

**Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho"
Instituto de Biociências UNESP –IBB - Campus de Botucatu**

EVIDÊNCIAS DE COMUNICAÇÃO RADICULAR INTRAESPECÍFICA EM CONDIÇÕES DE DÉFICE LUMINOSO

Victor Hugo Guimarães Mariusso

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas – Botânica do Instituto de
Biociências de Botucatu, UNESP, como
parte dos requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (Botânica), Ecofisiologia Vegetal.

Botucatu - SP
NOVEMBRO 2022

Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho"
Instituto de Biociências UNESP –IBB - Campus de Botucatu

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Biociências de Botucatu

EVIDÊNCIAS DE COMUNICAÇÃO RADICULAR INTRAESPECÍFICA EM
CONDIÇÕES DE DÉFICE LUMINOSO

Victor Hugo Guimarães Mariusso

Prof. Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas – Botânica do Instituto de
Biociências de Botucatu, UNESP, como
parte dos requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (Botânica), Ecofisiologia Vegetal.

Botucatu-SP, 2022

Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho"
Instituto de Biociências UNESP –IBB - Campus de Botucatu

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Mariusso, Victor Hugo Guimarães.

Evidências de Comunicação Radicular Intraespecífica em
Condições de Défice Luminoso / Victor Hugo Guimarães
Mariusso. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Luiz Fernando Rolim de Almeida
Capes: 20303009

1. Plantas - Fisiologia. 2. Ervilha. 3. Estresse
oxidativo. 4. Exsudatos de plantas.

Palavras-chave: Comunicação em plantas; Estresse oxidativo;
Exsudatos radiculares; *Pisum sativum*.

Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho"
Instituto de Biociências UNESP –IBB - Campus de Botucatu

*"After sleeping through a hundred million centuries
we have finally opened our eyes on a sumptuous planet,
sparkling with colour, bountiful with life. Within decades we
must close our eyes again. Isn't it a noble, an enlightened
way of spending our brief time in the sun, to work at
understanding the universe and how we have come to wake
up in it? This is how I answer when I am asked – as I am
surprisingly often – why I bother to get up in the mornings."*

-Richard Dawkins, in *"The Greatest Show on Earth"*.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela cessão da bolsa de estudos, sem a qual não me teria sido possível concluir este projeto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida, pelo apoio, por me ouvir, e por ter se disposto a me auxiliar na transformação destas elucubrações em realidade.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" e ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Botânica por ter me acolhido em seu seio; aos funcionários da seção de pós-graduação, por sua atenção às diversas demandas que surgiram ao longo do mestrado; aos funcionários do Departamento de Bioestatística, Biologia Vegetal, Parasitologia e Zoologia, em especial Heloísa e Inara, por sua solicitude e apoio.

Aos professores: Prof^a Dr^a Angélica, Prof. Dr. Felipe Giroto e Prof^a Dr^a Elizabeth Orika Ono, Prof. Dr. Fernando Ferrari Putti, Prof^a Dr^a Giuseppina Lima Pace e Prof^a Dr^a Letícia Silva Pereira Basílio, por seus inestimáveis aportes a este projeto. Sem sua colaboração, sua realização não teria sido possível.

Aos colegas de departamento e laboratório: Juan Nicolai, Karla de Deus Bento, Rafael Seraphim, Gustavo Barzotto, Mateus Filiol Belin, Priscila Pegorin, e João Henrique Maia, pelo apoio, incentivo e amizade.

Às três mulheres da minha vida: minha mãe Rose Guimarães, pelo incondicional e inabalável suporte; à minha irmã Raphaella Guimarães, por me lembrar que sempre há aqueles que se espelham em nosso exemplo; e à minha companheira Vanessa Oliveira, pela constância, paciência e apoio nas dificuldades e momentos de incerteza. Às três que, por amor, acreditaram em mim quando nem mesmo eu acreditei.

A Alexandra Asanovna Elbakyan, por seu abnegado, desinteressado e muitas vezes subapreciado esforço na luta pela democratização do acesso à Ciência. *Spasibo, tovarish!*

SUMÁRIO

<u>RESUMO</u>	7
<u>ABSTRACT</u>	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. <i>Hipótese</i>	13
1.2. <i>Justificativa</i>	13
1.3. <i>Objetivos</i>	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	
2.1. <i>Caracterização do Modelo Experimental</i>	14
3. RESULTADOS	
3.1. <i>Trocas Gasosas</i>	24
3.2. <i>Fluorescência da Clorofila a</i>	26
3.3. <i>Atividade Antioxidante</i>	30
3.4. <i>Análise dos Componentes Principais</i>	31
4. DISCUSSÃO.....	34
5. CONCLUSÃO.....	39
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	40

LISTA DE ABREVIATÓES

ERO: espécies reativas de oxigênio

CI: grupo controle individual

CC: grupo comunicado claro

CE: grupo comunicado escuro

EXPC: grupo experimental claro

EXPE: grupo experimental escuro

CO₂: dióxido de carbono

IRGA: analisador de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* por radiação infravermelha

E: taxa de transpiração

g_s: condutância estomática

A: taxa de assimilação líquida de CO₂

C_i: concentração interna de carbono

EUA: eficiência do uso da água

ETR: taxa de transporte de elétrons

qP: dissipação fotoquímica

ΦPSII: rendimento quântico do fotossistema II

NPQ: dissipação não-fotoquímica

B.O.D.: *biochemical oxygen demand*, estufa incubadora de sementes

dH₂O: água destilada

μS/cm: microsiemens por centímetro, medida de condutância elétrica

F_v/F_m: eficiência quântica fotoquímica máxima do fotossistema II

FRAP: *Ferric Reduction Ability of Plasma* (Habilidade Plasmática de Redução Férrica). Método de aferição de atividade antioxidante.

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). Método de aferição de atividade antioxidante.

MDA: Malondialdeído. Método de quantificação de danos à membrana plasmática.

DPPH: 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil. Método de aferição de atividade antioxidante.

Evidências de Comunicação Radicular Intraespecífica em Condições de Déficit Luminoso

Resumo – Plantas são organismos sésseis e processos cognitivos tais como aprendizado, memória e tomada de decisões são essenciais para que suportem estímulos ambientais estressantes, sendo críticos para sua sobrevivência e sucesso reprodutivo. O conhecimento atual sobre sensoriência, memória e aprendizado em plantas sugere que estas são dotadas de um nível de cognição que lhes possibilita emitir, receber e processar informações acerca do ambiente, ajustando-se conforme necessário, em face a (ou em antecipação a) condições adversas. O presente estudo visou obter evidências da comunicação radicular e sua contribuição para atenuar o déficit luminoso de indivíduos adjacentes, entre plantas de *Pisum sativum* L. O experimento consistiu em comunicar as raízes de pares de *P. sativum* em solução nutritiva, submetendo uma das plantas do par a déficit luminoso, garantindo à outra planta luz abundante. Prognosticamos que a planta sob déficit luminoso seria capaz de comunicar sua condição estressante à sua companheira (por meio de espécies reativas de oxigênio resultantes do déficit luminoso, exsudados via sistema radicular), o que elicitaria resposta fisiológica, resultando na exsudação de compostos orgânicos que propiciem a sobrevivência da planta estressada. Os dados das variáveis fisiológicas relativos à capacidade, estabilidade e eficiência fotossintética (condutância estomática, concentração interna de carbono, assimilação líquida de carbono, fluorescência da clorofila *a*, dissipação fotoquímica e não-fotoquímica, além de atividade antioxidante) das plantas comunicadas em condição de sombra foram comparados aos dos grupos controle. Desta maneira, foi possível estabelecer correlações entre danos decorrentes do déficit luminoso, exsudação de espécies reativas de oxigênio, e melhor performance de plantas comunicadas, resultando em chance de sobrevivência aumentada, quando em comparação com plantas isoladas ou comunicadas com outro indivíduo sem acesso à luz. Estes achados permitem inferir o estabelecimento de comunicação planta-planta pelo sistema radicular, resultando em maior capacidade de resistir ao estresse oxidativo causado pelo déficit luminoso.

Palavras-chave: comunicação em plantas; déficit luminoso; estresse oxidativo; exsudatos radiculares; *Pisum sativum*

Evidences of Intraspecific Communication Through the Root System Under Light Deficit Conditions

Abstract – Plants are sessile organisms, and cognitive processes such as learning, memory and decision-making are essential for them to withstand stressful environmental stimuli, and are critical for their survival and reproductive success. Current knowledge about sentience, memory and learning in plants suggests that they are endowed with a level of cognition that enables them to emit, receive and process information about their environment, adjusting as necessary when faced with (or in anticipation of) adverse conditions. The present study aimed to obtain evidence of radicular communication and its contribution to alleviate the oxidative damage caused by light deficit in adjacent individuals of *Pisum sativum* L. The experiment consisted in communicating the roots of pairs of *P. sativum* in nutritive solution, submitting one of the plants of the pair to luminous deficit, ensuring access to light to the other plant of the pair. We predicted the plant under light deficit would be able to communicate its stress to its companion (through reactive oxygen species resulting from light deficit, exuded via the root system), which would elicit a physiological response, resulting in the exudation of organic compounds that propitiate the survival of the stressed plant. Data related to the physiological parameters related to the photosynthetic ability, stability, and efficiency (stomatic conductance, internal carbon concentration, net carbon assimilation, chlorophyll fluorescence, photochemical and non-photochemical quenching, as well as antioxidant activity) of communicated plants under luminous deficit have been compared to those of the control groups. This allowed to establish correlations between damage due to oxidative stress caused by light deficit, exudation of reactive oxygen species, and better performance in communicated plants, resulting in increased chance of survival, when compared with isolated plants or plants communicated with another individual without access to light. These findings suggest the triggering of plant-plant communication through the root system, which resulted in enhanced capacity of resisting to the oxidative stress caused by light deficit.

