

FILIPPE SCHITINI SALGADO

**RECONHECIMENTO DA ORGANIZAÇÃO DE ONDAS SONORAS EM
PLANTAS: SINGULARIDADE OU UBIQUIDADE?**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Salgado, Filipe Schitini, 1994-

S164r
2019

Reconhecimento da organização de ondas sonoras em
plantas : singularidade ou ubiquidade? / Filipe Schitini Salgado.
–Viçosa, MG, 2019.

vi, 21f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Og Francisco Fonseca de Souza.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.17-18.

1. Bioacústica. 2. Fisiologia. 3. Ecologia. 4. *Impatiens
walleriana*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Entomologia.
II. Título.

CDD 22 ed. 583.79

FILIFE SCHITINI SALGADO

**RECONHECIMENTO DA ORGANIZAÇÃO DE ONDAS SONORAS EM
PLANTAS: SINGULARIDADE OU UBIQUIDADE?**

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

APROVADA: 25 de fevereiro de 2019


Aline Mitcheli-Ramos Fregonezzi


Cleberson Ribeiro


Og Francisco Fonseca de Souza
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente à minha mãe Christiane, e meu pai João Carlos, por serem os meus pilares e porto seguro, o lugar pra “onde sempre voltar” só existe porque o amor de vocês é a coisa mais bela desse mundo. Não há palavras para agradecer o mundo que vocês movem por mim, sem nunca pedir nada em troca.

À Bárbara, por ser a minha companheira de longa data, por me ajudar a suportar as piores das tempestades, e por celebrar os melhores momentos sempre juntos. Meu amor por você é infinito.

À minha orientadora, Flávia Maria, por ser este exemplo de ética, criatividade e respeito ao ser humano. Agradeço pelo amadurecimento, atenção e todo o tempo despendido em minha formação. Você é excepcional.

Ao meu orientador, Og de Souza, por ter me aceitado nesta jornada, pelas conversas, debates, suporte e atenção.

À Aline e Cleberson, por terem cedido seu tempo e dedicado contribuições à este trabalho de bom grado.

Ao meu amigo de longa data, Matheus, nossa amizade dispensa comentários.

Ao Sebastián, por todo suporte intelectual, técnico e apoio. Você foi fundamental

Ao Caio, Lucas, André, May, Ayessa e Gustavo, pelo companheirismo dentro e fora do laboratório, pela boa vontade, ajuda, e pelas boas conversas. Amo vocês.

À Sílvia, por toda a proatividade, disponibilidade, ajuda e carinho. Você vale ouro Silvinha !

Aos muitos professores e funcionários que se empenharam em fazer o nosso trajeto mais fácil e proveitoso. Nada seria possível sem eles.

Ao CNPQ, pelo suporte econômico ao longo de toda esta trajetória.

“A liberdade é defendida com discursos e atacada com armas” – Carlos
Drummond de Andrade

SUMÁRIO

Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Introdução.....	1
Materiais e Métodos.....	3
Resultados.....	10
Discussão.....	14
Referências.....	17
Anexo.....	19

RESUMO

SALGADO, Filipe Schitini Salgado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Reconhecimento da organização de ondas sonoras em plantas: singularidade ou ubiquidade?**. Orientador: Og Francisco Fonseca de Souza. Coorientadora: Flávia Maria da Silva Carmo

Plantas respondem aos diversos estímulos ambientais por meio de alterações fisiológicas e estruturais, que podem impactar na sua sobrevivência e reprodução. Estudos anteriores sugerem que plantas da espécie *Impatiens walleriana* exibem respostas fotossintéticas diferentes quando expostas a um som da cigarra *Quesada gigas* gravado no ambiente natural e a esse mesmo som manipulado, indicando que tais plantas reconhecem diferentes padrões sonoros. Partindo disto, o objetivo desse trabalho foi testar se o reconhecimento sonoro observado em *I. walleriana* é um padrão de resposta comum à outros grupos do reino vegetal. Para testar essa hipótese, conduzimos experimentos utilizando plantas das espécies *Impatiens walleriana* (Balsaminaceae), *Asplenium nidum* (Polypodiaceae) e *Catharantus roseus* (Apocynaceae), que foram submetidas ao som natural gravado e a esse mesmo som após ter sido fragmentado e rearranjado aleatoriamente e ao som gravado no modo reverso, tendo como tratamento controle as plantas não submetidas a esses sons. Foram mensurados parâmetros fotossintéticos de troca gasosa e de fluorimetria da clorofila. Não foi verificada diferença entre os parâmetros fotossintéticos e apenas *I. walleriana* apresentou alterações nos parâmetros fluorométricos, decorrente dos tratamentos sonoros. Desta forma, os dados sugerem que o fenômeno de reconhecimento bioacústico pode estar presente neste gênero, ou mesmo família. Concluímos que experimentos futuros devem ser realizados, à fim de investigar a potencialidade do comportamento vegetal frente ao ambiente bioacústico.

ABSTRACT

SALGADO, Filipe Schitini Salgado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Recognition of the organization of sound waves in plants: singularity or ubiquity?**. Adviser: Og Francisco Fonseca de Souza. Co-adviser: Flávia Maria da Silva Carmo

Plants respond to various environmental stimuli through physiological and structural changes, which can impact their survival and reproduction. Previous studies suggest that plants of the species *Impatiens walleriana* exhibit different photosynthetic responses when exposed to a *Quesada gigas* cicada sound recorded in the natural environment and to the same manipulated sound, indicating that such plants recognize different sound patterns. From this, the objective of this work was to test if the sound recognition observed in *I. walleriana* is a common response pattern to other groups of the vegetal kingdom. To test this hypothesis, we conducted experiments using plants of the species *I. walleriana* (Balsaminaceae), *Asplenium nidum* (Polypodiaceae) and *Catharantus roseus* (Apocynaceae), which were subjected to the recorded natural sound and to that same sound after being fragmented and randomly rearranged and sound recorded in the reverse mode, having as a control treatment the plants not submitted to these sounds. Photosynthetic parameters of gas exchange and chlorophyll fluorometry were measured. There was no difference between the photosynthetic parameters and only *I. walleriana* presented alterations in the fluorometric parameters, due to sound treatments. Thus, the data suggest that the phenomenon of bioacoustic recognition may be present in this genre, or even family. We conclude that future experiments should be carried out in order to investigate the potentiality of vegetal behavior in relation to the bioacoustic environment.

