido como Reserva da Biologia da UFV. A gravação foi realizada em outubro de 2011, época de reprodução das cigarras (Insecta, Cicadidae), num final da tarde, quando ocorre emissão sonora máxima por esses insetos em Viçosa. Obteve-

se, assim, os sons característicos daquela mata, com predominância absoluta do som emitido pelas cigarras. A gravação foi feita com um microfone condensador (Shure, modelo Ksm44 SL) localizado a 1,6m do chão, na figura polar Omni direcional, numa placa de áudio externa (M-Audio Fast Track Pro), com taxas de 24 bits e 48 KHz, utilizando o *software* Soundforge. Foram obtidos 18 min e 39 s de gravação contínua.

Todos os sons emitidos por animais foram discriminados quanto à banda de frequência (frequência máxima e mínima) e quanto a seus aspectos temporais, na gravação. Foi verificada a intensidade do som de cada espécie, avaliando-se a intensidade de uma única nota do som produzido por ela, em trechos da gravação onde o sinal foi mais intenso (Anexo 1). As análises foram feitas com o *software* SongScope v.4.1.3A. O som emitido pela espécie de cigarra *Quesada gigas* (Oliver) foi responsável pelo “tom do som” (frequência fundamental), com uma frequência contínua de alta intensidade localizada entre 1.015 e 1.210 Hz. Este som teve uma intensidade sonora com uma ordem de grandeza 16 vezes maior que o segundo som mais intenso da gravação, o da espécie *Fidicina mannifera* (Fabricius), que emitiu um único sinal de 16 s, ao longo de toda a gravação (Anexo 2). Também foram realizadas coletas desses insetos para a confirmação das suas identidades sonoras e específicas. Foram coletadas e identificadas 3 espécies: *Quesada gigas*, *Fidicina mannifera* e *Dorisiana viridis* (Oliver), contudo apenas o comportamento acústico das duas primeiras foram reconhecidas na gravação, tendo por base os trabalhos de Cocroft & Pogue (1996) e Maccagnam (2008).

O som gravado foi denominado “Som das Cigarras Organizado”. Essa gravação original foi fragmentada, ou seja, pequenas partes da gravação foram recortadas e coladas aleatoriamente em outras posições. Esse processo foi feito diversas vezes, desorganizando ao máximo o padrão sonoro encontrado na natureza. Esse novo som, denominado “Som das Cigarras Misturado”, foi composto pelas mesmas frequências, contudo a sequência temporal dos sons presentes na gravação e as variações naturais de intensidade, que determinam o ritmo sonoro, foram desorganizadas, alterando possíveis informações transmitidas pelo som. Os Anexo 2 Anexo 3 mostram o oscilograma (intensidade x tempo) e o sonograma (frequência x tempo) do Som das Cigarras Organizado e do Som das Cigarras Misturado.

2.2. Câmaras acústicas com isolamento sonoro

Os materiais empregados na construção e a estrutura das câmaras acústicas utilizadas no presente trabalho estão descritos nas páginas 13, 14, 15 e 16, no capítulo 1.

2.3. Germinação e Desenvolvimento Inicial de *I. walleriana*

O experimento foi realizado com plantas de *Impatiens walleriana* Hook. F. (Balsaminaceae). Essas são plantas originárias do Leste da África tropical, da Tanzânia a Moçambique, herbáceas, anuais, atingindo de 25 a 60 cm de altura, ocupando ambientes sombreados ou com pouca luz. Apresentam folhas lanceoladas de 3 a 12 cm por 2-5 cm de largura e flores de 2-5 cm de diâmetro, com cinco pétalas (Mandle *et al.* 2010). A escolha dessa espécie de plantas para a realização dos experimentos baseou-se: (i) em seu pequeno porte (herbáceo), necessário para logística de inserção dos indivíduos nas câmaras acústicas; (ii) por ser uma planta de sombra que se comportaria bem na condição de luminosidade artificial das salas de crescimento e das câmaras acústicas; (iii) por terem folhas finas, que poderiam ser mais sensíveis ao efeito das vibrações sonoras, e de tamanho adequado para medição de trocas gasosas; e (iv) por germinarem, se desenvolverem e reproduzirem principalmente durante a primavera, época em que as cigarras estão “cantando” em Viçosa (MG).

Sementes de *I. walleriana* foram coletadas no Horto Botânico e no Setor de Jardinagem da UFV e secas em sala de crescimento à 25°C. As sementes foram semeadas em gerbox contendo areia lavada, coberta por papel de filtro. No papel de filtro foram feitas pequenas aberturas circulares, onde foram depositadas as sementes no total de quatro por gerbox. Ao todo foram utilizados 48 gerbox, 24 constituindo o Tratamento Som das Cigarras (TSC) e os outros 24, o Tratamento controle, Sem exposição ao Som (TSS).

Foram utilizadas oito câmaras acústicas: quatro contendo o TSS e quatro, o TSC. Foram colocados seis gerbox em cada câmara acústica e cada um deles constituiu uma unidade experimental. O fotoperíodo dentro das caixas foi fixado em 12h, obtendo-se temperatura média máxima de 26,02 °C e mínima de 21,1 °C, enquanto a UR média do ar foi de 73,76 %, medidas com um termo-higrômetro digital (TFA, modelo 7429.02.0.00).

As unidades experimentais permaneceram dentro das câmaras acústicas durante todo o tempo experimental e por isso as tampas das caixas externas foram mantidas abertas e as tampas das caixas internas apoiadas sobre tiras de madeira de 52 x 2 cm, para permitir a renovação do ar dentro das câmaras. Somente durante a exposição ao som ambas as tampas das caixas permaneceram fechadas, nos dois tratamentos. As

sementes e plântulas do TSC foram expostas ao som duas vezes ao dia, 1h na parte da manhã (entre 9:00 e 10:00h) e 1h na parte da tarde (entre 16:00 e 17:00h). Durante esses períodos, as caixas de som das câmaras acústicas contendo os tratamentos controle, sem exposição ao som, foram mantidas ligadas, porém sem reprodução de som.

Os gerbox foram sistematicamente trocados entre as câmaras acústicas de dois em dois dias, de forma que todas as unidades experimentais passaram por todas as câmaras, ficando o mesmo tempo de 48h em cada uma delas.

Durante o tempo experimental de 16 dias, foram avaliados a germinação total, o tempo, a taxa e a uniformidade de germinação (Ranal & Santana 2006). As avaliações de germinação foram realizadas diariamente, após o segundo dia de exposição ao som e as sementes com radícula maior ou igual a 2 mm foram consideradas germinadas (Brasil, 2009). Além da germinação, também foram mensurados o desenvolvimento do epicótilo e do hipocótilo das plantas, utilizando-se papel milimetrado, e foram pesadas suas massas frescas e secas, em balança analítica (Quimis, Q-500L210C) com precisão de quatro casas decimais. As massas secas das plantas foram obtidas após secagem por 144 horas em estufa de secagem (Quimis, modelo Q-317 M52) a 75 °C.

2.4. Trocas gasosas

Sementes de *I. walleriana* foram semeadas em 30 vasos de 1L cada, contendo uma mistura 1:1 de solo (horizonte B) e substrato para plantas tropstrato®. Foram depositadas 8 sementes por vaso e 28 dias após o plantio procedeu-se o desbaste, deixando-se uma planta por vaso. As plantas foram mantidas sob sombrite durante 65 dias após a germinação, quando foram transferidas para a sala de crescimento, onde foram mantidas a 25°C, sob fotoperíodo de 12h de luz, fornecido por 8 lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia, de 40 W cada. Para incrementar o oferecimento de luz na faixa de comprimento de onda do vermelho, foram posicionadas 3 tiras de acrílico vermelho de dimensões de 100 x 10 x 0,2 cm sob a lâmpadas, que estavam suspensas, presas em uma estrutura de madeira. Esse sistema de iluminação forneceu irradiância média de $80\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para as plantas, que foram regadas com 150ml de água a cada três dias.

Antes de as plantas serem submetidas aos tratamentos, foi feita uma curve de luz com dados de fotossíntese coletados de cinco plantas de *I. walleriana*, objetivando verificar a intensidade luminosa ideal a ser empregada durante o experimento e o tempo de estabilização da taxa fotossintética das plantas (Figura 5). As taxas fotossintéticas das plantas destinadas aos dois tratamentos também foram medidas, com o intuito de

verificar possíveis diferenças na fisiologia das plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas no padrão fotossintético das plantas destinadas a ambos os tratamentos ($F=0.0427$; $p=0.8415$).