Keywords: plant communication; light deficit; oxidative stress; root exudates; *Pisum sativum*.

INTRODUÇÃO

Plantas são organismos sésseis e, devido a isso, processos cognitivos tais como aprendizado, memória e tomada de decisões são essenciais para permitir-lhes suportar diversos estímulos ambientais, sendo críticos para sua sobrevivência e sucesso reprodutivo (BALUŠKA; WITZANY, 2018). Consoante os estresses abióticos experimentados, as plantas são capazes de desencadear processos de síntese de proteínas, enzimas e reguladores químicos, cuja ação resulta em ajustes morfológicos e/ou anatômicos (ZHU, 2016) que as guarnecem de mecanismos que lhes permitam aclimatar-se e tolerar as mudanças ambientais e os estresses acarretados.

Estes mecanismos tomam, muitas vezes, a forma de ajustes morfofisiológicos que conferem aos vegetais maior *fitness* adaptativo. A estes ajustes, chamamos de maneira abrangente, plasticidade fenotípica. Esta, por sua vez, está assentada em modificações de origem epigenética, bem como na modulação e controle epistático da expressão gênica (VIA et al., 1995). Frequentemente, as respostas aos estímulos ambientais tomam a forma de comportamentos motores, através dos quais – a despeito de sua sessilidade – as plantas movem ativamente seus órgãos, e utilizam-se destes movimentos para a manipulação ativa de seu ambiente, tanto abiótico como biótico (BALUŠKA, 2018). Estes comportamentos estão diretamente vinculados ao aprendizado e à memória das plantas, uma vez que as plantas são capazes de comparar estímulos ambientais (tanto bióticos como abióticos) com memórias de eventos anteriores (CALVO, 2017; MICHMIZOS, 2018; WITZANY, 2018; DEMONGEOT, 2019).

O conhecimento mais recente sob o escopo da senciência, memória e aprendizado de plantas, afirma que as plantas são dotadas de um nível de cognição tal, que seria possível condicionar-lhes o comportamento, em um análogo dos experimentos de condicionamento clássico do fisiologista russo Ivan Pavlov em etologia animal (1897). De acordo com Gagliano et al. (2016), é possível o aprendizado associativo e o condicionamento comportamental, utilizando-

se de estímulos condicionantes para influenciar o fototropismo em plantas de *Pisum sativum*. Os autores concluíram que plantas são capazes de aprendizado por associação, uma vez que associaram a presença de um estímulo neutro (ventiladores) à chegada iminente de um recurso limitante (luz). Desta forma, apresenta-se com clareza a noção de que plantas são seres sencientes, capazes de manipular por volição própria seu ambiente, através de ações munidas de propósito, baseadas na avaliação das condições ambientais, e por meio de comparações com suas memórias e aprendizado prévio (GAGLIANO, 2018). A medida da influência de estímulos ambientais – tanto bióticos como abióticos – o comportamento, a morfologia e respostas fisiológicas é vastamente documentada na literatura, seja pela mera presença de indivíduos da mesma espécie nas proximidades, seja pela introdução de estímulos mecânicos (ELHAKEEM et al., 2018). Vegetais apresentam nível de senciência tal que, a partir de sua interação com o ambiente e segundo as informações coletadas, podem passar a alterar processos e comportamentos de modo a garantir sua sobrevivência (JACOB et al., 2017). São capazes não apenas de “manipulação” física do ambiente (por meio de órgãos, como gavinhas), como também química, através da exsudação de compostos através de seu sistema radicular, a fim de alterar as características do substrato (ANGERS, 1998; MARSCHNER, 2008; WEN, 2022)

Uma vez estabelecida a senciência em plantas, levanta-se a indagação acerca de sua capacidade de comunicação. Esta pode ser considerada um comportamento que provê informações de um emissor a um receptor, de maneira a provocar respostas neste último (KARBAN, 2015).

Farmer et al. (1990), determinaram que uma forma de comunicação interplantas ocorre através da dispersão de metil jasmonato pelas folhas de *Artemisia tridentata*, afetando a acumulação de inibidores de proteinase em plantas de tomate, demonstrando comunicação vegetal interespecífica, e atuando na ativação da expressão de genes envolvidos na resposta defensiva à herbivoria. Da mesma maneira, há evidências de comunicação planta-planta através da introdução do Metil-Jasmonato, desencadeando a alteração de padrões fisiológicos (OLIVEIRA, 2019). Em

2018, Caparrotta et al. corroboraram que plantas são capazes de comunicar a outras o fato de estarem passando por condições estressantes, e que as receptoras captam e interpretam estes sinais, adaptando-se fisiologicamente para a iminência daquelas condições, preparando-se para quando venham a concretizar-se. A este processo de preparação, chamamos *priming*. Em experimentos com plantas de *Vicia faba*, um grupo de plantas (emissoras) foi submetido a altos níveis de salinidade. O grupo de plantas receptoras demonstrou estar melhor preparado para resistir às condições menos que ideais causadas pela introdução do estressante, por ter captado compostos orgânicos volatilizados emitidos pelas plantas estressadas adjacentes (CAPARROTTA et al., 2018). A comunicação planta-planta via exsudatos radiculares pode, além disso, afetar de maneira profunda a maneira como o vegetal interage com o ambiente, mediando a detecção e o comportamento das raízes, propiciando o reconhecimento de parentesco com indivíduos próximos, desencadeando a alteração da alocação de biomassa, ou mesmo antecipando ou retardando a floração (JACOB et al., 2017; WANG, 2020).

Enquanto organismos fotossintetizantes, as plantas dependem substancialmente de acesso à luz para seu crescimento e desenvolvimento (FANKHAUSER, 1997). Portanto, a introdução de estímulos negativos como a redução do acesso à luminosidade deverá desencadear respostas fisiológicas nos vegetais em questão, tal como o fechamento estomático, e ocasionará danos nos centros de reação do fotossistema II (KIM, 1993), que em conjunto acarretarão a redução da eficiência fotossintética, baixo crescimento e produtividade, acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) e, eventualmente, a morte do vegetal (TRIPATHY, 2012; PASCUAL, 2017; HASANUZZAMAN, 2020).

Sendo estes mecanismos sabidamente desencadeados pela síntese e movimentação de íons, fotoassimilados e hormônios vegetais entre organelas, células e tecidos no interior da planta, é plausível inferir que parte destes compostos terminem sendo exsudados para a solução nutritiva através das células do sistema radicular, sendo disponibilizados para absorção ou ligação a sítios

específicos na membrana plasmática de células radiculares de plantas adjacentes (VENTURI, 2016). Este expediente permitiria à planta receptora ter acesso às informações emitidas pela planta estressada. Da mesma forma, células e tecidos da planta receptora deverão reagir aos compostos absorvidos, desencadeando a síntese de outros compostos que se deslocarão por seus tecidos, podendo ser, também, liberados na solução nutritiva, podendo ser absorvidos pela planta estressada (DICKE, 2001).

À luz destes achados, depreendemos que uma comunicação efetiva entre duas plantas, seja intra ou interespecífica, poderá ocorrer, e não apenas em um sentido (do emissor para o receptor), mas sim em ambos os sentidos, como num diálogo (do emissor para o receptor e de volta ao emissor inicial). Isto permitirá que uma planta emissora comunique sua situação de estresse, propiciando a síntese e emissão de compostos orgânicos por parte do receptor (FALIK, 2011). Por sua vez, o emissor inicial apresentará respostas induzindo processos fisiológicos fotoprotetivos, como a síntese e ativação de enzimas cuja ação proteja contra danos ocasionados por estresse oxidativo resultante do déficit luminoso (SHARMA, 2012).

Assim, a planta receptora teria condições de exsudar através de seu sistema radicular compostos orgânicos (como carboidratos, enzimas e hormônios vegetais) que poderão ser captados pelas plantas estressadas, em cujos organismos estes atuarão na resistência ao estresse oxidativo e à privação de energia devidos à incapacidade de sintetizar seus próprios fotoassimilados (ZHU, 2017). Esta transferência de moléculas poderá ser detectada através da medição de suas concentrações no substrato ou em solução nutritiva (SIMARD, 1997; TESTE et al., 2009, COPPOLA, 2017). Desta maneira, plantas submetidas à escassez luminosa serão capazes de comunicar seu estresse a plantas próximas e estas, por sua vez, emitirão compostos orgânicos na solução nutritiva, auxiliando na manutenção da planta em déficit luminoso. Isto desencadeará respostas fisiológicas nas plantas receptoras, que se utilizarão dos fotoassimilados disponibilizados

para suprir a demanda energética e manutenção da homeostase, ajustando-se à pouca luz disponível (ŠIMPRAGA, 2016; NOROUZITALLAB, 2018).

Hipótese

A comunicação planta-planta via sistema radicular (e a contribuição desta para a resposta ao estresse oxidativo em plantas submetidas a déficit luminoso) aumentará a probabilidade de sobrevivência destas.