Introdução

A plasticidade fenotípica é um atributo ubíquo da vida, ocorrendo em resposta à variações ambientais, como à luz, à temperatura, ao som, à pressão e às interações biológicas (Butler, 2012). Em escala evolutiva, a plasticidade fenotípica possibilita a variação dos fenótipos em resposta aos estímulos externos, permitindo que interações com o meio, antes inexistentes, sejam estabelecidas, garantindo a utilização de nichos antes inexplorados (Krebs e Davies, 2009). Em plantas, as respostas plásticas a estímulos do meio podem ser mediadas tanto por hormônios e moléculas protéicas, quanto por mecanismos físicos, como diferenças de potencial elétrico (Brenner *et al.*, 2006; Trewavas, 2005). Esse conjunto de respostas ao ambiente tem sido entendido como uma forma de inteligência.

Inteligência de plantas é um novo campo de estudo da ecofisiologia e da etologia, cujo objetivo é investigar a capacidade desses organismos de responder diferencialmente à variações ambientais (Trewavas, 2014). Tais comportamentos envolvem uma variedade de processos com importância biológica como: 1) mudanças de padrões de expressão genética dos sistemas de defesa (também conhecido como defesa induzida) e alteração da morfologia foliar, ambos observados em experimentos utilizando *Mimosa pudica* e *Dionaea muscipula* (Brenner *et al.*, 2006); 2) alterações no padrão de crescimento (gravitropismo, tigmotropismo, fototropismo, etc) e fisiológico de vegetais nos mais distintos táxons (revisão em Telewski, 2006). Estas mudanças comportamentais podem impactar o *fitness* médio das populações, apresentando implicações evolutivas (Trewavas, 2009).

Quando se trata de reconhecimento sonoro por plantas, estudos detectaram regulação da expressão gênica em vários níveis, quando as plantas foram expostas à frequências singulares específicas (Jeong *et al.*, 2008). Apesar de ainda não ser descrito o mecanismo responsável pelo reconhecimento sonoro em plantas (revisão em Gagliano *et al.*, 2012), Telewski (2006) propôs que a plasticidade fenotípica decorrente de estímulos mecânicos era ubíqua ao ponto de ser possível a existência de uma rede integrada de reconhecimento mecânico em plantas, incluindo receptores de membrana para

ondas mecânicas sonoras. Um estudo demonstrou que plantas expostas à estímulos bioacústicos (nós chamaremos qualquer som advindo de uma entidade biológica, de estímulo bioacústico, neste caso, som de mastigação de uma lagarta herbívora) aumentavam o investimento em seus mecanismos de defesa químicos, com acréscimo do níveis de glucosinolato e antocianina (Appel e Cocroft, 2014). Uma revisão sobre o perspectiva ecológica e evolutiva da polinização por abelhas, sugere que parte das angiospermas apresentam suas estruturas reprodutivas adaptadas à sonicação de abelhas (processo vibratório ocasionado pela movimentação da musculatura torácica das abelhas, com consequente liberação de pólen pela planta) (De Luca e Vallejo-Marín, 2013), sugerindo que as plantas lidam com o ambiente bioacústico há mais tempo do que o imaginado.

Trabalhos científicos demonstram a importância microevolutiva de interações entre plantas e insetos, sejam elas antagônicas ou não, como a herbivoria e a polinização (Cocroft e Rodríguez, 2005 ; Telewski 2006 ; Gagliano, 2012 ; Appel e Cocroft, 2014). Essas interações podem resultar em alterações morfológicas e fisiológicas ao longo das gerações para ambos os grupos. Quando estas mudanças ocorrem reciprocamente em tais grupos, são denominadas coevolução (revisão em Schoonhoven *et al.*, 2005). Em escala macroevolutiva, trabalhos sobre coevolução propuseram a ocorrência de especiação (Kiester *et al.*, 1984) e até mesmo radiação adaptativa de grupos inteiros de plantas e insetos (Erlich e Raven, 1964), constituindo um campo com alto potencial explicativo para evolução de comunidades biológicas.

Como citado anteriormente, as relações coevolutivas estudadas entre plantas e insetos diz respeito à espécies que interagem diretamente entre si por meio de relações antagônicas ou benéficas entre si. Entretanto, Cypriano *et al.* (submetido) descreveu um sistema onde uma espécie de planta pode estar utilizando o som de chamamento para acasalamento de uma espécie de cigarra (*Quesada gigas*) que não apresenta relação trófica ou de inquilinismo com a mesma, como pista para ajustes fisiológicos dos indivíduos em relação à alterações de condições ambientais. Isso sugere que as plantas respondem á bioacústica do ambiente, independentemente das forças de coevolução. Ainda, os dados apresentados por Cypriano *et al* (submetido) sugerem também que

os indivíduos de *I. walleriana* reconhecem e interpretam os sons e podem utilizá-los como um sinal com valor informativo sobre as condições do ambiente e, em decorrência, modificam seu fenótipo (aumento de parâmetros fotossintéticos na presença do som gravado da cigarra) de forma a se ajustar mais finamente às alterações percebidas, como luz, temperatura e umidade.

Sendo *I. walleriana* uma espécie de planta africana, de pequeno porte, adaptada a habitats sombreados e que foi introduzida no Brasil há aproximadamente 400 anos (Carney e Rosomoff, 2009), os resultados apresentados por Cypriano *et al.* suscitam incertezas se as respostas fisiológicas dos indivíduos devém do processo coevolutivo e, ainda, se essa resposta seria exclusiva da espécie, se não de plantas de subosque. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi testar as hipóteses: 1) O reconhecimento sonoro observado em *I. walleriana* é um padrão de resposta comum a outros grupos taxonômicos do reino vegetal. 2) O padrão de reconhecimento sonoro é típico de plantas de hábitat sombreado, tipicamente de sub-bosque.