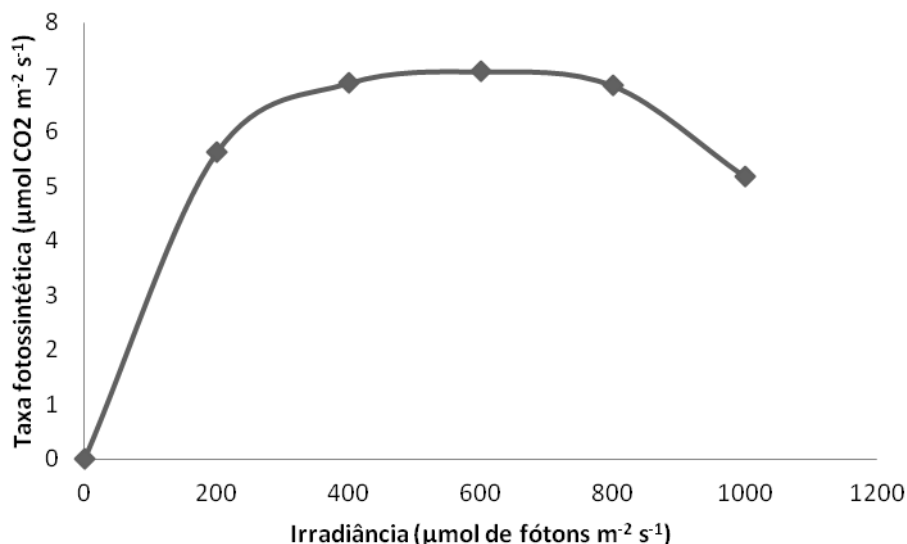


Figura 5: Curva de luz das plantas de *Impatiens walleriana*. Medição da taxa fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em função da radiação fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). A coleta dos dados foi realizada com o Analisador de Gás no Infra-Vermelho (IRGA), (ADC BioScientific, modelo LC-pro SD), em cinco plantas de *I. walleriana*.

Foram realizados dois experimentos. No primeiro deles foram utilizados dez indivíduos de *I. walleriana* aclimatados por 17 dias na sala de crescimento e, portanto, com 82 dias de idade. As plantas foram expostas a dois tratamentos com cinco repetições cada, denominados Tratamento Som das Cigarras (TSC) e Tratamento controle, Sem exposição ao Som (TSS). Durante o tempo experimental as plantas foram mantidas na sala de crescimento, sendo transferidas para dentro das câmaras acústicas nos períodos em que foram submetidas aos tratamentos e depois, retornadas.

Os tratamentos foram constituídos por duas horas diárias de exposição ao som, 1h durante a manhã (9:00 às 10:00h) e 1h durante a tarde (16:00 às 17:00h), durante 10 dias consecutivos. Durante esse tempo, as plantas foram transferidas para as câmaras acústicas, estas foram fechadas e o som foi ligado somente naquelas contendo plantas do TSC (Figura 3), enquanto nas câmaras do TSS, no qual as plantas não foram expostas ao som, as caixas de som foram ligadas, porém sem que houvesse reprodução sonora. As plantas foram revezadas entre as câmaras durante o experimento, de forma

que cada uma delas permaneceu o mesmo tempo, de 2h, em cada uma das câmaras acústicas durante a condução do experimento.

Foram avaliadas a Taxa Fotossintética (A), a Condutância Estomática (g_s), a Relação Carbono interno/Carbono externo (Ci/Ca) e a Taxa de Transpiração (E), empregando-se um Analisador de Gás no Infra-Vermelho (IRGA) (ADC BioScientific, modelo LC-pro SD) acoplado a uma de câmara foliar de $6,25 \text{ cm}^2$, dotada de sistema de iluminação e refrigeração. O ar de referência do IRGA foi captado e direcionado para um vasilhame homogeneizador de 20L (*buffer*), antes de alcançar a câmara foliar, a fim de evitar grandes oscilações no CO_2 de referência. Os dados referentes às avaliações de trocas gasosas foram coletados no período da manhã, após a primeira exposição ao som. Foram feitas quatro avaliações, no primeiro, quarto, oitavo e décimo dias de experimento nas plantas dos dois tratamentos, em uma folha íntegra por planta, sem danos físicos ou sinais de herbivoria, localizada nos oito últimos nós do ramo principal. As quatro medições, ao longo do tempo, foram feitas na mesma folha de cada planta. Foi empregada radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de $600 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura da câmara foliar de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ para as análises, sendo estipulado um tempo de 2min para estabilização, após o qual foram feitas cinco leituras no IRGA, a cada 10s. Foi utilizada a média dos cinco registros de cada planta na análise estatística.

O segundo experimento foi realizado com plantas aclimatadas por 32 dias na sala de crescimento, portanto, com 97 dias de idade, as quais foram submetidas a dois tratamentos, também com cinco repetições cada. Os tratamentos estabelecidos, os parâmetros avaliados e as coletas dos dados foram executados de forma semelhante ao que foi descrito para o primeiro experimento, com exceção da qualidade do som empregado e dos intervalos de coleta de dados. No tratamento com som foi utilizado o Som Misturado, conforme descrito no item 2.1, denominado Tratamento com Som das Cigarras Misturado (TCSM), mantendo-se o outro tratamento semelhante; e as medições de trocas gasosas foram feitas no primeiro, quarto, sétimo e décimo dias de experimento, que também teve duração de 10 dias.

As taxas fotossintéticas das plantas destinadas a esse experimento também foram medidas e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas no seu padrão fotossintético ($F=0.1933$; $p=0.6718$).

2.5. Análise estatística

Para avaliar o efeito do tratamento sobre parâmetros da germinação das sementes de *I. walleriana* os dados foram submetidos à análises de variância (ANOVA). Foi adotada distribuição Normal de erros para o tempo e a uniformidade germinação, enquanto que para a germinação total foi utilizada distribuição de erros Poisson e taxa de germinação, erros Binomiais. Já para a análise dos efeitos dos tratamentos sobre o desenvolvimento inicial das plantas: tamanho do epicótilo e do hipocótilo, massa fresca e seca, foram adotados distribuição Normal de erros.

Para avaliar as alterações geradas pelos tratamentos no padrão das trocas gasosas das plantas, também foram realizadas ANOVAs, utilizando as medições de trocas gasosas registradas nos quatro dias, gerando ao todo 20 medidas por tratamento para cada variável analisada. As variáveis resposta avaliadas foram a taxa fotossintética, a relação Carbono interno/Carbono externo (Ci/Ca), a condutância estomática e a taxa de transpiração, todas elas realizadas adotando-se distribuição de erros Normal.

Todas as análises foram feitas adotando-se Modelos Lineares Generalizados (GLM), utilizando-se o *software R* (R Development Core Team, 2007).

3. Resultados

3.1. Germinação e Desenvolvimento Inicial

Não foram verificadas diferenças significativas entre TSC e TSS para as variáveis analisadas. De todas as sementes, apenas duas não germinaram, não sendo registradas diferenças estatísticas na germinação (Chi=0.506; p=0.8846). O tempo de germinação (F=0.638; p=0.429), a taxa de germinação (Chi=0.159; p=0.940) e a uniformidade de germinação (F=1.814; p=0.185) também não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos.

Em relação ao desenvolvimento inicial, também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no tamanho do epicótilo (F=0.002; p=0.962) e do hipocótilo (F=0.706; p=0.405), nem na matéria fresca (F=0.259; p=0.613) e matéria seca (F=0.337; p=0.564) entre as plantas sob os diferentes tratamentos.

3.2. Trocas gasosas

Foram encontradas alterações estatisticamente significativas nos dados das trocas gasosas entre as plantas de *I. walleriana* expostas tanto ao som organizado (TSC) quanto ao som misturado (TSCM), quando comparados com aqueles obtidos das plantas sob o tratamento controle (TSS).

Em relação ao TSC, foi registrado aumento significativo da taxa fotossintética ($F=10.262$; $p=0.002748^{**}$), acompanhado por um decréscimo também significativo na relação C_i/C_a ($F=15.034$; $p=0.0004056^{***}$) das plantas, em comparação ao TSS (Figura 6). Não houve alterações significativas na condutância estomática ($F=0.2423$; $p=0.6254$) e nem na taxa de transpiração ($F=1.0403$; $p=0.3142$), como mostrado na Figura 7.