Justificativa

A investigação de plantas submetidas a déficit luminoso e suas respostas aos estímulos ambientais experienciados servirá como ferramenta para a compreensão dos mecanismos que permitem a comunicação, aprendizado e memória em plantas. Estabelecer a relação entre estímulos ambientais ou oriundos de plantas adjacentes, e as subsequentes respostas fisiológicas ampliará o conhecimento atual acerca da cognição, aprendizado, memória e comunicação em plantas, associando de maneira interdisciplinar e abrangente três aspectos do organismo que, em geral, são analisados por separado: a morfologia, a fisiologia e as relações ecológicas, numa abordagem global dos fenômenos observados. Por se tratar de tema relativamente recente e moderadamente exíguo em literatura, as hipóteses aqui levantadas, os experimentos propostos e seus respectivos resultados, visam aportar sua contribuição à compreensão destes comportamentos e de suas origens, posto que ainda foram completamente elucidados.

OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são:

1. Avaliar a comunicação entre plantas a partir do estresse luminoso. Para tanto, comparamos os parâmetros fisiológicos de plantas de *Pisum sativum* L., tanto em condições ótimas de crescimento, como submetidas a déficit luminoso;
2. Determinar se plantas submetidas a déficit luminoso em contato radicular com plantas com acesso à luz apresentam melhor performance em parâmetros fisiológicos, tais como captação e absorção de CO₂, rendimento fotossintético, ativação dos mecanismos de fotoproteção, além de capacidade de resposta a estresse oxidativo, em comparação com plantas simplesmente submetidas a déficit luminoso sem comunicação com plantas com acesso à luz;
3. Comparar os parâmetros fisiológicos dos grupos, visando avaliar a medida da influência do estímulo estressante e da comunicação sobre a resposta ao estresse oxidativo.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização do modelo experimental

As plantas escolhidas como objeto do presente estudo foram as ervilhas, variedade de vagem torta e flor roxa (*Pisum sativum* L. var. *Saccharum*). Esta espécie foi escolhida devido à rapidez de sua germinação e crescimento, seu curto ciclo de vida, e por já ter sido empregado em experimentos de aprendizagem e condicionamento comportamental com sucesso (GAGLIANO, 2018). Trata-se de planta herbácea anual ou perene (segundo sua variedade), pertencente à família Fabaceae, de metabolismo C₃. Originária do Oeste Asiático e Mediterrâneo, é tradicionalmente cultivada há milênios em climas frios a temperados devido à sua grande resistência ao estresse

hídrico. É atualmente a quarta maior safra (em toneladas) do planeta, sendo seu maior produtor a República Popular da China (PAVEK, 2012; SMÝKAL, 2016; HOLDSWORTH et al, 2017; ZHAO, 2020). Sua sensibilidade a variações de temperatura e irradiação luminosa também a tornam o objeto ideal para o experimento proposto (OLLE, 2017).

Os experimentos foram montados segundo o delineamento Inteiramente Casualizado (ou Planejamento Completamente Aleatorizado), uma vez que é considerado ideal para condições de total homogeneidade, como é o caso de experimentos conduzidos em condições controladas. Foram conduzidos no Departamento de Bioestatística, Biologia Vegetal, Parasitologia e Zoologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, tanto no Laboratório de Ecofisiologia, como em casa vegetativa de climatização Pad-Fan. As condições ambientais da casa de vegetação foram controladas e mantidas constantes: temperatura entre 23°C a 25°C, luminosidade 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (densidade de fluxo fotônico fotossinteticamente ativo – DFFF), e umidade relativa do ar entre 50% a 75%.

De modo a propiciar a ocorrência de comunicação interplantas, os indivíduos foram divididos em cinco grupos, correspondentes aos cinco tratamentos a que foram submetidas:

- Grupo Controle Individual (CI), composto de plantas individuais com acesso à luz;
- Grupo Comunicado Escuro (CE), composto de plantas com raízes comunicadas, sem acesso à luz;
- Grupo Comunicado Claro (CC), formado por plantas com raízes comunicadas, com acesso à luz;
- Grupo Experimental Escuro (EXPE), composto de plantas submetidas a déficit luminoso, cujas raízes se encontraram inseridas no mesmo recipiente e solução nutritiva que suas contrapartes com acesso à luz;
- Grupo Experimental Claro (EXPC), composto de plantas com acesso irrestrito à luz, cujas raízes estarão em comunicação com as plantas do EXPE.

Após a condução de quatro experimentos piloto, nos quais a germinação, desenvolvimento e crescimento esperados do objeto foram observadas, passamos à montagem do experimento desenvolvido para os propósitos do presente estudo. As sementes foram obtidas junto à fornecedora comercial Isla Sementes, sendo desprovidas de qualquer tratamento químico prévio. Após observação do comportamento da *Pisum sativum*, foram colocadas 80 (oitenta) sementes de *P. sativum* nas condições descritas anteriormente, em rolos de papel filtro embebidos em dH₂O contendo oito sementes cada. Ao cabo de apenas três dias já se observavam os primeiros sinais de germinação (*i.e.*: emissão da radícula). Atingida a marca dos sete dias, observou-se taxa de germinação de 100%, embora em estágios diferentes. A maioria das sementes (80%) germinou até os três dias, enquanto as demais o fizeram entre o quinto e o sétimo dia. Para a montagem do experimento, plantas jovens de no mínimo de 7 cm de comprimento foram selecionadas para que cada planta individual permanecesse ereta de maneira independente, e com suas raízes em contato com a solução nutritiva. Catorze dias após a germinação, as plantas foram transferidas para a casa de vegetação, aleatorizadas para cada tratamento (KIM, 2014), e alocadas nos seus respectivos recipientes, a saber: cinco plantas destinadas ao grupo CI, 10 plantas destinadas ao grupo CC, 10 plantas destinadas ao grupo CE, cinco plantas destinadas ao grupo EXPC, e outras cinco ao grupo EXPE, totalizando 35 (trinta e cinco) indivíduos ($n=35$).

Para o substrato, a solução nutritiva selecionada foi a de Hoagland, segundo o protocolo modificado do original de Hoagland e Arnon (1950), por Munns (2017), o que facilitaria a prospecção de eventuais exsudatos. Os recipientes escolhidos foram plásticos retangulares com tampa, medindo 11 cm (c) x 7 cm (l) x 10 cm (p), com volume total de 550 ml. Às tampas, foram afixados um ou dois (segundo o grupo) *netpots* (Fig. 1): pequenos cestos vazados medindo 6 cm de altura, 5 cm de diâmetro superior, que se afunilam em direção à base, de 3,7 cm de diâmetro. Às tampas também adicionamos um pequeno orifício para permitir a passagem das cânulas do aerador, de modo a oxigenar e impedir a estagnação da solução nutritiva.



Fig. 1: Netpots afixados à tampa do recipiente.

As plantas dos grupos Experimental Escuro e Experimental Claro foram alocadas aos pares, uma planta de cada tratamento por recipiente formando um complexo experimental, possibilitando a comunicação radicular. Os indivíduos tiveram suas raízes introduzidas em dH₂O e, durante um período de 30 dias, foram mantidos sem a introdução dos tratamentos ou de solução nutritiva, permitindo sua aclimação ao ambiente. Durante o experimento, evidenciamos a sensibilidade das plantas de *P. sativum* ao excesso de concentração de solutos em estágios iniciais de seu desenvolvimento. Assim, foi necessária a introdução paulatina da solução nutritiva, aumentando-se gradativamente sua condutividade, partindo dos 0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (dH₂O), até atingir os 450-470 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (solução nutritiva de Hoagland, força iônica de ~25%).

A cada grupo coube um tratamento, conforme descrito anteriormente. Assim, a cada um destes foi necessário acrescentar limitadores de luminosidade. Nos grupos Controle Individual e Comunicado Claro, não houve acréscimos (Fig. 2). O grupo Comunicado Escuro foi envolvido

por uma caixa de papelão revestida de papel alumínio, medindo 50 cm de altura a partir da tampa do recipiente, de modo a permitir que as plantas crescessem em seu interior (Fig.3). Os grupos Experimental Claro e Experimental Escuro, apesar de compartilharem o mesmo recipiente e a mesma solução nutritiva, foram submetidos a tratamentos de luminosidade distintos: as plantas do grupo Experimental Escuro foram inseridas em tubo PVC marrom opaco de 50 cm de altura a partir da tampa do recipiente, restringindo o indivíduo a crescer dentro deste (Fig.4). Tanto a caixa do grupo Comunicado Escuro, como o tubo do grupo Experimental Escuro foram encimados por uma camada de tela de sombreamento (taxa de sombreamento 90%), para impedir envolvendo toda a base do recipiente, uma vez que não são totalmente opacos. a entrada de luz pela abertura superior e, ainda assim, permitir trocas gasosas. Os grupos Comunicado Escuro e Experimental Escuro também receberam uma camada de papel alumínio



Fig. 2: Grupos IC e CC (recipientes azuis e rosa), sem adições de limitação luminosa.

Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho"
Instituto de Biociências UNESP –IBB - Campus de Botucatu



Fig. 3: Grupo CE, inserido em caixas de papelão cobertas por papel alumínio e tela de sombreamento.



Fig. 4: Pares de indivíduos do complexo experimental. Indivíduo do EXPC (crescendo livremente), e EXPE (inseridos em tubos).