Materiais e Métodos

Escolha das espécies

Para testar as hipóteses propostas foram realizados experimentos utilizando 3 espécies de plantas: *Impatiens walleriana* (Ordem: Ericales – Família: Balsaminaceae) *Asplenium nidus* (Ordem: Polypodiales – Família: Polypodiaceae) *Catharanthus roseus* (Ordem: Gentianales – Família: Apocynaceae).



Figura 1 : *Impatiens walleriana* (<http://hablemosdeflores.com/impatiens/>)



Figura 2 : *Asplenium nidus* (www.alpinenurseries.com.au/plant-library/asplenium-nidus/)



Figura 3 : *Catharanthus roseus* (www.plantingman.com/catharanthus-roseus-flowering-plants/)

A escolha dessas espécies foi guiada pelos aspectos filogenéticos e ecológicos, sendo *Asplenium nidus* uma espécie ancestral e *Catharanthus roseus*, uma espécie derivada em relação à *I. walleriana*. *I. walleriana* e *A. nidus* são plantas que habitam ambientes de sub-bosque e *C. roseus*, ambientes a pleno sol.

As informações sobre as relações filogenéticas das espécies foram obtidas da árvore filogenética apresentada na Figura 1, derivada do sistema APG4 (Angiosperm Phylogeny Group).

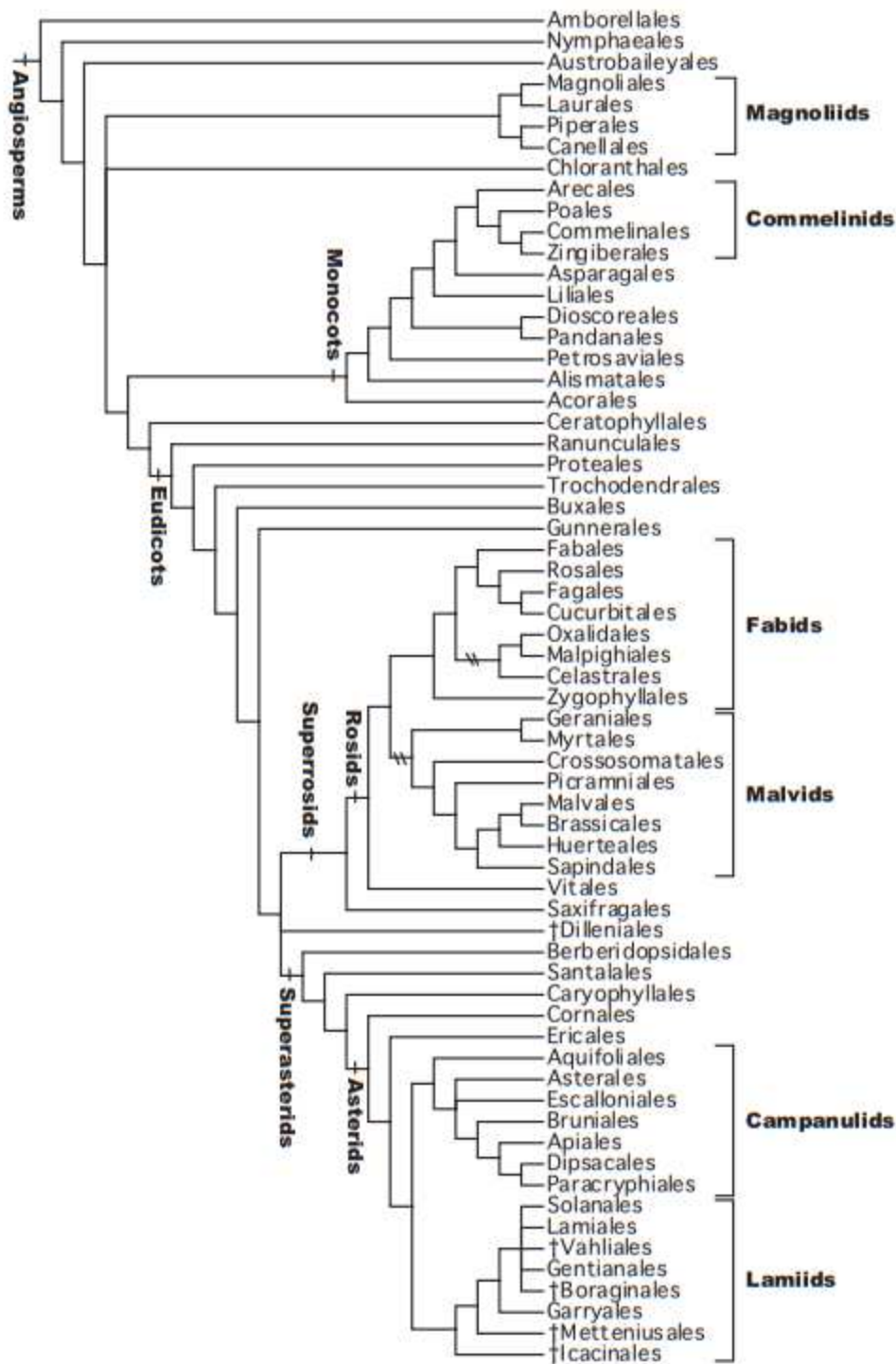


Figura 4 : Árvore Filogenética das angiospermas. Reproduzido de http://reflora.jbrj.gov.br/downloads/2016_GROUP_Botanical%20Journal%20of%20the%20Linnean%20Society.pdf.

Sobre o aspecto filogenético e assumindo que o mecanismo de reconhecimento sonoro encontrado por Cypriano *et al.* é regulado por entidades gênicas e portanto herdáveis, uma maneira de se inferir a presença

deste mecanismo em linhagens filogenéticas não abordadas neste estudo, é através da verificação da presença do mecanismo de reconhecimento em táxons basais em relação ao objeto de estudo (de Souza, 2002), neste caso o táxon basal escolhido é Ferns (*A. nidus*), obviamente não incluído na APG4.