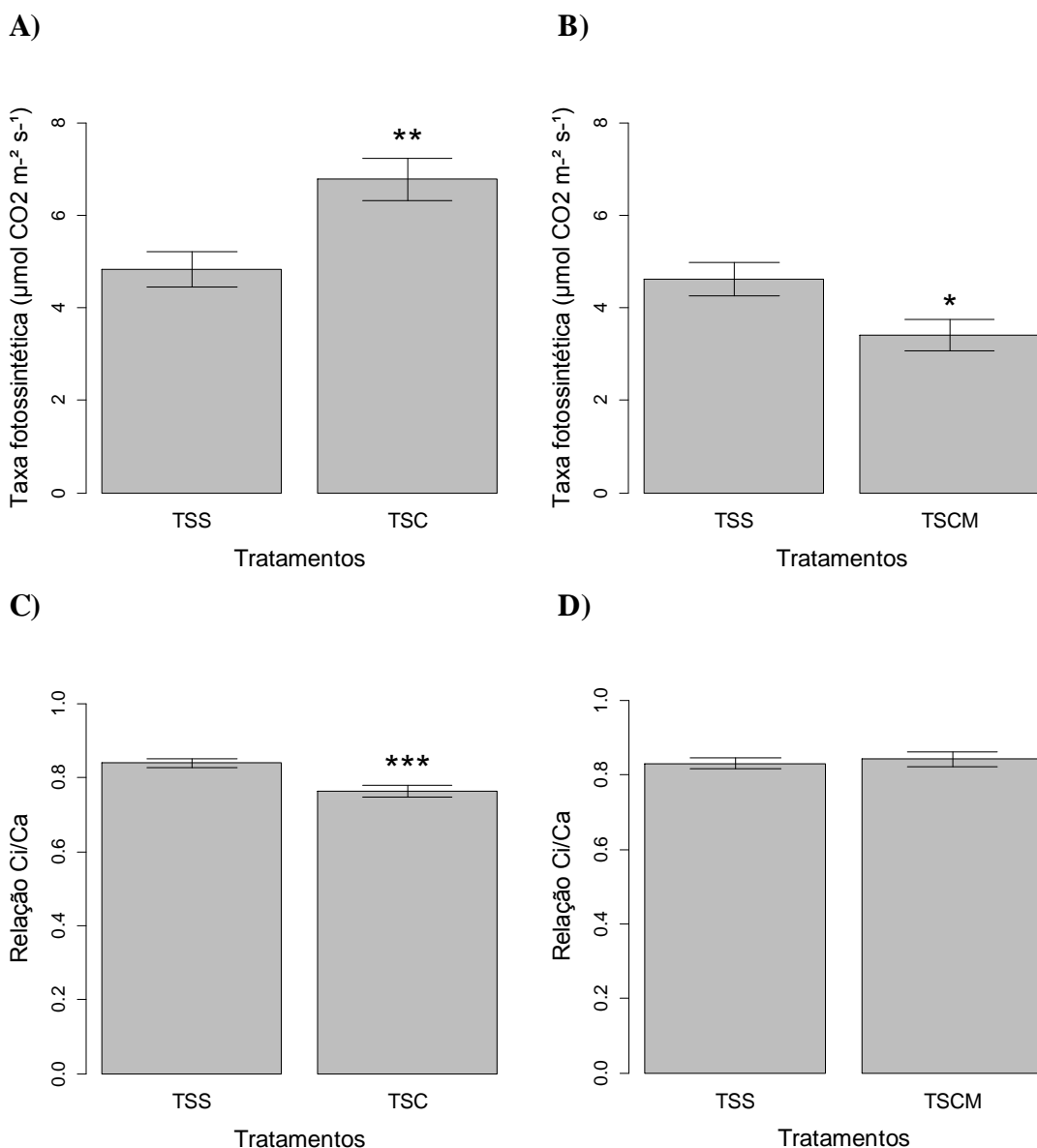


Figura 6: Média (\pm Erro Padrão) da Taxa Fotossintética ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), em A e B, e da Relação Carbono interno/Carbono externo (C_i/C_a), em C e D, em função do Tratamento Sem das Cigarras (TSS) e Tratamento Som das Cigarras (TSC) e Tratamento Som das Cigarras Misturado (TSCM), comparados com o controle, Tratamento Sem exposição ao Som (TSS). Valores de significância: *= $P < 0,05$; **= $P < 0,01$ e ***= $P < 0,001$. Foram feitas quatro medições de trocas gasosas ao longo do tempo, em cada planta, com o Analisador de Gás no Infra-Vermelho (IRGA), (ADC BioScientific, modelo LC-pro SD).

Por outro lado, no TSCM foi observada redução significativa na taxa fotossintética das plantas em relação as plantas controle (TSS) ($F=5.9238$; $p=0.01975^*$). Não foram registradas alterações na relação C_i/C_a ($F=0.2113$; $p=0.6484$), (Figura 6), na condutância estomática ($F=0.5289$; $p=0.4715$) e nem na taxa de transpiração ($F=2.0166$; $p=0.1637$), (Figura 7).

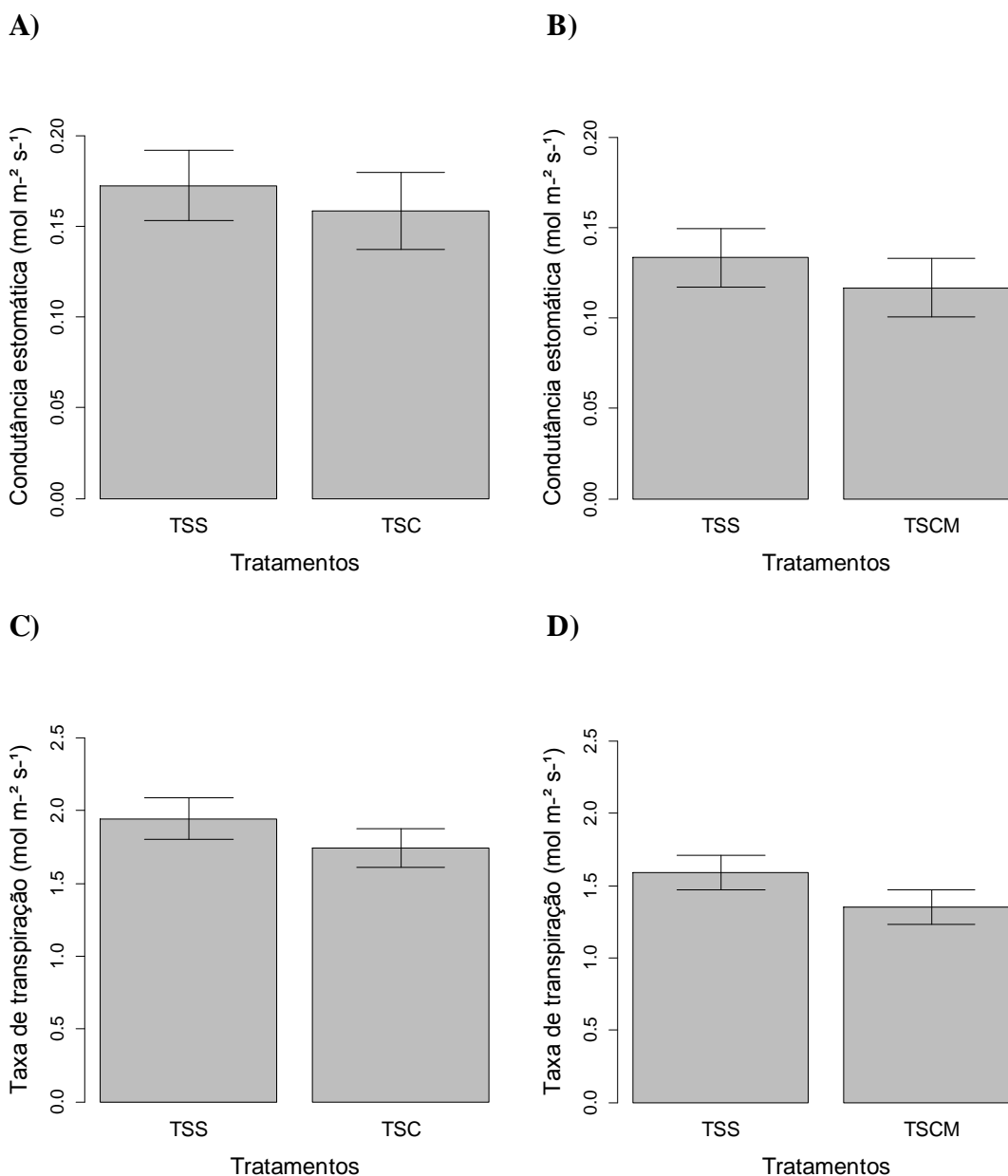


Figura 7: Média (\pm Erro Padrão) da Condutância Estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), em A e B, e da Taxa de Transpiração ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), em C e D, em função do Tratamento Sem das Cigarras (TSS) e Tratamento Som das Cigarras (TSC) e Tratamento Som das Cigarras Misturado (TSCM), comparados com o controle, Tratamento Sem exposição ao Som (TSS). Foram feitas quatro medições de trocas gasosas ao longo do tempo, em cada planta, com o Analisador de Gás no Infra-Vermelho (IRGA), (ADC BioScientific, modelo LC-pro SD).