Durante o decorrer do experimento, foram coletados dados relacionados aos parâmetros de trocas gasosas, fotoproteção, eficiência fotossintética e fluorescência da clorofila *a* de todos os indivíduos, empregando-se para tal o IRGA, equipamento de sistema aberto de fotossíntese com analisador de CO₂ e vapor d’água por radiação infra-vermelha, com fluorômetro acoplado, com pulso de luz actínica de 4500µmol m⁻² s⁻¹ (*Infrared Gas Analyser*, modelo GSF-3000, Array/PAM-Fluorometer 3055-FL, Walz, Alemanha), a intervalos determinados (Fig. 5), entre os dias 8 e 24 de Abril de 2022.

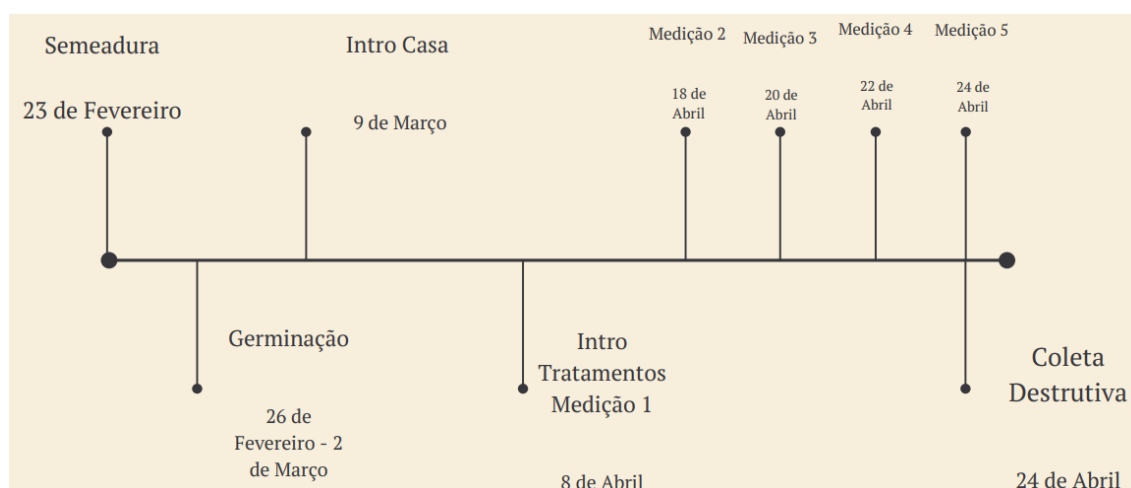


Fig. 5: Cronologia do experimento, da semeadura à coleta destrutiva, contendo as datas de avaliação dos tratamentos.

Após a introdução dos tratamentos descritos anteriormente, um período de aclimação de 5 dias foi estabelecido e os intervalos entre as medições fixado em dois dias. Devido a condições meteorológicas desfavoráveis ao funcionamento do IRGA, o intervalo entre a primeira medição (dia 0) e a segunda (dia 10) foi prolongado para dez dias ao todo. A cada medição, selecionamos ao acaso quatro indivíduos por grupo, e nestes conduzimos as medições em duas folhas maduras e visivelmente saudáveis, e com área mínima do limbo foliar de 8cm². Estas dimensões foram selecionadas devido a ser esta a medida mínima necessária para cobrir completamente o campo de testes do equipamento utilizado. Desta maneira, quatro repetições por grupo foram utilizadas,

sendo coletados tanto os dados relativos à fluorescência da clorofila *a*, como aqueles relativos às trocas gasosas, em cada uma das repetições. Em preparação para a coleta dos dados de fluorescência, as folhas selecionadas foram previamente envolvidas em papel alumínio, e assim mantidas por 30 minutos antes da realização das medições. Nos grupos que já se encontravam submetidos ao déficit luminoso, este processo não se fez necessário.

Após o término da aferição das variáveis de trocas gasosas e fotossíntese, procedemos à coleta dos tecidos dos indivíduos, tendo sido separados segundo seus tratamentos, e divididos em folhas, raízes e caules. Cada uma das partes dos indivíduos foi acondicionada em tubos de fundo cônico e imediatamente congeladas empregando nitrogênio líquido, sendo posteriormente conservados em freezer a -20°C.

Dentre os dados relacionados às relações hídricas e trocas gasosas obtivemos a condutância estomática (g_s , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração interna de carbono (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$), taxas de assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e transpiração (E , $\text{mmol vapor d'água m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Para a fluorescência da clorofila *a*, realizamos as medições de eficiência quântica fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m), taxa de transporte de elétrons (ETR), dissipação fotoquímica (*quenching* fotoquímico – qP) e não-fotoquímico (*quenching* não-fotoquímico – NPQ), a partir das quais foi possível calcular o rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{PSII}).

Os tecidos foram submetidos a análises bioquímicas para a detecção e quantificação dos componentes principais da atividade antioxidante, através dos métodos de detecção de fenóis totais (SINGLETON, 1965), flavonoides totais (AWAD, 2000), ABTS (RE, 1999), MDA (HEATH, 1968), FRAP (BENZIE, 1996) e DPPH (BRAND-WILLIAMS, 1995).

Os dados obtidos da análise de trocas gasosas e de parâmetros de fluorescência e fotossíntese foram submetidos a análise estatística, sendo submetido inicialmente a teste de normalidade dos dados através de Anderson-Darling, e posterior verificação da homocedasticidade

(homogeneidade das variâncias), através do teste Hartley. Os dados foram então submetidos à análise de variância, com níveis de significância de 5% de probabilidade de erro. Quando significativas, as médias foram submetidas ao teste Tukey a 5% de probabilidade de erro, tendo sido empregado os programas estatísticos R (versão 4.1.2), e RStudio (versão 2021.09.2 Build 382) como ambiente gráfico. Os gráficos foram produzidos utilizando o programa SigmaPlot (versão 14.0). A análise da correlação de Pearson foi realizada utilizando o Software R (R Development Core Team). Já os dados aferidos durante as análises bioquímicas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, usando SISVAR versão 5.4 (Lavras, MG, Brasil). As análises de componentes principais (PCA) e análise de cluster aglomerativa hierárquica (CAH) foram realizadas através do software XLSTAT (versão 2017; Addinsoft, France).

Os resultados foram analisados de maneira a inferir relações entre comunicação radicular e sobrevivência, partindo da premissa de que plantas sob estresse luminoso, com acesso radicular a plantas sob condições ótimas, apresentarão melhor performance que plantas submetidas a déficit luminoso, sem comunicação radicular com indivíduos com acesso à luz. Os resultados esperados segundo cada um dos tratamentos são resumidos em linhas gerais abaixo:

EXPC	Experimental Claro – Um indivíduo com acesso à luz, inserido no mesmo recipiente de um indivíduo do grupo EXPE, formando o complexo experimental. Performance em todas as variáveis idêntica à do controle individual. Possivelmente apresente melhor performance em algumas variáveis devido à comunicação com outro indivíduo. Neste caso, pode apresentar resultados comparáveis às plantas do CC.
EXPE	Experimental Escuro - Um indivíduo sem acesso à luz, inserido no mesmo recipiente de um indivíduo do grupo EXPC, formando o complexo experimental. Performance pior em comparação com o controle individual. No entanto, devido à comunicação com indivíduo com acesso à luz, deve apresentar melhores resultados do que plantas em déficit luminoso sem comunicação com indivíduos com acesso à luz, como aquelas do grupo CE. Deve apresentar sobrevivência prolongada e alguma capacidade de lidar com o estresse oxidativo causado pelo déficit luminoso.

CI	Controle Individual – Um indivíduo isolado com acesso à luz. Em se tratando de plantas crescendo em condições normais, deve ser usado como o parâmetro contra o qual todos os demais tratamentos devem ser comparados.
CC	Comunicado Claro – Dois indivíduos comunicados entre si, com acesso à luz. Devem apresentar resultados similares aos do CI, ou melhores que estes, uma vez que a comunicação com outro indivíduo propicia a cooperação.
CE	Comunicado Escuro – Dois indivíduos comunicados entre si, em déficit luminoso. Não foram realizadas análises bioquímicas porque todos os indivíduos do tratamento morreram entre a primeira e a segunda coleta de dados com o IRGA. Vem sendo utilizado como parâmetro contra o qual se comparam os resultados obtidos nas análises dos indivíduos do EXPE, uma vez que exibiram comportamento esperado de plantas sob déficit luminoso severo.

RESULTADOS

Trocas Gasosas

A condutância estomática (g_s , fig. 5, A) e a taxa de transpiração (E , fig. 5, B) observadas no grupo CE são reduzidas, de maneira condizente com o esperado de vegetais submetidos ao déficit luminoso. Nos grupos CI e CC, observou-se condutância estomática em constante elevação e posterior queda (devida, provavelmente, à elevação da umidade relativa do ar na casa de vegetação), com pequena variação entre os grupos. O tratamento CE apresentou imediata queda em direção à nulidade, não apenas nestes parâmetros, mas também em todos os demais, uma vez que todos os indivíduos deste grupo morreram no nono dia do experimento.