As plantas de *C. roseus* foram obtidas a partir de sementes enquanto *I. walleriana* e *A. nidus* de mudas adquiridas no comércio local. As plantas foram transferidas e mantidas em substrato para crescimento de mudas (Tropstrato®) e mantidas em ambiente de casa de vegetação, com monitoramento das condições ambientais de luz, temperatura, umidade relativa do ar e umidade do substrato de crescimento.

Desenho Experimental

Para testar as hipóteses propostas foram realizados experimentos com quatro tratamentos, no qual plantas de cada uma das espécies foram expostas: 1) à gravação original do som ambiental com predomínio do som de chamamento da cigarra (som organizado) *Q. gigas*; 2) à gravação fragmentada e reorganizada aleatoriamente desse mesmo som (som aleatório); 3) à gravação desse mesmo som gravado no modo reverso (som invertido), e 4) ao tratamento controle, onde as plantas não foram expostas à nenhum tipo de som gravado (controle).

As modificações estruturais do som nos tratamentos 2 e 3 foram realizadas com o intuito de obter um som com a mesma capacidade de transmissão de energia mecânica que o original (som ambiental com predomínio do canto de chamamento da cigarra *Q. Gigas*), entretanto com a ausência de seu ordenamento original de frequências de ondas sonoras. Isso foi feito para testar se há reconhecimento do significado bioacústico do som, diferenciando as alterações fisiológicas observadas do simples efeito da adição de energia mecânica ao sistema biológico, por meio do som.

Os indivíduos de cada uma das espécies foram submetidos aos quatro tratamentos concomitantemente, com o intuito de evitar efeitos indesejados

decorrentes de horários distintos do dia no ciclo circadiano das plantas. Cada uma das três espécies de plantas foi submetida aos tratamentos com aproximadamente uma semana de diferença entre elas.

Os experimentos foram conduzidos em caixas acústicas com isolamento de som, auto falantes internos para a reprodução sonora e iluminação provida por fitas de LED (Figura 2), conforme Carmo *et al* (em preparação, excerto do manuscrito em anexo ao fim deste trabalho). Em cada caixa foi colocada uma planta, caracterizando a unidade experimental. Cada espécie de planta foi trabalhada separadamente de forma que enquanto em duas caixas acústicas estavam sendo reproduzidas a gravação do som original (1), outras duas estavam reproduzindo a gravação do som fragmentado (2), em outras duas a gravação do som invertido (3) e em outras duas caixas não estava sendo reproduzido nenhum som, caracterizando o tratamento controle (4). Esse procedimento foi repetido sequencialmente, caracterizando repetições verdadeiras por tratamento. Para cada tratamento foram utilizadas plantas selecionadas aleatoriamente e nenhuma planta foi submetida à mais de um tratamento.

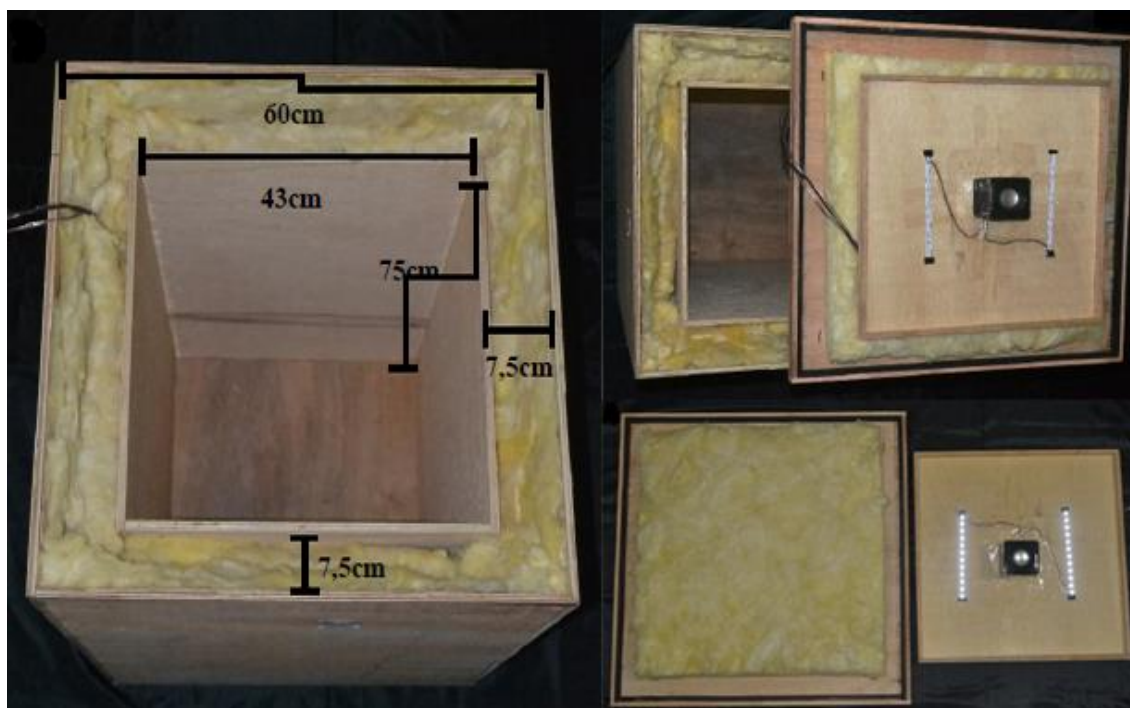


Figura 2 : Foto de uma caixa acústica indicando as respectivas dimensões da caixa externa, espaço entre caixas coberto por lã de vidro e a caixa interna. Também são apresentadas as fotos das tampas das caixas externas e internas, a tampa externa contendo revestimento acústico com lã de vidro, e a tampa interna contendo iluminação LED e um alto falante para reprodução dos tratamentos sonoros. Descrição completa no Anexo.