A Figura 8 mostra a taxa fotossintética ao longo do tempo nos dois experimentos, com som organizado e com som misturado das cigarras. No primeiro

experimento, há um aumento na fotossíntese das plantas do TSC e do TSS (1) ao longo do tempo, contudo as plantas expostas ao som das cigarras apresentam uma taxa fotossintética maior ao longo de todos os dias de experimento. Já no segundo experimento, ocorre uma redução nesta variável ao longo do tempo nos dois tratamentos, TSCM e TSS (2), sendo que as plantas do TSS (2), neste caso, apresentam uma fotossíntese mais elevada durante os dias de experimento. As curvas dos tratamentos controles, TSS (1) e TSS (2) se cruzam exatamente na metade do tempo de exposição aos tratamentos (quinto dia), enquanto as curvas dos tratamentos sonoros, TSC e TSCM, não se cruzam, mas se afastam ao longo do tempo, com a primeira crescendo enquanto a segunda reduz.

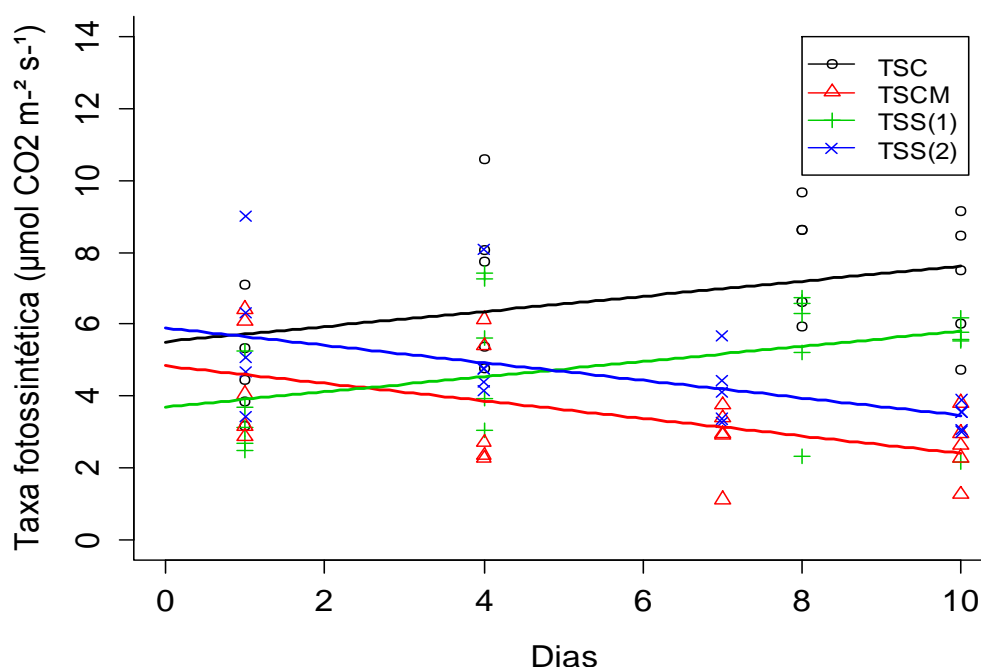


Figura 8: Taxa Fotossintética ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em função do tempo (dias) e dos tratamentos durante os experimentos com som organizado e com som misturado das cigarras. Em preto, o Tratamento Som das Cigarras (TSC), com seu respectivo controle em verde, Tratamento Sem exposição ao Som, TSS (1). Em vermelho o Tratamento Som das Cigarras Misturado (TSCM) e em azul, seu respectivo controle, Tratamento Sem exposição Sonora, TSS (2). Repare que as curvas do primeiro experimento tem uma inclinação positiva ao longo do tempo, enquanto as curvas do segundo experimento decrescem ao longo do tempo. Isso ocorre devido à diferença entre as idades das plantas do primeiro e do segundo experimento. Contudo os TSS dos dois experimentos apresentam uma média semelhante e se cruzam exatamente na metade dos dias de exposição aos tratamentos (quinto dia). Enquanto que as curvas do TSC e do TSCM não se cruzam, mas se afastam ao longo do tempo. Foram feitas quatro medições de trocas gasosas ao longo do tempo, em cada planta, com o Analisador de Gás no Infra-Vermelho (IRGA), (ADC BioScientific, modelo LC-pro SD).

4. Discussão

Os resultados de germinação e desenvolvimento inicial indicam que as respostas de *I. walleriana* ao estímulo sonoro ambiental, composto pelo som de cigarras, dependem de seu estágio de desenvolvimento. Sementes e plântulas não apresentaram alterações significativas nos padrões de germinação e desenvolvimento inicial e esses resultados sugerem que em diferentes estágios de desenvolvimento, uma planta pode responder de maneira diferente ao mesmo estímulo sonoro.

Alguns estudos mostraram que vibrações sonoras podem influenciar a germinação de sementes. Uchida & Yamamoto (2002) verificaram aumento na taxa relativa de germinação de sementes de *Arabidopsis thaliana* expostas a vibrações de 70, 100 e 120 Hz. Já Petraglia (2008) também evidenciou que a aplicação de tratamento com músicas em dois intervalos de 1 hora diários produziu um aceleração do processo germinativo. Por outro lado, Uchida & Yamamoto (2002) também demonstraram, no mesmo trabalho citado acima, que a exposição à 40 Hz não induziu alterações na germinação de *A. thaliana* em relação ao controle e Petraglia (2008), em um estudo mais amplo, detectou que as frequências de 575, 814 e 1.150 Hz, aplicadas por 30min, duas vezes ao dia, produziram retardamento da germinação de *Phaseolus vulgaris*. Esses autores relatam que diferentes frequências de sons puros e também sons compostos, com organização em escala harmônica (música), podem induzir respostas diferentes na germinação das sementes.

Em relação ao desenvolvimento inicial Bochu *et al.* (2003) verificaram que o som com 106 dB e 400 Hz ou 1000 Hz, aplicados em dois intervalos de 30 min diários, afetaram o tamanho do hipocótilo e epicótilo e a matéria fresca de plântulas de arroz, enquanto sob outras combinações de intensidades e frequências de som não foram obtidas respostas significativas. Estes resultados também não foram corroborados pelos dados obtidos no presente estudo, onde foi mostrado que o som ambiental das cigarras não afetou o processo germinativo e o desenvolvimento inicial de plantas de *I. walleriana*. A ausência de respostas germinativa e de desenvolvimento inicial de *I. walleriana* parece estar relacionada às características do som empregado, como intensidade sonora ou duração do estímulo, que podem ter sido insuficientes para gerar respostas morfológicas detectáveis, como destacado por Petraglia (2008). Além disso, o tamanho da semente, bem pequeno no caso de *I. walleriana*, quando comparados a sementes de arroz e feijão, pode também dificultar o efeito do som nas sementes e a detecção de possíveis modificações nos padrões germinativos. Esse efeito pode ser mais

facilmente verificados em plantas com sementes relativamente grandes e germinação lenta, como oleaginosas.

Os resultados de trocas gasosas, por sua vez, confirmam a hipótese de que plantas podem detectar sons produzidos por insetos como informações ambientais. Houve aumento da taxa fotossintética das plantas expostas ao som ambiental composto predominantemente pelo som de cigarras em comparação ao tratamento controle, enquanto o mesmo som, porém ‘misturado’ e, portanto, sem apresentar o padrão característico reconhecível do som originalmente gravado, induziu respostas inversas na taxa fotossintética das plantas, em relação ao seu controle. Essas alterações na fotossíntese das plantas nos dois experimentos não ocorreram por limitações difusivas de CO₂, nem luminosas, já que esses parâmetros foram monitorados durante a coleta dos dados experimentais, mostrando que o som realmente causou alterações nas respostas fisiológicas no tecido foliar.