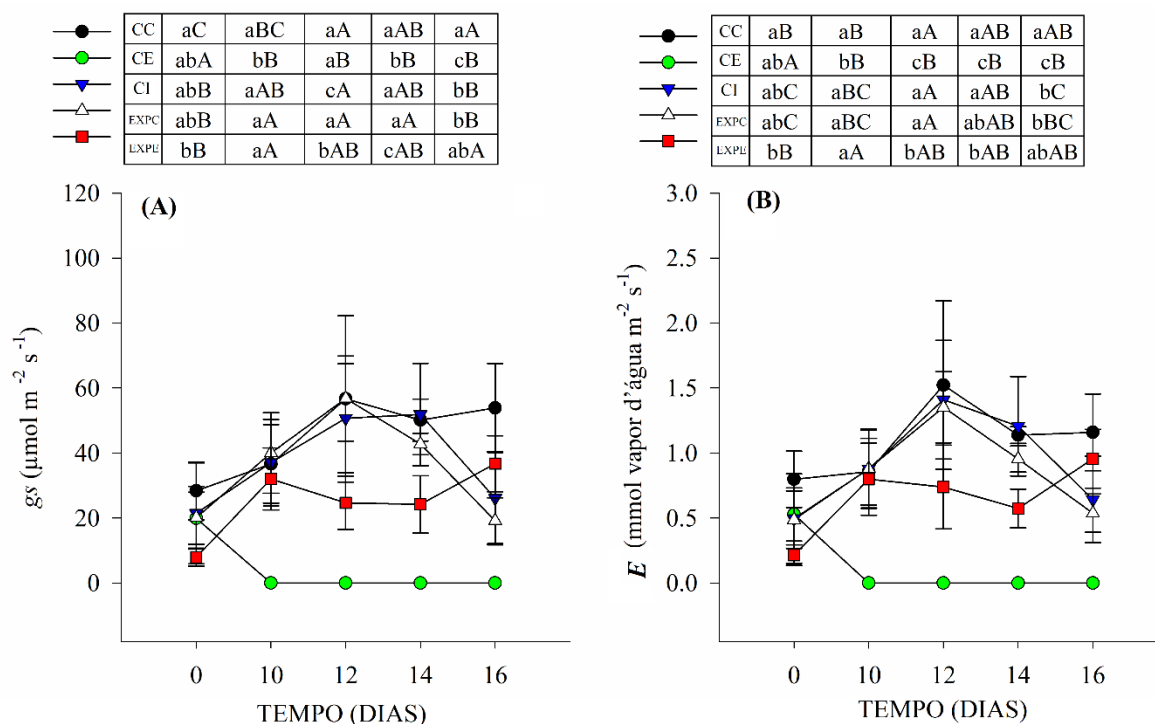


Fig. 5: A) Condutância estomática (g_s), e B) transpiração (E). Teste Tukey, 95%, $p < 0,05$.

No tratamento EXPE, apesar da elevação inicial (acompanhando os resultados observados nos demais grupos), observamos acentuada queda em ambos estes parâmetros, em comparação com outros tratamentos. Apesar de não haver retornado nunca aos patamares dos grupos controle, os indivíduos do EXPE foram capazes de estabelecer um nível mínimo de funcionalidade, sobretudo se contrastados com os indivíduos do CE, que morreram. Coerentemente, os dados relacionados à transpiração seguem o mesmo padrão observado nos dados da condutância estomática. Os tratamentos com acesso à luz mantiveram transpiração condizente com os níveis de abertura estomática aferidos. A concentração interna de carbono (C_i , fig. 6, A) observou-se condizente com as previsões em todos os tratamentos: elevada nos grupos com acesso à luz (e, portanto, com maior $[CO_2]$ interna), e nula no grupo CE. Os indivíduos sem acesso à luz do complexo experimental (EXPE), apresentaram valores mais elevados em relação àqueles encontrados nos grupos com acesso à luz, o que indicaria reduzida capacidade de assimilação por estes indivíduos.

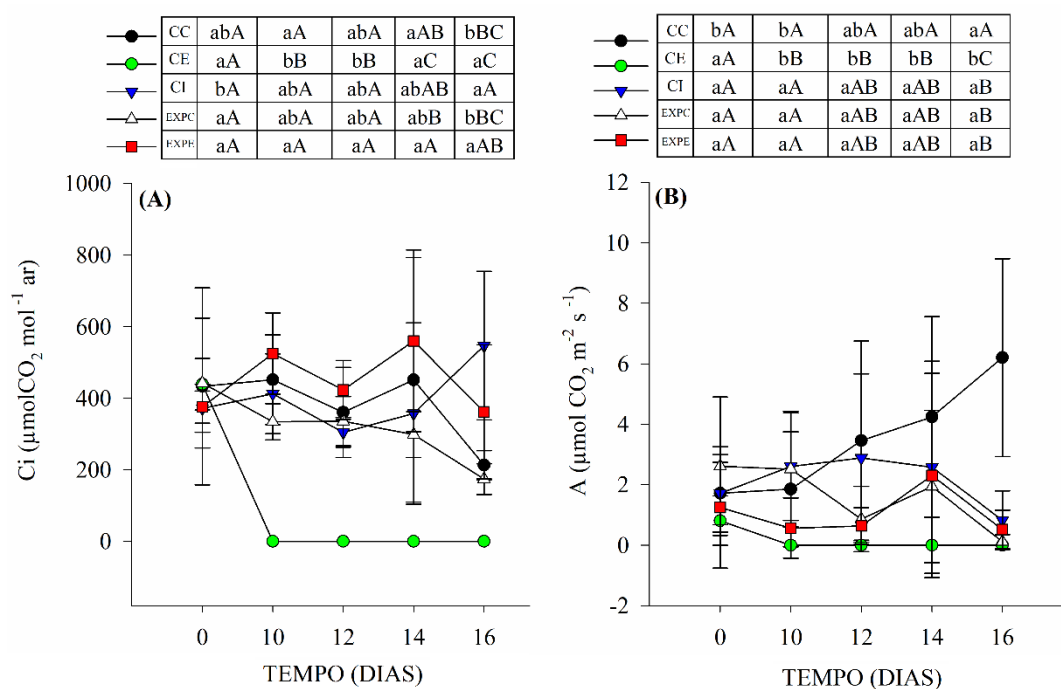


Fig. 6: A) Concentração interna de carbono (Ci), e B) taxa de assimilação de CO₂ líquida (A). Tukey, 95%, $p < 0,05$.

Estes parâmetros se complementam em junção com os dados da assimilação, uma vez que as taxas reduzidas de *Ci* correspondem a elevadas taxas de *A* (Fig. 6, B). No grupo EXPE, observou-se tanto a alta concentração de carbono, como baixa de assimilação, em consonância com a tendência observada nos grupos com acesso à luz, à exceção do tratamento CE (morto), e do CI, que manteve a tendência de queda da concentração interna de carbono aliada à elevação da assimilação em todas as aferições. O grupo CC apresentou, no final do experimento, comportamento inesperado, reduzindo a assimilação, com consequente aumento da concentração interna de carbono. As causas deste evento estão provavelmente ligadas à redução da capacidade de carboxilação da enzima RuBisCO.

Fluorescência da Clorofila a

Estas análises fotoquímicas permitiram a verificação das condições fisiológicas das plantas, de maneira a identificar possíveis alterações na eficiência dos fotossistemas, determinar se estes sofreram danos, e vincular os resultados aos estresses introduzidos (PROEBSTING et al., 1978; HASEGAWA et al., 2000). Conforme pode ser observado nas figuras 7 A e B, o grupo CI apresenta, tanto rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Phi PSII$ - Yield), como taxa de transferência de elétrons (ETR) condizentes com a capacidade de assimilação de carbono apresentada anteriormente e, desta forma, estabelecendo o comportamento padrão a ser esperado de plantas crescendo individualmente e com acesso à luz. No entanto, os resultados observados nos tratamentos com plantas comunicadas se mostrou diverso. O grupo CE, como em todas as demais variáveis analisadas, morreu entre a primeira e a segunda aferição. Os tratamentos CI e EXPC não apresentaram diferença estatística em seus valores ao longo do tempo, sugerindo que plantas com acesso à luz, independente de terem ou não comunicação com plantas submetidas a déficit luminoso apresentarão a mesma capacidade de transmissão de elétrons e, consequentemente, rendimento quântico similar, sempre que se encontrem sob as mesmas condições. O grupo EXPE apresentou uma elevação entre a primeira e a segunda aferições, passando a apresentar uma tendência de queda ao longo do tempo. Essa tendência poderia indicar a inevitabilidade de sua morte em última instância, ainda que comunicada com um indivíduo com acesso à luz. A maior diferença ocorreu entre as plantas do complexo experimental (EXPC/EXPE), onde observou-se proporcionalidade inversa entre as medições realizadas: aumentos em EXPC coincidiram com reduções em EXPE, e vice-versa. Todos os tratamentos (exceto o CI), no último dia de medições, apresentaram queda acentuada, tanto na ETR como no $\Phi PSII$, condizentes com a redução observada na condutância estomática.