Avaliação da fotossíntese total

Logo após as plantas serem expostas aos tratamentos sonoros, foi avaliada a fotossíntese por meio das trocas gasosas processadas no mesófilo foliar. A taxa de fotossíntese (A) foi mensurada por meio das trocas gasosas nas folhas utilizando um IRGA (Infra Red Gas Analyser LCpro-SD portable, ADC BioScientific Ltd., com emissão de irradiância estabelecida em $600 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Inicialmente a folha foi submetida á irradiação escolhida por três minutos para aclimação e em seguida, foram feitas 5 medidas de parâmetros fotossintéticos com 15 segundos de intervalo entre cada uma. A média desses 5 valores foi considerada como o dado a ser trabalhado estatisticamente. O número amostral utilizado neste experimento foi de 32 plantas da espécie *Impatiens walleriana* (8 repetições por tratamento), 24 de

Asplenium nidum (6 repetições por tratamento) e 16 de *Catharanthus roseus* (4 repetições por tratamento).

Avaliação da fluorescência da clorofila

Para testar se os tratamentos sonoros induziram alterações na eficiência de transferência de energia no sistema fotossintético foram mensuradas a fluorescência emitida pelas moléculas de clorofila das folhas (F'), e a taxa de transporte de elétrons na cadeia de elétrons (ETR). Esses parâmetros foram mensurados utilizando um fluorômetro do tipo Junior-PAM (Walz®) com irradiância estabelecida em 127 μmol . Para obter esses dados foram selecionadas 16 plantas de *I. walleriana* (4 por tratamento), 16 plantas de *A. nidum* (4 por tratamento) e 16 plantas de *C. roseus* (4 por tratamento).

Análises dos dados

As análises estatísticas dos dados de parâmetros fotossintéticos e fluorescência da clorofila foram conduzidas no programa estatístico JMP® (JMP®, Version 14). Primeiramente foi conduzido um teste de Shapiro-Wilk para atestar a normalidade dos dados. Posteriormente, foi aplicado um teste de variância (ANOVA) aos dados para testar se existiam diferenças nos padrões fotossintéticos ou fluorométricos das plantas submetidas aos tratamentos sonoros. Constatadas diferenças entre tratamentos sonoros, o teste de Tukey HSD foi aplicado.

Resultados

Avaliação da fotossíntese total

As plantas de *I. walleriana* ($F_{(3, 35)}=2,85$; $P=0,0509$;), *C. roseus* ($F_{(3,12)}=2,1722$; $P=0,1443$) e *A. nidus* ($F_{(3, 20)}=0,3892$; $P=0,7620$) não

apresentaram diferenças estatísticas na fotossíntese total (A) após serem submetidas aos tratamentos sonoros (figuras 3,4 e 5 respectivamente). Porém, o resultado da ANOVA dos indivíduos de *I. walleriana* apresentou valor de P apenas ligeiramente acima de 5%.

Optamos por apresentar as figuras 3, 4 e 5 abaixo, que ilustram os resultados para as taxas de fotossintéticas das três espécies de plantas trabalhadas, para que seja possível visualizar as diferenças de resultados obtidos para cada uma e entre elas.

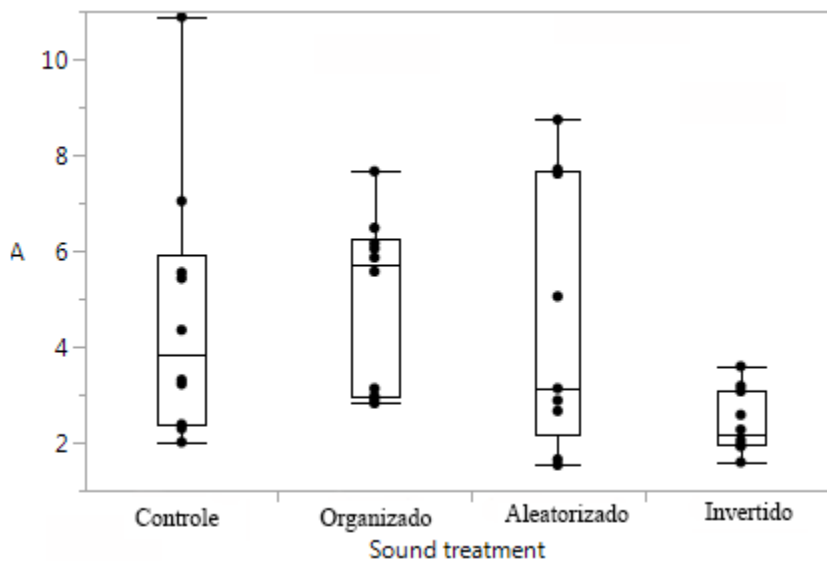


Figura 5 : Valores médios da fotossíntese total (A) de plantas de *Impatiens walleriana* submetidas aos tratamentos sonoros. Onde: Control= tratamento controle, onde as plantas não foram expostas à nenhum tipo de som gravado; Normal= à gravação original do som ambiental com predomínio do som de chamamento da cigarra (som organizado); Randomized= gravação fragmentada e reorganizada aleatoriamente desse mesmo som (som aleatório); Reverse= gravação desse mesmo som gravado no modo reverso (som invertido).