O incremento fotossintético das plantas sob o tratamento com som das cigarras (TSC) pode ser uma resposta da interferência do som em um ou muitos passos desse complexo processo. Meng *et al.* (2012) registraram elevação na emissão de fluorescência máxima da clorofila *a* (F_m), no rendimento quântico máximo do PSII (Fluorescência variável (F_v)/Fluorescência máxima (F_m)) e no *quenching* não-fotoquímico (NPQ) do tratamento sonoro em comparação ao controle em plantas de morango (*Fragaria ananassa*). Aumentos em F_m refletem o incremento no transporte de elétrons para o centro de reação do PSII, enquanto a relação F_v/F_m é um indicador sensível do desempenho fotossintético da planta, indicando que o som pode alterar a atividade da etapa fotoquímica da fotossíntese. Também pode haver aumento da atividade da cadeia de transporte de elétrons, gerando maior bombeamento de H⁺ e, logo, a elevação da atividade da enzima H⁺ATPase da membrana (Yi *et al.* 2003, Wang *et al.* 2002), com incremento na síntese de ATP (Xiaocheng *et al.* 2003). Portanto, tanto a etapa fotoquímica como aquelas da fixação do carbono, no ciclo de Calvin-Benson, podem ser afetadas.

Foi observado incremento na taxa de assimilação de CO₂ nas plantas expostas ao TSC. Cypriano *et al.* (dados não publicados) e Meng *et al.* (2012) também obtiveram resultados semelhantes, além de apontarem aumentos no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) e de morango, respectivamente, expostas ao estímulo sonoro.

Já a redução significativa na relação Ci/Ca das plantas expostas a esse mesmo tratamento TSC parece ter acompanhado o aumento da atividade da maquinaria

fotossintética, que sob as condições experimentais consumiu mais CO₂. Também Jeong *et al.* (2007) mostraram que a aplicação, por quatro horas diárias, de uma seleção de músicas clássicas em plantas de arroz (*Oriza sativa*), crescendo tanto na presença como na ausência da luz, estimularam a expressão dos genes *ald*, responsável pela síntese da enzima frutose-1,6-bifosfato aldolase, e *rbcS*, que sintetiza a subunidade menor da enzima RUBISCO. Estas duas enzimas participam do ciclo de Calvin-Benson, responsável pela fixação de CO₂ e produção de carboidratos. Logo, o aumento da síntese dessas enzimas pode gerar otimização da fixação de CO₂.

A ausência de alterações significativas na condutância estomática é um indício de que a resposta ao som ficou localizada ao nível da maquinaria fotossintética, não havendo interferências no equilíbrio hídrico, confirmada pela não alteração da taxa transpiratória das plantas.

Uma vez que a análise de trocas gasosas foi realizada após a exposição aos tratamentos, pode-se afirmar que os efeitos do som nas plantas de *I. walleriana* persistem ao longo do tempo, não sendo reversíveis ou momentâneos, e parecem ser somatórios entre os intervalos de exposição. Isso fica mais evidente quando os valores dos parâmetros fotossintéticos são avaliados ao longo do tempo de exposição.

As alterações nas curvas da atividade fotossintética ao longo do tempo, entre o primeiro e segundo experimento, ocorrem devido a diferenças na idade das plantas (Figura 8). As plantas do primeiro experimento, com 82 dias de idade, estão apresentando uma fotossíntese ascendente, ao contrário das plantas do segundo experimento, com 97 dias de idade, que estão entrando em processo de senescência. Deve-se destacar que as plantas do controle, TSS (1) e TSS (2), apresentam uma fotossíntese muito semelhante (vide Figura 6), com as curvas se cruzando exatamente na metade do tempo (quinto dia). A ausência de alterações significativas na fotossíntese, entre as plantas dos controles, evidencia que a diferença de idade entre as plantas dos dois experimentos não afetou nos resultados encontrados devido à exposição sonora. Dessa forma, pode-se afirmar que as alterações na taxa fotossintética realmente foram ocasionadas pelo estímulo sonoro em TSC e TSCM.

A absorção da energia sonora pelas folhas (Martens & Michelsen 1981) pode estar gerando uma propagação da onda sonora no interior do tecido foliar, especialmente em suas membranas celulares. Sons podem se propagar por camadas monolípídicas, alterando suas propriedades físicas dependentes de área, tal como potencial de superfície, pH e temperatura (Griesbauer *et al.* 2009); esse trabalho sugere que o som possa influenciar o funcionamento de membranas biológicas. Essa ideia é

corroborada pelos resultados de Zhao *et al.* 2002a e Zhao *et al.* 2002b que registraram alterações na conformação e fluidez de membrana vegetais expostas ao som, processo esse que pode interferir no transporte transmembrana e, logo, no metabolismo vegetal. No entanto, somente a atuação da energia mecânica no tecido foliar parece não explicar as diferenças encontradas nas respostas das plantas nos experimentos com ‘som organizado’ e com ‘som misturado’ das cigarras.

A principal interpretação ecológica desses resultados encontrados é que as plantas distinguiram entre os sons a que foram submetidas, respondendo a eles de forma diferente, em termos fisiológicos. O aumento da fotossíntese sob exposição ao som ambiental das cigarras e a redução da taxa fotossintética em plantas expostas ao som misturado, sugerem que no segundo caso pode ter ocorrido a perda de uma possível informação biológica. E além da diferença quantitativa observada, esse novo som gerou uma resposta inversa, sugerindo que pode se constituir num estresse para a planta. Esses resultados concordam com Gagliano (2012), que propôs que plantas podem interpretar vibrações sonoras como informações ambientais.

Ondas sonoras não se constituem em recurso para plantas. Não obstante, o som pode ser uma fonte de informação acessória, que auxilia na interação desses organismos com o ambiente biótico e abiótico que os rodeia. A expressão dos genes *ald* e *rbcS* em plantas crescendo no escuro, verificado pelo aumento dos RNAm que codificam as sínteses das enzimas aldolase e rubisco, sugere que o som pode ser um importante sinal secundário empregado no disparo de respostas fisiológicas, já que ambas as enzimas necessitam de luz para a indução de sua síntese (Jeong *et al.* 2007). Semelhantemente, as diferentes respostas das *I. walleriana* a sons fisicamente semelhantes, mas com padrões organizacionais diferentes, evidencia que há reconhecimento de informações contidas nas variações de intensidades e na sequência temporal de frequências dos sinais emitidos.

Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que estruturas vegetais podem ser funcionalmente adaptadas para executar a tarefa biofísica de detectar vibrações sonoras do ambiente, podendo distinguir elementos contidos na onda sonora, sendo um mecanismo análogo ao realizado pelo complexo fitocromo em relação à luz (Smith 2000). Diferentes intensidades e frequências da luz também geram modificações nas respostas de organismos vegetais. A informação contida na relação luz vermelho: vermelho distante (R:FR), ou seja, na relação entre diferentes frequências de ondas eletromagnéticas, pode ser percebida pela planta e induz a interconversão entre formas de fitocromos, e esse fenômeno é determinante para disparar importantes respostas

ecofisiológicas nas plantas, tais como floração, dormência e mecanismos de “evitação de sombra” (Smith 2000).

A característica de reação a sinais acústicos emitidos por insetos e, mais especificamente por cigarras, pode ser evolutivamente fixada nas plantas. As cigarras são amplamente distribuídas no mundo, e normalmente “cantam” no início da primavera, época em que há uma mudança fisiológica e comportamental em muitas espécies vegetais, incluindo *I. walleriana*. Dessa maneira, esse som pode ser empregado pelas plantas como um elemento ambiental acessório para detectar condições e recursos ambientais, levando ao disparo de respostas morfológicas e fisiológicas sincronizadas.

As cigarras emitem som em “coro” e a gravação *in situ* teve por objetivo registrar esse som com o máximo de semelhança possível ao som encontrado na natureza. Portanto, considera-se que este som produzido por *Q. gigas*, com uma intensidade maior, com uma ordem de grandeza 16 vezes mais elevada que o segundo som mais intenso, e uma duração contínua durante toda a gravação, seja o principal estímulo que gerou modificações no metabolismo das plantas estudadas.