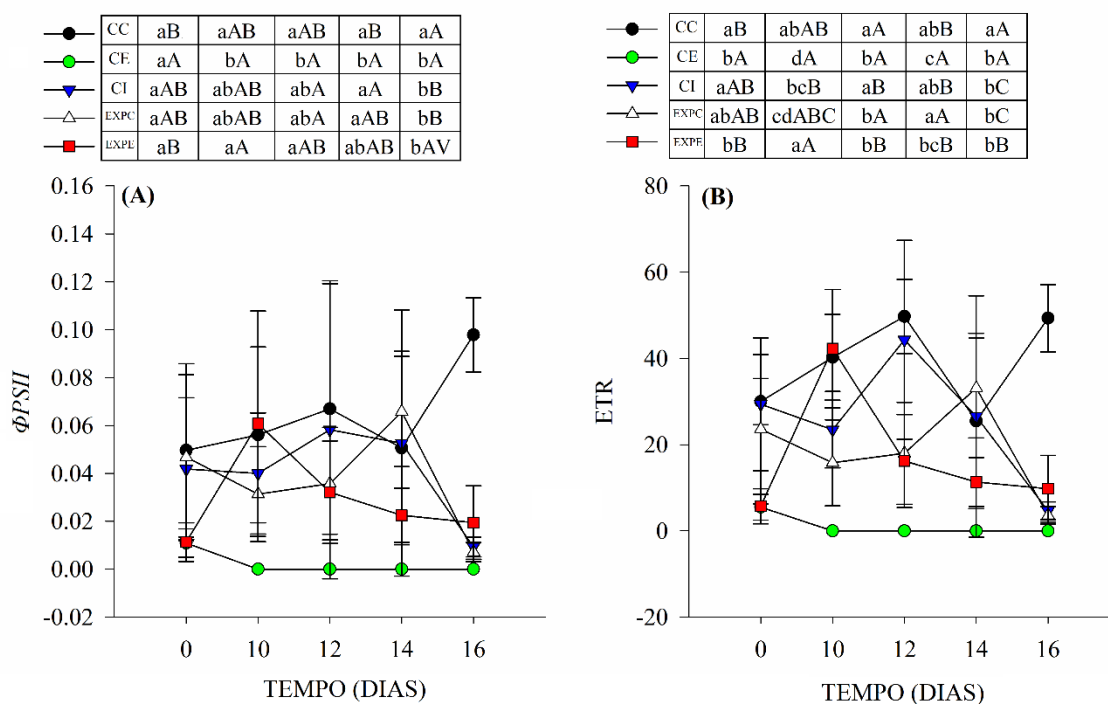


Fig. 7: A) Φ PSII, rendimento quântico do fotossistema II e B) ETR, taxa de transferência de elétrons. Teste Tukey, 95%, $p < 0,05$.

Comportamento semelhante pode ser observado nos dados relativos à dissipação fotoquímica (qP , fig. 8, A), cujo gráfico é praticamente visualmente idêntico aos da ETR e do Φ PSII. Com efeito, o aumento da atividade de dissipação fotoquímica aferido no grupo EXPE entre as médias da primeira e da segunda medições foi significativo, tendo sido o grupo que apresentou os maiores valores ao longo do tempo. No entanto, após esta elevação inicial, a dissipação fotoquímica passa a cair de maneira constante. Nos grupos CC e EXPC, os valores mantêm-se constantes, variando para baixo entre as duas últimas medições. O grupo CI apresentou dissipação constante, demonstrando elevação acentuada entre as duas últimas medições. Os valores referentes à dissipação não-fotoquímica (NPQ , fig. 8, B) mostram pequena variação entre os tratamentos, exceto no grupo EXPE, indicando que estes indivíduos apresentaram dissipação não-fotoquímica maior que aquela encontrada entre os demais tratamentos.

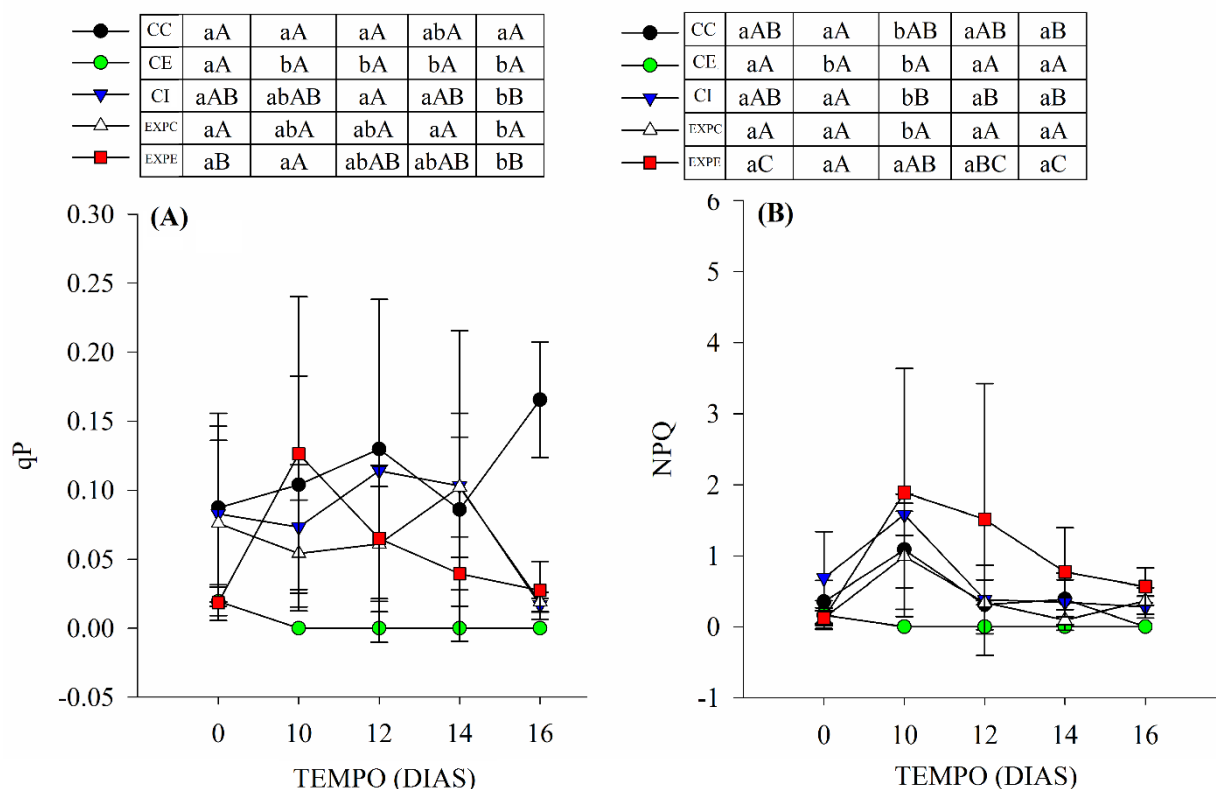


Fig. 8: A) *quenching* fotoquímico (*qp*), e B) não-fotoquímico (*NPQ*). Teste Tukey, 95%, $p < 0,05$.

Não obstante o grupo EXPE demonstrar performance inferior aos grupos controles e aos indivíduos do grupo EXPC, invariavelmente em praticamente todas as aferições, interessante fenômeno se dá na leitura dos dados relacionados à eficiência quântica fotoquímica do fotossistema II (F_v/F_m , fig. 9, A): os valores observados neste grupo são os maiores entre todos os tratamentos. Enquanto os demais grupos (excetuando-se, obviamente, o grupo CE) variam de maneira constante e sem diferença significativa entre si, tendo o grupo CI atingido inclusive a nulidade, as médias do grupo EXPE oscilam entre 0,7 e 0,8 durante toda a duração do experimento. Os valores da fluorescência mínima (F_0 , fig. 9, B) para o tratamento EXPE também foram os mais elevados em comparação com os demais grupos, mantendo-se praticamente constantes durante todo o experimento, enquanto os demais grupos iniciam o experimento com F_0 elevada, apresentam queda entre a primeira e a segunda medição, e mantêm-se consistentemente abaixo dos valores vistos em EXPE até o final do experimento.

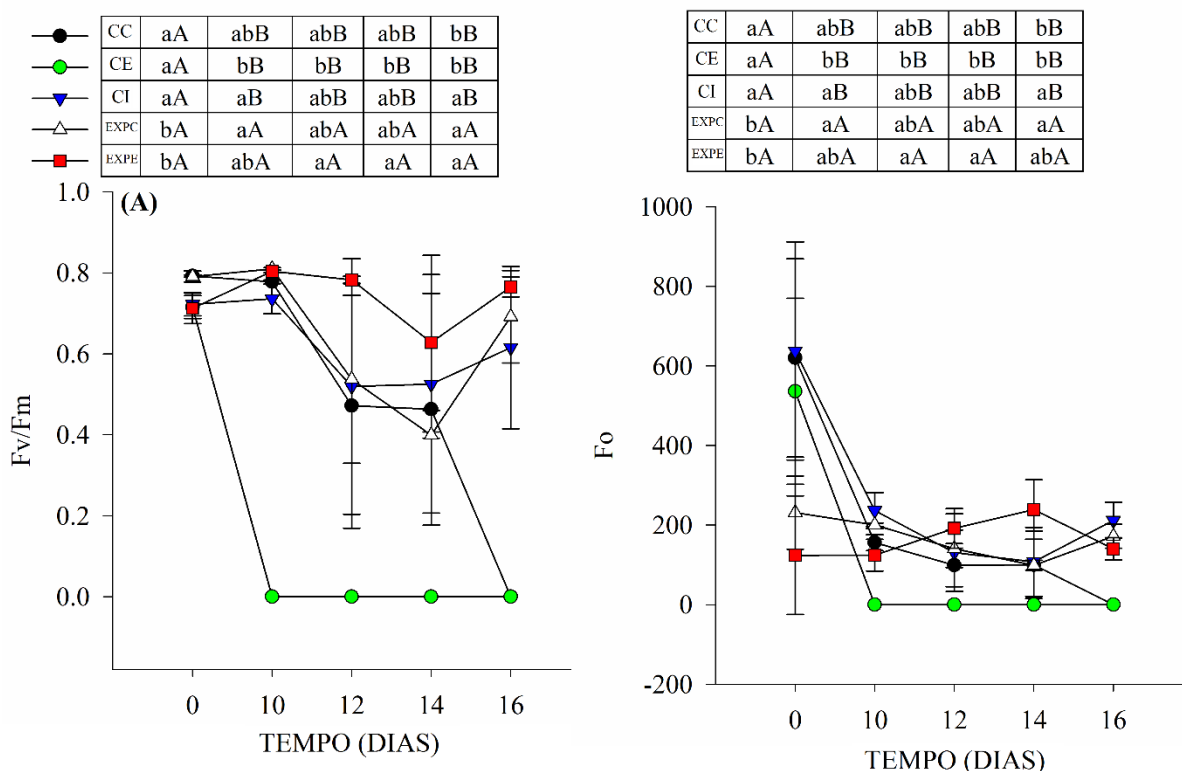


Fig. 9: A) F_v/F_m , eficiência quântica máxima do fotossistema II, e B) F_0 , fluorescência mínima. Teste Tukey, 95%, $p < 0,05$.