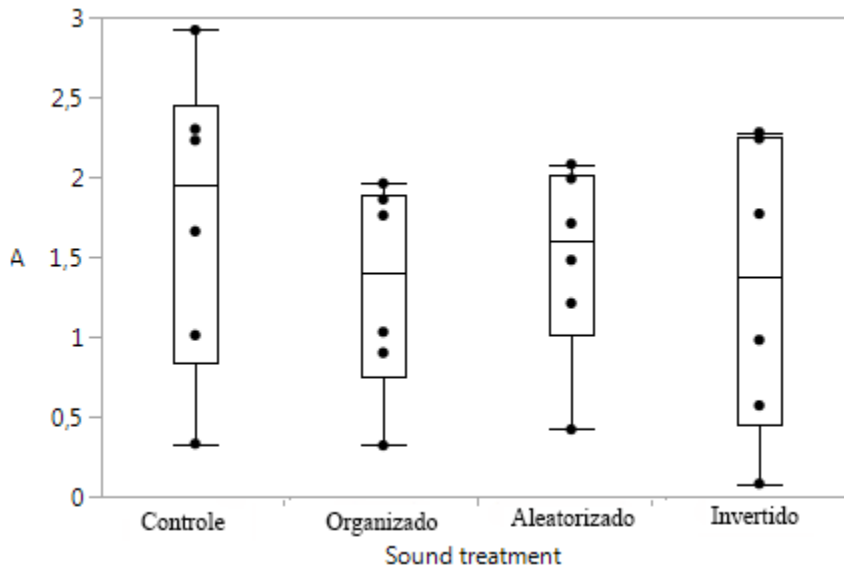
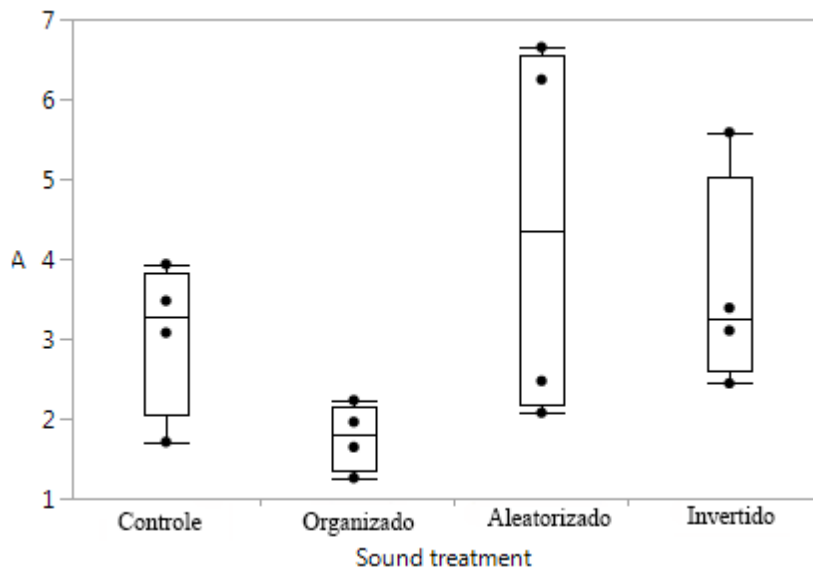


Figura 6 : Valores médios da fotossíntese total (A) de plantas de *Asplenium nidum* submetidas aos tratamentos sonoros. Onde: Control= tratamento controle, onde as plantas não foram expostas à nenhum tipo de som gravado; Normal= à gravação original do som ambiental com predomínio do som de chamamento da cigarra (som organizado); Randomized= gravação fragmentada e reorganizada aleatoriamente desse mesmo som (som aleatório); Reverse= gravação desse mesmo som gravado no modo reverso (som invertido).



A

Figura 7: Valores médios da fotossíntese total (A) de plantas de *Catharanthus roseus* submetidas aos tratamentos sonoros. Onde: Control= tratamento controle, onde as plantas não foram expostas à nenhum tipo de som gravado; Normal= à gravação original do som ambiental com predomínio do som de chamamento da cigarra (som organizado); Randomized= gravação

fragmentada e reorganizada aleatoriamente desse mesmo som (som aleatório); Reverse= gravação desse mesmo som gravado no modo reverso (som invertido).

Avaliação da fluorescência da clorofila

Para a fluorescência emitida (F') e taxa de transporte de elétrons (ETR) emitidas pelas folhas de *Impatiens walleriana* (figura 6) foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($F_{(3,12)}=4,6805$; $P=0,0218$, $F_{(3,12)}=4,6375$; $P=0,0224$, respectivamente). O tratamento com o som invertido mostrou o maior valor médio, enquanto o tratamento com o som aleatório, o menor valor médio para ambos os parâmetros fluorométricos. *Asplenium nidus* ($F_{(3,12)}=0,3178$; $P=0,8124$; $F_{(3,12)}=0,3350$; $P=0,8004$) e *Catharanthus roseus* ($F_{(3,12)}=2,7200$; $P=0,0910$; $F_{(3,12)}=2,7087$; $P=0,0919$) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos sonoros (figuras 7 e 8, respectivamente). As figuras 6, 7 e 8 abaixo ilustram os resultados descritos acima.

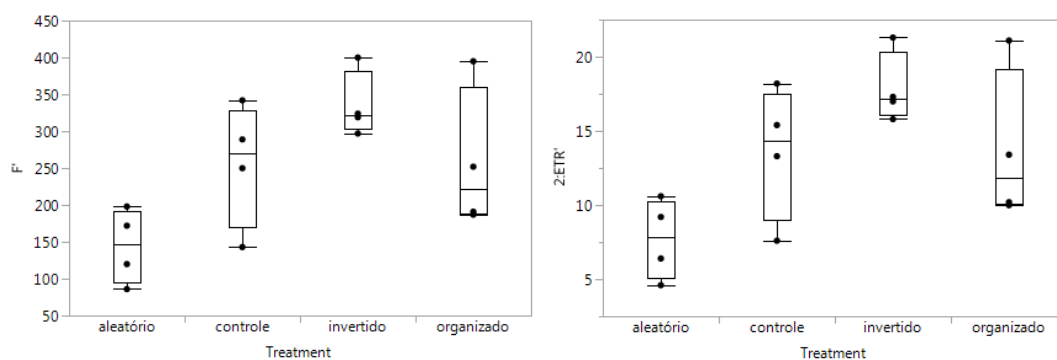


Figura 8 : Valores médios de fluorescência emitida (F') e taxa de transporte de elétrons ($2:ETR'$) de plantas de *Impatiens walleriana* submetidas aos tratamentos sonoros. Onde aleatório= gravação fragmentada e reorganizada aleatoriamente desse mesmo som (som aleatório); controle= tratamento controle, onde as plantas não foram expostas a nenhum tipo de som gravado; invertido= gravação desse mesmo som gravado no modo reverso (som invertido); organizado= à gravação original do som ambiental com predomínio do som de chamamento da cigarra (som organizado).