São bem conhecidos os mecanismos de respostas fototrópicas e gravitrópicas, desde as estruturas vegetais responsáveis pela detecção do estímulo ambiental até as cascatas bioquímicas, bem como o sentido ecológico dessas respostas (Morita 2010; Goyal *et al.* 2013). Contudo, ainda existe pouca compreensão acerca de como campos eletromagnéticos ou estímulos mecânicos, tais como o toque, o vento e ondas mecânicas, são detectados pelas plantas, como ocorrem os mecanismos de respostas fisiológicas e morfológicas e qual o sentido ecológico dessas respostas (Telewski 2006; Baluska & Mancuso 2009).

Em suma, o processo de detecção do som ambiental das cigarras, a assimilação da mensagem acústica e o disparo de respostas fisiológicas parece ser complexo e pode apresentar um significado ecológico em termos de integração das plantas com o ambiente que as rodeia.

5. Referências

- Baluska, F. & Mancuso, S. (2009). Plant neurobiology: from sensory biology, via plant communication, to social plant behavior. *Cognitive Processing*, 10 (Suppl 1), S3–S7.
- Bochu, W., Xin, C., Zhen, W., Qizhong, F., Hao, Z. & Liang, R. (2003). Biological effect of sound field stimulation on paddy rice seeds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 32, 29–34.

- Bochu, W., Jiping, S., Biao, L., Jie, L. & Chuanren, D. (2004). Soundwave stimulation triggers the content change of the endogenous hormone of the *Chrysanthemum* mature callus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 37, 107–112.
- Braam, J. (2005). In touch: plant responses to mechanical stimuli. *The New Phytologist*, 165, 373–389.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009). *Regras para análise de sementes*. Mapa/ACS, Brasília.
- Brenner, E.D., Stahlberg, R., Mancuso, S., Vivanco, J., Baluska, F. & Van Volkenburgh, E. (2006). Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling. *Trends in Plant Science*, 11, 413–419.
- Bronstein, J.L., Alarcón, R. & Geber, M. (2006). The evolution of plant-insect mutualisms. *The New Phytologist*, 172, 412–428.
- Buchmann, S.L. & Hurley, J.P. (1978). A biophysical model for buzz pollination in angiosperms. *Journal of Theoretical Biology*, 72, 639–657.
- Chehab, E.W., Eich, E. & Braam, J. (2009). Thigmomorphogenesis: a complex plant response to mechano-stimulation. *Journal of Experimental Botany*, 60, 43–56.
- Cocroft, R. & Pogue, M. (1996) Social behavior and communication in the Neotropical cicada *Fidicina mannifera* (Fabricius) (Homoptera: Cicadidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 64, 85-97.
- Cypriano, R.J., Kuki, K.N., Godoy, A.G., Duque-Brasil, R. & Sperber, C. F. Efeito do som na atividade fotossintética de *Solanum lycopersicum* L. (dados não publicados).
- De Luca, P. & Vallejo-Marín, M. (2013). What's the “buzz” about? The ecology and evolutionary significance of buzz-pollination. *Current Opinion in Plant Biology*, 16, 1–7.
- Gagliano, M. (2012). Green symphonies: a call for studies on acoustic communication in plants. *Behavioral Ecology*, 1–7.
- Gagliano, M., Mancuso, S. & Robert, D. (2012). Towards understanding plant bioacoustics. *Trends in Plant Science*, 17, 323–325.

- Galland, P. & Pazur, A. (2005). Magnetoreception in plants. *Journal of Plant Research*, 118, 371–389.
- Goyal, A., Szarzynska, B. & Fankhauser, C. (2013). Phototropism: at the crossroads of light-signaling pathways. *Trends in Plant Science*, 1–9.
- Greenfield, M.D. (2002). *Signalers and Receivers: mechanisms and evolution of Arthropod communication*. Oxford University Press, New York (USA).
- Griesbauer, J., Wixforth, A. & Schneider, M. F. (2009). Wave propagation in lipid monolayers. *Biophysical Journal*, 97, 2710-2716.
- Hongbo, S., Biao, L., Bochu, W., Kun, T. & Yilong, L. (2008). A study on differentially expressed gene screening of *Chrysanthemum* plants under sound stress. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 329–333.
- Jeong, M. J., Shim, C. K., Lee, J. O., Kwon, H. B., Kim, Y. H., Lee, S. K., *et al.* (2007). Plant gene responses to frequency-specific sound signals. *Molecular Breeding*, 21, 217–226.
- Karban, R. (2008). Plant behaviour and communication. *Ecology Letters*, 11, 727–739.
- Li, B., Wei, J., Wei, X., Tang, K., Liang, Y., Shu, K., *et al.* (2008). Effect of sound wave stress on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of *Dendrobium candidum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63, 269–275.
- Maccagnan, D.H.B. (2008). *Cigarra (Hemiptera:Cicadidae): emergência, comportamento acústico e desenvolvimento de armadilha sonora*. Tese de Doutorado (Ciências), USP – Ribeirão Preto.
- Mandle, L., Warren, D.L., Hoffmann, M.H., Peterson, a T., Schmitt, J. & von Wettberg, E.J. (2010). Conclusions about niche expansion in introduced *Impatiens walleriana* populations depend on method of analysis. *PloS One*, 5, 1-9.
- Martens, M.J.M. & Michelsen, A. (1981). Absorption of acoustic energy by plant leaves. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 69, 303–306.

- Mello, M.O. & Silva-filho, M.C. (2002). Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14, 71–81.
- Meng, Q., Zhou, Q., Zheng, S. & Gao, Y. (2012). Responses on Photosynthesis and Variable Chlorophyll Fluorescence of *Fragaria ananassa* under Sound Wave. *Energy Procedia*, 16, 346–352.
- Morita, M.T. (2010). Directional gravity sensing in Gravitropism. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 705–720.
- Otte, D. (1992). Evolution of cricket songs. *Journal of Orthoptera Research*, 1, 25–49.
- Petraglia, M.S. (2008). *Estudo sobre a ação de vibrações acústicas e música em organismos vegetais*. Dissertação de Mestrado (Biologia Geral e Aplicada), Unesp – Botucatu.
- Plotnick, R.E. & Smith, D.M. (2012). Exceptionally Preserved Fossil Insect Ears from the Eocene Green River Formation of Colorado. *Journal of Paleontology*, 86, 19–24.
- R Development Core Team (2007). R: A language and environment for statistical computing. www.r-project.org.
- Ranal, M.A. & Santana, D.G.D.E. (2006). How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botânica*, 29, 1–11.
- Schaefer, H., Schaefer, V. & Levey, D. (2004). How plant-animal interactions signal new insights in communication. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 577–584.
- Silva, P.N., Hrcir, M. & Fonseca, V.L.I. (2010). A Polinização Por Vibração. *Oecologia Australis*, 14, 140–151.
- Smith, H. (2000). Phytochromes and light signal perception by plants - an emerging synthesis. *Nature*, 407, 585–591.
- Taylor, T.N., Taylor, E.L. & Krings, M. (2009). *Paleobotany: the biology and evolution on fossil plants*. 2nd edn. Elsevier: USA.
- Telewski, F.W. (2006). A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *American Journal of Botany*, 93, 1466–1476.

- Trewavas, A. (2005). Green plants as intelligent organisms. *Trends in Plant Science*, 10, 413–419.
- Uchida, A. & Yamamoto, K.T. (2002). Effects of mechanical vibration on seed germination of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant & Cell Physiology*, 43, 647–651.
- Wang, B., Zhao, H., Wang, X., Duan, C., Wang, D. & Sakanishi, A. (2002). Influence of sound stimulation on plasma membrane H⁺ATPase activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 25, 183–188.
- Xiaocheng, Y., Bochu, W. & Chuanren, D. (2003). Effects of sound stimulation on energy metabolism of *Actinidia chinensis* callus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 30, 67–72.
- Xiujuan, W., Bochu, W., Yi, J., Danqun, H. & Chuanren, D. (2003a). Effect of sound stimulation on cell cycle of chrysanthemum (*Gerbera jamesonii*). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 29, 103–107.
- Xiujuan, W., Bochu, W., Yi, J., Chuanren, D. & Sakanishi, A. (2003b). Effect of sound wave on the synthesis of nucleic acid and protein in chrysanthemum. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 29, 99–102.
- Yi, J., Bochu, W., Xiujuan, W., Chuanren, D. & Xiaocheng, Y. (2003). Effect of sound stimulation on roots growth and plasmalemma H⁺ATPase activity of chrysanthemum (*Gerbera jamesonii*). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 27, 65–69.
- Zhao, H., Wang, B., Cai, S. & Xi, B.S. (2002a). Effect of sound stimulation on the lipid physical states and metabolism of plasma membrane from *Chrysanthemum* callus. *Acta Botanica Sinica*, 44, 799–803.
- Zhao, H., Wu, J., Xi, B. & Wang, B. (2002b). Effects of sound-wave stimulation on the secondary structure of plasma membrane protein of tobacco cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 25, 29–32.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A habilidade de sentir estímulos físicos do ambiente é de vital importância para todos os seres vivos. O som é uma onda mecânica presente nos ecossistemas desde os primórdios de surgimento da vida e podemos afirmar que o som é um elemento onipresente, uma vez que há necessidade somente de algum objeto em vibração e um meio material, por exemplo, ar e água, para propagação das ondas sonoras. Sons são produzidos tanto por elementos bióticos como por elementos abióticos e o grupo das plantas, durante toda a sua evolução, estão expostas constantemente às informações contidas nas ondas sonoras.