Encontramos que os maiores valores médios ao longo do tempo foram aferidos no grupo EXPE, tendo sido observada diferença estatística significativa entre estes e os do grupo CI. Entre os indivíduos do complexo experimental (EXPC/EXPE) não houve diferença estatística.

Atividade Antioxidante

Analizamos a atividade antioxidante através dos métodos DPPH, FRAP e ABTS. Os teores de compostos fenólicos totais aferidos foram maiores nas folhas e nas raízes das plantas cultivadas no claro (Tabela 1), em consonância com o esperado para vegetais crescendo em condições normais. Por outro lado, os menores teores ocorreram nas folhas de indivíduos do complexo experimental com acesso à luz (EXPC), enquanto não ocorreu

detecção deste composto nas raízes deste grupo. Não houve diferença significativa entre os níveis de flavonoides totais nas folhas, enquanto as raízes de indivíduos do complexo experimental sem acesso à luz (EXPE) apresentaram os menores teores destes compostos. De maneira geral, quando comparados os valores encontrados para todos os tratamentos entre folhas e raízes, estas últimas apresentam as menores médias, exceto no que diz respeito aos teores encontrados através do ABTS. Neste caso, não houve diferença significativa entre os tratamentos, ou seja, indivíduos do grupo EXPE demonstraram capacidade de captura e conversão de ERO idêntica à encontrada nos grupos controle.

Tabela 1. Bioquímica: Fenóis, Flavonoides, DPPH e ABTS (mg/100g), FRAP (mM/kg) e MDA (nmol TBARS/g massa fresca)

Tecido	Tratamento	Fenóis Totais	Flavonoides Totais	DPPH	FRAP	MDA	ABTS
Folhas	EXPC	57,82 c	18,39 ^{ns}	9,12 b	4,63 b	3,77 c	198,02 b
	EXPE	82,71 b	15,62	6,92 c	11,34 a	5,08 b	195,41 b
	CI	105,06 a	19,14	13,87 a	12,22 a	6,98 a	204,43 a
	CC	93,32 b	17,21	12,47 a	6,05 b	5,32 b	192,76 b
Raízes	EXPC	-	-	0,62 b	-	3,21 c	206,01 ^{ns}
	EXPE	0,26 b	0,15 c	0,92 a	-	8,46 b	206,91
	CI	5,93 a	2,29 a	1,16 a	0,38 ^{ns}	12,52 a	204,72
	CC	0,94 b	0,51 b	1,37 a	0,47	8,06 b	206,88

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$)

Folhas de plantas do tratamento CI (plantas individuais com acesso à luz), apresentaram maior atividade antioxidante segundo todos os métodos. Essas plantas apresentaram também maior teor de compostos fenólicos e, mesmo sem diferença estatística, não podemos ignorar a tendência que sugere maior conteúdo de flavonoides nestes tecidos. Resultado semelhante pode ser observado nas raízes de plantas do

tratamento CI, ou seja, apresentaram maior atividade antioxidante, medida tanto via DPPH como MDA, bem como maior conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais.

Analisando as medidas obtidas via ABTS, notamos a emergência de um padrão digno de atenção: considerando o grupo CI como o padrão contra o qual todos os demais grupos devem ser comparados, encontramos com diferença estatística entre este e os demais grupos. Embora os maiores valores tenham sido aferidos no CI, o grupo CC e o complexo experimental EXPC-EXPE apresentaram valores estatisticamente idênticos, e pouco abaixo do obtido no CI. Este achado indica que a comunicação radicular tem efeitos fisiológicos sobre a capacidade de resistência ao estresse oxidativo, sobretudo se levamos em consideração que indivíduos do EXPE estão sujeitos a reduzida capacidade de resposta graças ao déficit luminoso.

Análise dos Componentes Principais

Os resultados das análises dos compostos fenólicos e atividade antioxidante foram comparados através da análise dos componentes principais (PCA) (Fig. 10), que explicou 88,98% dos dados. Há um nítido agrupamento dos dados obtidos nas folhas na PC1+. Ao contrastarmos os resultados entre os tecidos, as folhas contém, em todos os tratamentos, maiores teores de fenólicos totais e flavonoides totais, bem como apresentam maior atividade antioxidante medidas via DPPH e FRAP (Tabela 1).

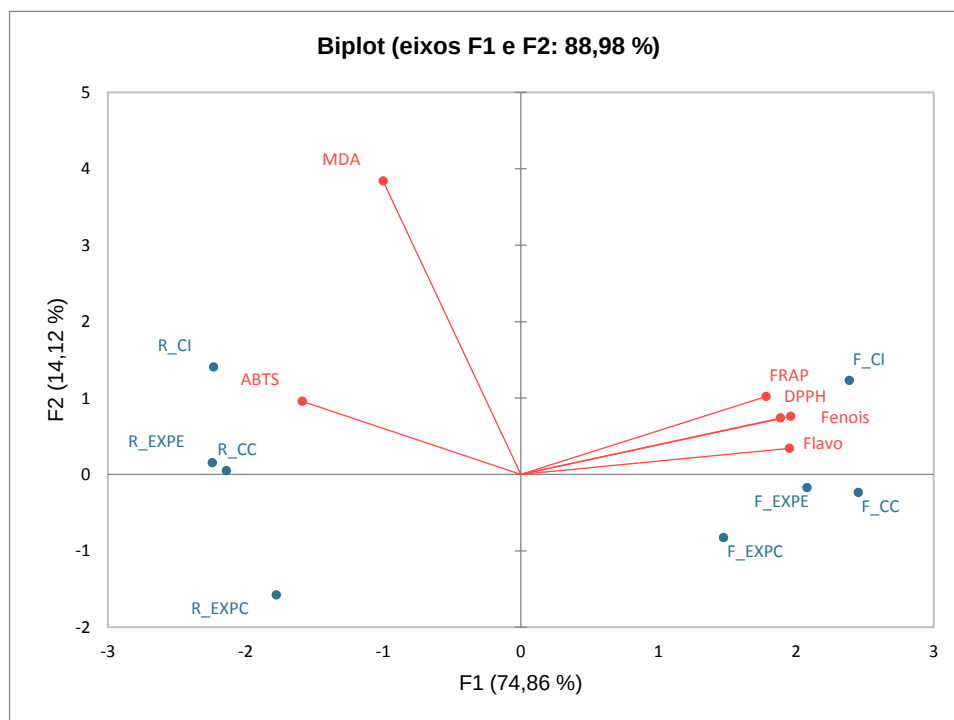


Fig. 10: PCA – Principal Components Analysis (Análise dos Componentes Principais) Folhas e Raízes. Scott-Knott a 5% de probabilidade, $p < 0,05$.

Analisando os componentes principais encontrados nas folhas de maneira isolada, segundo o exposto na figura 11 (que explica 85.54% dos dados), encontramos que plantas do tratamento CI foram agrupadas na PC1+. Isto se deve aos níveis de compostos fenólicos (fenóis totais e flavonoides totais), e da atividade antioxidante analisada pelos quatro métodos, e indica maiores teores destes compostos neste tecido. A PCA dos dados obtidos nas raízes (fig. 13, que explica 96.89% dos dados), mostra que plantas resultantes do tratamento CI também foram agrupadas na PC1+, com maiores níveis de fenóis totais e flavonoides totais, bem como maiores atividade antioxidante via DPPH e MDA, refletindo o descrito na Tabela 1.