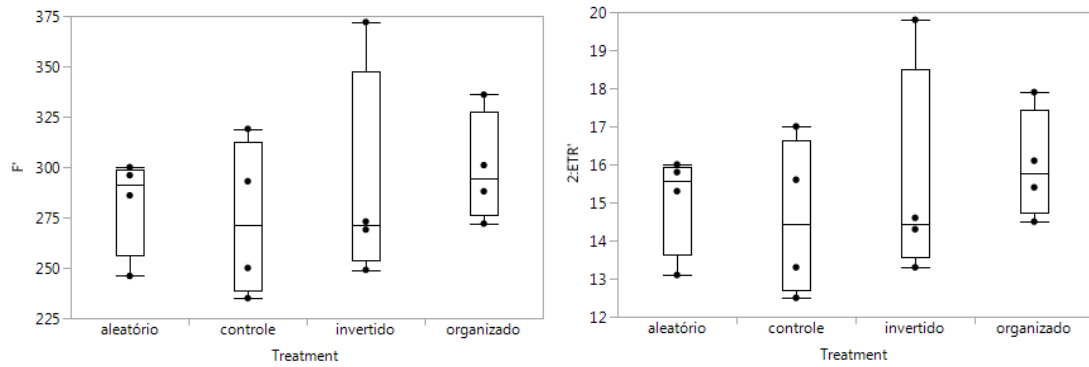


Figura 9 : Valores médios de fluorescência emitida (F') e taxa de transporte de elétrons ($2:ETR'$) de plantas de *Asplenium nidum* submetidas aos tratamentos sonoros. Onde aleatório= gravação fragmentada e reorganizada aleatoriamente desse mesmo som (som aleatório); controle= tratamento controle, onde as plantas não foram expostas à nenhum tipo de som gravado; invertido= gravação desse mesmo som gravado no modo reverso (som invertido); organizado= à gravação original do som ambiental com predomínio do som de chamamento da cigarra (som organizado).

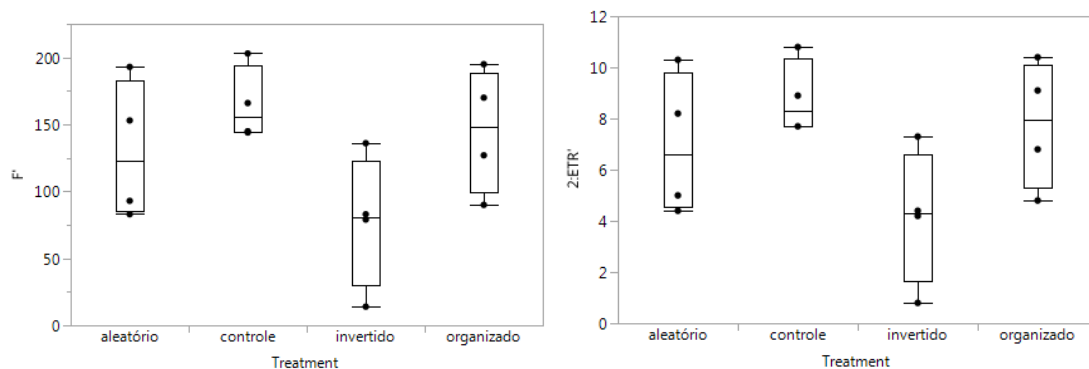


Figura 10 : Valores médios de fluorescência emitida (F') e taxa de transporte de elétrons ($2:ETR'$) de plantas de *Catharanthus roseus* submetidas aos tratamentos sonoros. Onde aleatório= gravação fragmentada e reorganizada aleatoriamente desse mesmo som (som aleatório); controle= tratamento controle, onde as plantas não foram expostas à nenhum tipo de som gravado; invertido= gravação desse mesmo som gravado no modo reverso (som invertido); organizado= à gravação original do som ambiental com predomínio do som de chamamento da cigarra (som organizado)

Discussão

Os tratamentos não ocasionaram alteração na fotossíntese total em nenhuma das três espécies investigadas. Portanto, as hipóteses propostas não foram corroboradas.

Entretanto, verificamos que as plantas de *I. walleriana* (sub-bosque) mostraram alterações na atividade (F') e na eficiência de transporte de elétrons (ETR') na fotossíntese. O mesmo não foi constatado para as plantas das espécies *Asplenium nidus* (sub-bosque) e *Catharanthus roseus* (pleno sol).

É importante ressaltar que *I. walleriana* apresentou um padrão de resposta semelhante para a fotossíntese total e para a fluorescência de clorofila, exibindo um valor de probabilidade marginalmente significativo (P=0,0509). Considerando os resultados preliminares encontrados por Cypriano *et al.* (submetido), onde foram constatadas respostas fotossintéticas das plantas de *I. walleriana* aos tratamentos sonoros, e nossos dados de parâmetros fluorométricos, podemos inferir que a espécie *I. walleriana* pode apresentar alterações fotossintéticas decorrentes dos tratamentos sonoros. Porém, essas respostas não foram encontradas no presente trabalho.

Uma possível explicação para a grande variância encontrada dentro dos conjuntos de dados de todas as plantas é a presença de artefatos da técnica adotada. Em mais de uma situação foram utilizados 2 IRGAs para coletar os dados, o que, por si só, pode representar a introdução de variações nos dados. Além disso, um dos IRGAs utilizados apresentou sinais de mal funcionamento em várias ocasiões, retornando dados muito discrepantes entre avaliações da mesma planta.

Em plantas de *I. walleriana* há um efeito negativo do tratamento som aleatorizado sobre os parâmetros F' e ETR. O motivo para isto não é claro, mas visto que herbívoros alteram o padrão de comportamento fisiológico de uma planta (War *et al.*, 2012), propomos que o som da cigarra aleatorizado possa ser reconhecido como o som de um potencial herbívoro (Appel e Cocroft, 2014), resultando em uma diminuição das atividades da clorofila, e um possível aumento nas funções relacionadas à defesa. Estudos posteriores envolvendo análises dos sistemas de defesa e/ou hormônios podem suportar esta idéia aqui proposta. Ainda sobre *I. walleriana*, notamos que ao contrário dos resultados de Cypriano *et al.*, não há aumento de parâmetros fotossintéticos quando expostas ao som original, comparativamente ao tratamento controle, evidenciando que o som da cigarra não ocasionou efeito direto nestas plantas.