As recentes descobertas de compostos orgânicos voláteis como mediadores de interação de plantas com coespecíficos e com outros níveis tróficos vem representando uma revolução na percepção sobre como plantas se relacionam com o ambiente a sua volta (Dicke 2000; Dicke & Loon 2003; Baldwin 2006). Este trabalho propõe que o som pode ser mais um mediador de interações ecológicas de plantas com outros elementos dos ecossistemas. São mostradas evidências de que plantas podem perceber sons como informações ambientais, sugerindo que esses estímulos podem ser empregados como uma forma de perceber o ambiente que as rodeia. Se esta característica for evolutivamente fixada em organismos vegetais, como defende Gagliano (2012), nosso entendimento sobre como plantas interagem com o ambiente poderá mudar, mostrando que organismos vegetais podem estar ligados de uma forma muito mais estreita com outros elementos bióticos e abióticos.

As ideias defendidas neste estudo convergem com estudos contemporâneos em biologia vegetal, que vem mostrando como plantas são capazes de perceber, acessar e interagir com componentes bióticos e abióticos através da aquisição de informações do ambiente que as rodeiam (Trewavas 2005; Brenner *et al.* 2006; Baluska & Mancuso 2007; Karban 2008). Nessa perspectiva, plantas poderiam identificar polinizadores no ambiente através de sons específicos produzidos por estes, estimulando seu processo reprodutivo e sincronizando a produção de flores e de compostos voláteis com a presença desses animais. Além disso, plantas poderiam se defender de insetos herbívoros, detectando sua presença no ambiente e produzindo compostos de defesa, antes destes as atacarem.

Plantas também poderiam utilizar sons emitidos por animais que ocorrem sazonalmente no ambiente, como o caso das cigarras, como elementos acessórios para detectar mudanças nos padrões de condições e recursos no ambiente, estimulando ou

inibindo seu crescimento e reprodução. Outra possibilidade é a detecção de alterações diárias no ambiente sonoro, entre o dia e a noite, que poderia se constituir num estímulo acessório a modificações na luminosidade. Isso é especialmente importante para plantas adaptadas ao sub-bosques de formações vegetacionais mais densas. Sons produzidos por grilos e outras espécies noturnas poderiam ser identificados e diferenciados dos sons produzidos por pássaros, por exemplo, durante o período diurno.

Importante ressaltar também a influência da poluição sonora humana como uma influência negativa nos ecossistemas, que além de interferir no processo de comunicação entre animais, também poderia estar interferindo na percepção do ambiente pelos vegetais.

Este trabalho é pioneiro em muitos aspectos. É o primeiro trabalho registrado na literatura científica com um grande rigor metodológico em relação ao isolamento acústico e a replicação espacial das unidades experimentais. É o primeiro a avaliar o som como uma informação ecológica, mostrando respostas vegetais diferentes ao mesmo som, misturado e organizado. Além disso, é o primeiro a medir o efeito do som das cigarras, um dos sons de maior intensidade sonora na natureza, e analisar seus efeitos em plantas de *Impatiens walleriana*.

O som influencia as plantas e, por isso, devemos rever o controle da variável sonora durante experimentos em condições semi-controladas. A maior parte dos experimentos não consideram a interferência sonora do ambiente e, especialmente em casos onde plantas ficam perto de locais ou equipamentos “barulhentos”, pode estar havendo interferência do som do ambiente nas plantas, gerando interpretações equivocadas de resultados experimentais.

Há carência de pesquisas científicas avaliando a influência do som em plantas. Um motivo pode ser a dificuldade metodológica de se isolar o som para aplicá-lo em plantas, como destacado no primeiro capítulo. Contudo as recentes proposições de Gagliano (2012) podem mudar o rumo das pesquisas científicas na área, estimulando pesquisadores a compreender mais a fundo os efeitos sonoros em plantas, gerando, conseqüentemente, uma expansão no número de trabalhos científicos.

O Brasil, por outro lado, parece se encontrar na contramão da ciência, uma vez que somente duas pesquisas científicas foram realizadas: de Petraglia (2008) e Cypriano *et al.* (dados não publicados). Um fator que pode estar influenciando na expansão das pesquisas é o conservadorismo de pesquisadores que consideram o estudo de efeitos sonoros em plantas uma linha de pesquisas esotérica ou metafísica e, segundo alguns, não é passível de acurácia científica, como destacado por Cypriano *et al.* (2013).

Segundo Kuhn (1998), a novidade no meio científico somente emerge com dificuldade, que se manifesta através de resistências. Muitos conhecimentos hoje aceitos dentro da academia foram depreciados durante seu surgimento, incluindo a teoria da Evolução de Charles Darwin. Como destaca Carl Sagan: “ausência de evidência não é evidência de ausência”, por isso esse trabalho instiga cientistas a buscarem evidências concretas que comprovem que sons influenciam, ou não, organismos vegetais.

Novas ideias precisam de um campo intelectual aberto, como destaca Morin (2008, p.35):

“(...) se é verdade que o surgimento e o desenvolvimento de uma nova ideia precisam de um campo intelectual aberto, onde se debatam e se combatam teorias e visões do mundo, se é verdade que toda novidade se manifesta como desvio (...) então o desenvolvimento científico, no sentido de que esse termo comporte necessariamente invenção e descoberta, necessita fundamentalmente de duas condições: 1) manutenção e desenvolvimento do pluralismo teórico (ideológico, filosófico) em todas as instituições e comissões científicas; 2) proteção do desvio, ou seja, tolerar/favorecer os desvios no seio dos programas e instituições (...).”

Como afirma Gagliano (2012), já passamos da fase de avaliar se o som tem efeitos nas plantas. O som influencia plantas e precisamos agora entender qual o efeito dessa vibração na morfologia, fisiologia e expressão gênica vegetal, qual o sentido evolutivo e ecológico dessas respostas e quais seriam as possíveis utilidades da aplicação do som em plantas, por exemplo, na área agrícola.

Pesquisas que avaliem o efeito do som na relação planta-polinizador ou planta-herbívoro devem ser abordagens prioritizadas num primeiro momento, mostrando como o som pode estar participando de processos coevolutivos entre grupos intimamente relacionados.

Referências

- Baldwin, I.T., Halitschke, R., Paschold, A., von Dahl, C.C. & Preston, C. a. (2006). Volatile signaling in plant-plant interactions: “talking trees” in the genomics era. *Science (New York, N.Y.)*, 311, 812–815.
- Baluska, F. & Mancuso, S. (2007). Plant neurobiology as a paradigm shift not only in the plant sciences. *Plant Signaling & Behavior*, 2, 205–207.
- Brenner, E.D., Stahlberg, R., Mancuso, S., Vivanco, J., Baluska, F. & Van Volkenburgh, E. (2006). Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling. *Trends in Plant Science*, 11, 413–419.
- Cypriano, R.J., Duque-brasil, R., Kuki, K.N., Godoy, A.G. & Rezende, M.Q. (2013). A música pode influenciar as plantas? Qual a opinião de professores universitários sobre essa interação? *Polêm!ca*, 12, 54–63.
- Cypriano, R.J., Kuki, K.N., Godoy, A.G., Duque-Brasil, R. & Sperber, C. F. Efeito do som na atividade fotossintética de *Solanum lycopersicum* L. (dados não publicados).
- Dicke, M. & Loon, J.J. (2000). Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 97, 237–249.
- Dicke, M., Agrawal, A. & Bruin, J. (2003). Plants talk, but are they deaf? *Trends in Plant Science*, 8, 403–405.
- Gagliano, M. (2012) Green symphonies: a call for studies on acoustic communication in plants. *Behavioral Ecology*, 1–7.
- Karban, R. (2008). Plant behaviour and communication. *Ecology Letters*, 11, 727–739.
- Kuhn, T. S. (1998). *A estrutura das revoluções científicas*. 5. ed. Editora Perspectiva S.A, São Paulo.
- Morin, E. (2008). *Ciência com consciência*. 11. ed. Bertrand Brasil, Rio de Janeiro.
- Petraglia, M.S. (2008). *Estudo sobre a ação de vibrações acústicas e música em organismos vegetais*. Dissertação de Mestrado (Biologia Geral e Aplicada), Unesp – Botucatu.