O comportamento vegetal pode ser verificado através de efeitos em sua fisiologia (Brenner et al., 2006 ; Trewavas, 2005) e diferentes parâmetros fisiológicos podem ser afetados de formas distintas por um mesmo estímulo externo (Taiz e Zeiger, 2007). Desta forma, as diferenças encontradas entre os tratamentos sonoros empregados indicam um fenômeno potencialmente importante: a capacidade de reconhecimento bioacústico em plantas sob uma nova perspectiva ecológica. Somado à estes achados, estudos anteriores sugeriram que plantas tem a capacidade de reconhecimento bioacústico, quando expostas à insetos com alguma relação ecológica definida como predação e polinização (Appel e Cocroft, 2014; De Luca e Vallejo-Marín, 2013). Este cenário evidencia que plantas não só reconhecem ondas sonoras como já constatado (Jeong *et al.*, 2008 ; Telewski, 2006), mas também apresentam algum grau de reconhecimento bioacústico. Adicionalmente, o campo de inteligência de plantas tem nos fornecido exemplos de responsividade de plantas ao ambiente acústico, onde plantas respondem ao som de fatores ambientais não bióticos, como o da água, podendo direcionar o seu crescimento radicular (higrotropismo mediado por som) (Gagliano *et al.*, 2017), explicitando o grande potencial adaptativo das plantas e propondo direcionamentos consistentes para esclarecer o *modus operandi* do reconhecimento sonoro em plantas (revisão em Mishra *et al.*, 2016).

Este trabalho é o primeiro à indicar a possibilidade de plantas apresentarem distinção quanto o ordenamento da informação sonora fornecida, sugerindo mais investigações neste sentido.

Diante dos resultados apresentados aqui é levantada uma terceira hipótese, onde o comportamento de reconhecimento bioacústico, encontrado apenas em *I. walleriana*, tenha surgido neste gênero ou em alguma linhagem filogeneticamente próxima, como a sua família, Balsaminaceae. Apesar deste trabalho não abarcar o impacto ecológico deste padrão de reconhecimento, sugerimos que este mecanismo de reconhecimento bioacústico possa apresentar relevância em termos adaptativos, dado o aumento de eficiência na utilização da clorofila. Qualquer extrapolação adicional está além dos resultados encontrados neste manuscrito. Outros estudos envolvendo esta família, podem auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos no

reconhecimento bioacústico e seus impactos ecológicos, fornecendo um panorama de investigação mais adequado.

Referências

Appel, H. M. e Cocroft, R. B. Plants respond to leaf vibrations caused by insect herbivore Chewing. *Oecologia* (2014).

Butler M. Cells and sound: an introduction. *Physical Biology Articles* (2012).

Brenner E, Stahlberg R, Mancuso S, Vivanco J, Baluška F, e Van Volkenburgh E. Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling. *Trends in plant science* (2006).

Carney JA, e Rosomoff R. In the Shadow of Slavery: Africa's Botanical Legacy in the Atlantic World. University of California Press (2009).

Cocroft, RB, e Rodríguez, R. L. The Behavioral Ecology of Insect Vibrational Communication *BioScience* (2005).

Cypriano, JR. Reconhecimento de padrões sonoros por plantas: Um estudo da resposta de *Impatiens walleriana* ao canto de *Quesada gigas*. Tese apresentada ao programa de pós-graduação de Ecologia. Universidade Federal de Viçosa.

De Luca PA, e Vallejo-Marín M. What's the 'buzz'about? The ecology and evolutionary significance of buzz-pollination. *Current opinion in plant biology*, 16(4), 429-435 (2013).

de Souza AD. Fundamentos de sistemática filogenética. *Holos* (2002).

Ehrlich PR, e Raven PH. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* (1964).

Gagliano M. Green symphonies: a call for studies on acoustic communication in plants. *Behavioral Ecology* (2012).

Gagliano M, Mancuso S, Robert D. Towards understanding plant bioacoustics. *Trends in plant science*, 17(6), 323-325 (2012).

Gagliano M, Grimonprez M, Depczynski M, Renton M. Tuned in: plant roots use sound to locate water. *Oecologia*, 184(1), 151-160 (2017).

Kiester AR, Lande R, e Schemske DW. Models of coevolution and speciation in plants and their pollinators. *The American Naturalist* (1984).

Krebs JR, e Davies NB. Behavioural ecology: an evolutionary approach. John Wiley & Sons (2009).

Jeong MJ, Shim CK, Lee JO, Kwon HB, Kim YH, Lee SK e Park SC. Plant gene responses to frequency-specific sound signals. *Molecular breeding* (2008).

JMP®, Version 14. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989-2019.

Mishra RC, Ghosh R, Bae H. Plant acoustics: in the search of a sound mechanism for sound signaling in plants. *Journal of experimental botany*, 67(15), 4483-4494 (2016).

Schoonhoven LM, Van Loon JJ, e Dicke, M. Insect-plant biology. Oxford University Press on Demand (2005).

Taiz L, Zeiger E. Fisiologia vegetal (Vol. 10). Universitat Jaume I (2007).

Telewski FW. A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *American journal of botany* (2006).

Trewavas A. Green plants as intelligent organisms. *Trends in plant science* (2005).

Trewavas A. What is plant behaviour?. *Plant, cell & environment* (2009).

Trewavas A. Plant behaviour and intelligence. OUP Oxford (2014).

War AR, Paulraj MG, Ahmad T, Buhroo AA, Hussain B, Ignacimuthu S, Sharma HC. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant signaling & behavior*, 7(10), 1306-1320 (2012).

Anexo

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 12 cm 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).

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.

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.

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