Trewavas, A. (2005). Green plants as intelligent organisms. *Trends in Plant Science*, 10, 413–419.

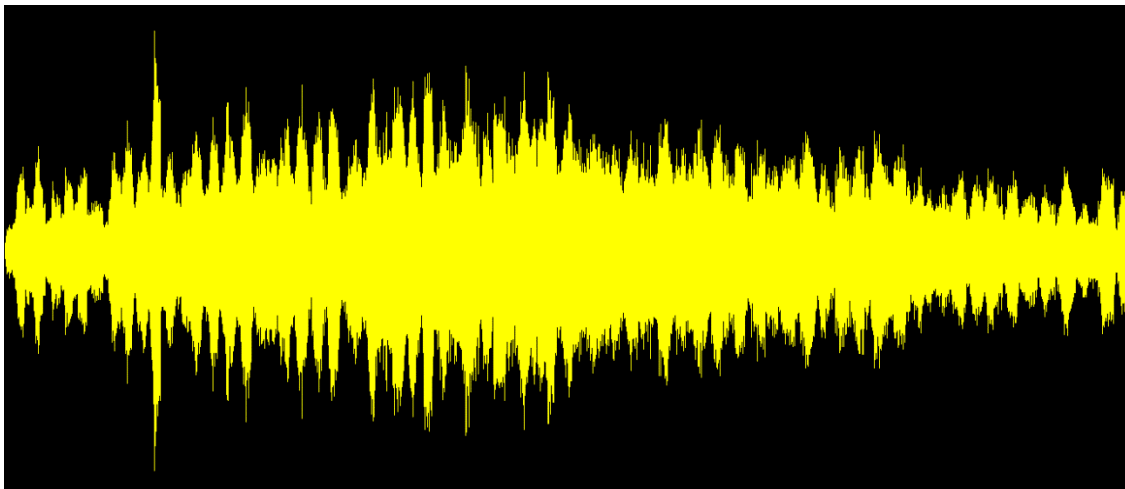
ANEXOS

Anexo 1: Animais emitindo sons na gravação, com suas respectivas banda de frequências (mínima e máxima) e intensidade. As espécies estão organizadas em ordem decrescente de intensidade do som produzido. O som da cigarra *Quesada gigas* apresenta intensidade sonora com uma ordem de grandeza 16 vezes maior que o segundo som, de *Fidicina mannifera*.

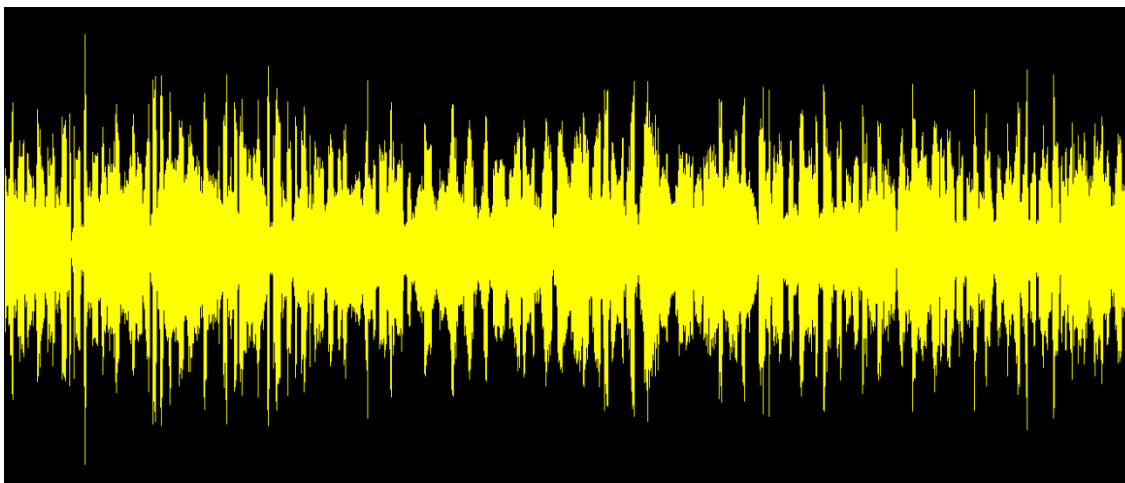
Táxon	Espécie	Intervalo de frequência (Hz)	Intensidade sonora (dB)
Família: Cicadidae	<i>Quesada gigas</i>	1.015 – 1.210	-12,47
	<i>Fidicina mannifera</i>	4.100 – 8.670	-24,61
Classe: Aves	Sp 1	3.830 – 4.180	-30,14
	Sp.2	3.200 – 3.950	-35,17
	Sp.3	2.421 – 3.475	-41,20
Família: Gryllidae	Sp.1	2.735 – 3.045	-42,49
	Sp.2	3.435 – 3.710	-43,31
	Sp.3	3.670 – 3.900	-44,85
	Sp.4	4.840 – 5.080	-48,25

Anexo 2: Oscilograma do Som das Cigarras Organizado (A) e do Som das Cigarras Misturado (B). Imagem feita com o software Avisoft SAS-Lab Lite.

A)

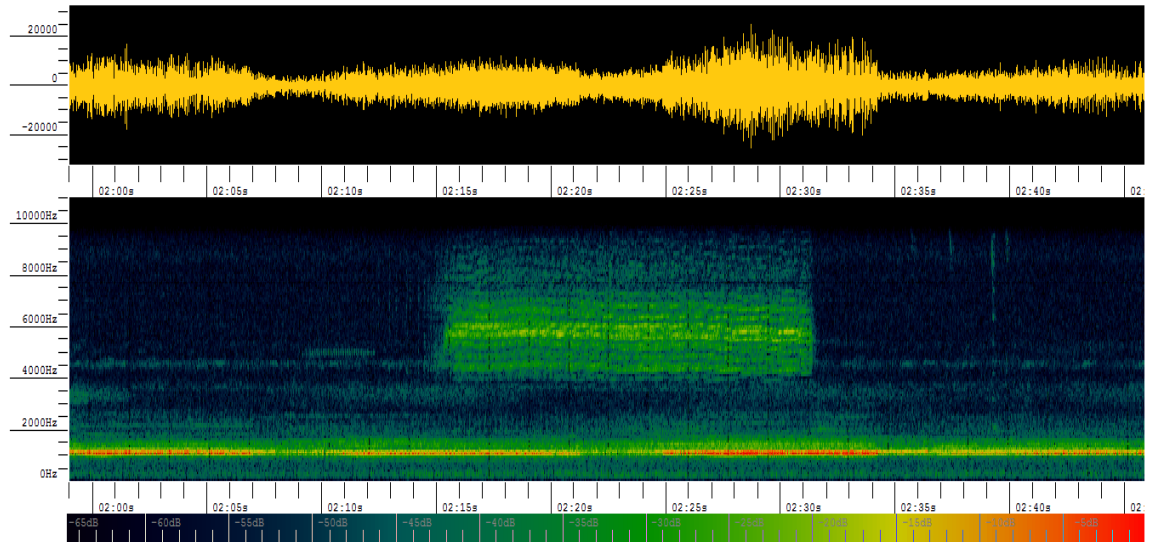


B)



Anexo 3: Oscilograma (parte superior) e Sonograma (parte inferior) de 47s do Som das Cigarras Organizado (A) e do Som das Cigarras Misturado (B). O espectro de cores representam as variações de intensidade das frequências presentes no som, variando de azul escuro (baixa) até vermelho (alta). Em “A”, percebe-se uma linha vermelha quase contínua na faixa de 1.100Hz correspondente ao som produzido por *Quesada gigas* e uma faixa grande entre 4.000 e 9.000Hz, mostrando o padrão de canto de *Fidicina mannifera*. Comparando os sonogramas, pode-se identificar o padrão fragmentado das frequências no som misturado. Imagens feitas com o *software* SongScope v.4.1.3A.

A)



B)