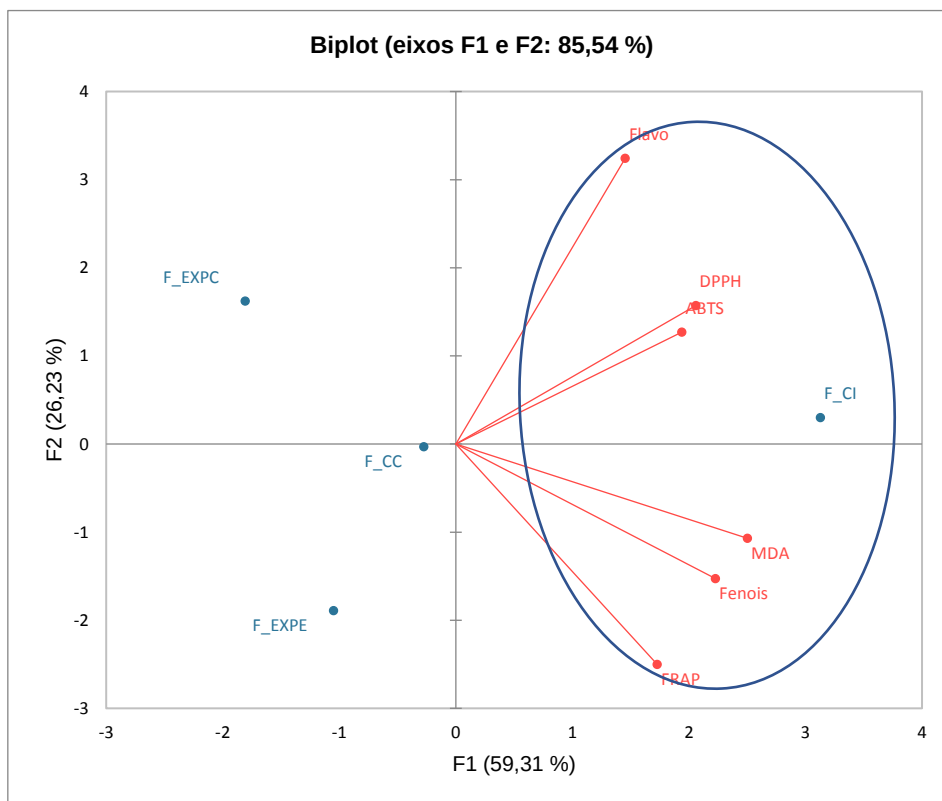


Fig. 11 PCA (Análise dos Componentes Principais) – Folhas. Scott-Knott a 5% de probabilidade, $p < 0,05$.

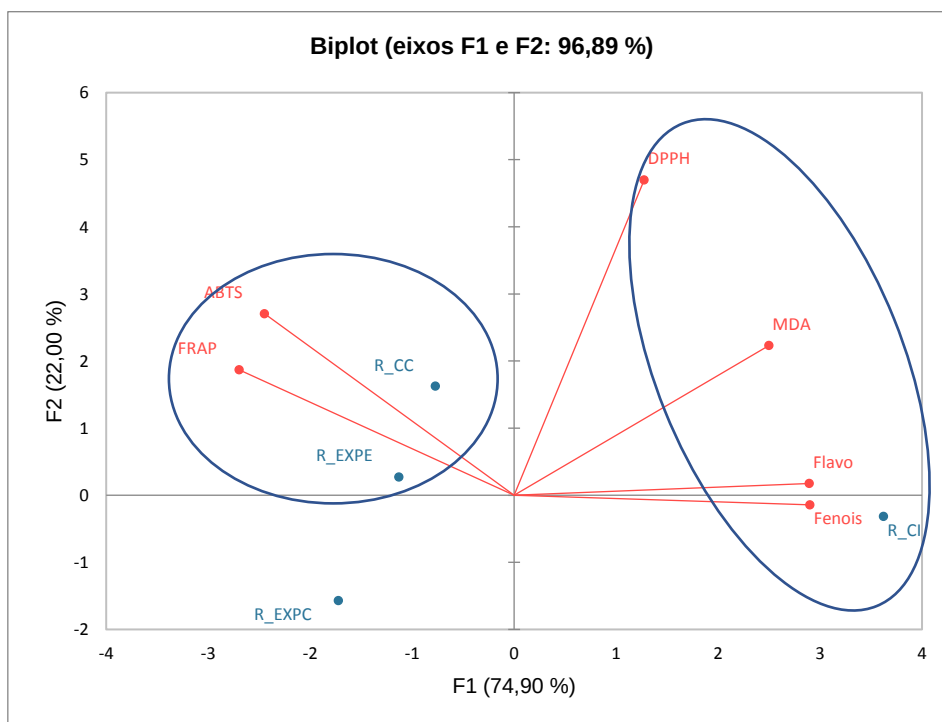


Fig. 12: PCA (Análise dos Componentes Principais) – Raízes. Scott-Knott a 5% de probabilidade, $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

Os dados resultantes do experimento, tanto relativos às trocas gasosas como aos diversos parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, ao serem analisados em conjunto com os observados nas análises da medida da atividade antioxidante, nos permitem vislumbrar a sugestão de um panorama amplo, que abarca a condição do vegetal em questão como um todo. Os dados da fluorescência da clorofila *a* aportam imprescindível informação acerca do uso da energia absorvida pela clorofila (posto que o fluxo de elétrons através do PSII é indicativo seu funcionamento, bem como a extensão de eventuais danos causados a este (JOHNSON; MAXWELL, 2000)). Da mesma forma, F_0 , ao ser um parâmetro de maior sensibilidade a variações de dissipação de energia através da emissão de fluorescência, oferece um diagnóstico mais acurado da capacidade de fotoproteção dos vegetais, em comparação com aquele oferecido pelos resultados da F_m . Igualmente importante, e indissociáveis da eficiência fotossintética, são os dados relacionados à capacidade de trocas gasosas do vegetal, uma vez que destas provém os insumos necessários (sobretudo o CO_2) para a etapa não fotoquímica da fotossíntese.

A baixa condutância estomática (g_s) aferida no grupo EXPE está diretamente relacionada à redução das taxas de transpiração (E), e são ambos indicativos de déficit luminoso, posto que um vegetal submetido à baixa luminosidade fechará seus estômatos: o mecanismo de abertura estomática fotoativo é dependente da presença da luz, sobretudo em comprimentos de onda correspondentes à luz azul (~440-500 nm). A elevada concentração interna de carbono (C_i) se relaciona diretamente com a baixa assimilação (A), já que o carbono não assimilado tende a se acumular, aumentando sua concentração, indicando a incapacidade de fixação apropriada do CO_2 disponibilizado nas câmaras subestomáticas. Digna de nota é a inversão dos padrões da corrente transpiratória em EXPE e EPXC, que constitui evidência de diálogo entre os indivíduos destes grupos.

Em conjunto, tais correlações sugerem uma relação de cooperação entre os indivíduos, especialmente quando relacionados à atividade antioxidante nos diferentes grupos. Os resultados observados corroboram a literatura, uma vez que reafirmam que a luz tem papel fundamental no metabolismo de compostos fenólicos, derivados da via do ácido chiquímico/fenilpropanóide (formando fenilpropanóides), e daquela do poliketídio via acetato/malonato (QUIDEAU et al., 2011). Os vegetais acumulam compostos fenólicos (incluindo flavonoides) no mesófilo e nas células epidérmicas, e seus teores estão diretamente relacionados com a capacidade de realizar fotossíntese. Durante esta, forma-se o substrato (esqueleto carbônico) que será utilizado para a síntese de precursores de diversos compostos fenólicos. Assim sendo, plantas que apresentem alterações na capacidade fotossintética apresentarão efeitos deletérios na síntese de compostos fenólicos. Estudos prévios atestam que plantas sob alta intensidade luminosa (UVA e/ou UVB) podem apresentar aumento no conteúdo de compostos fenólicos (BARBER, 1992; ROYCHOUDHURY et al., 2014). Em nosso estudo, plantas cultivadas no claro apresentaram maiores níveis de compostos fenólicos, flavonoides incluídos. O efeito do déficit luminoso sobre os indivíduos do EXPE pode ser nitidamente observado nestes resultados. Compostos fenólicos (incluindo flavonoides) estão entre as classes de moléculas provenientes do metabolismo secundário com potencial para a comunicação, posto que são frequentemente exsudados pelo sistema radicular, e desempenham diversos papéis nos tecidos de plantas, incluindo crescimento e sobrevivência (CHEYNIER, 2013).

Portanto, de acordo com estes achados, é lógico inferir que, dadas as concentrações necessárias, estes compostos serão disponibilizados por indivíduos com acesso à luz na solução nutritiva, e absorvidos pelo sistema radicular de indivíduos em déficit luminoso adjacentes, ocasionando alívio – ainda que temporário – ao estresse oxidativo sofrido por estes.

Concomitantemente, é possível correlacionar a baixa A aos dados aferidos via fluorescência da clorofila *a*: baixas taxas ETR são indicativas de dano por déficit luminoso ao PSII.

Uma das respostas do aparato fotossintético é o reparo das proteínas D1/32kD dos centros de reação do PSII. No entanto, em condições de baixa luminosidade este processo se dá de maneira mais lenta, sendo a substituição desta proteína completada, aproximadamente, a cada 8 horas, e a incapacidade de substituir e reparar essas proteínas leva à inativação dos centros de reação (KIM, 1993; SIRPIÖ, 2013). Portanto, ocorre o aumento da pressão eletrônica da cadeia transportadora de elétrons, isto é, os aceptores de elétrons intermediários entre o PSII e o PSI encontram-se todos reduzidos, isto é, ocupados com elétrons recebidos e, por ser impossível prosseguir com a transferência para os aceptores subsequentes, ficam impossibilitados de aceitar novos elétrons provenientes do centro de reação P680, tendo como consequência a inativação dos centros de reação. Isto ocorre sobretudo entre o PSII e o *Cytb₆f* e, mais especificamente, entre os aceptores de elétrons PQ_a e PQ_b , que somente serão capazes de aceitar novos elétrons uma vez que tenham efetivamente transferido um elétron ao próximoceptor (BARBER, 1987; MURCHIE, 2017; FOYER, 2018). No entanto, os valores de F_v/F_m dos indivíduos do tratamento EXPE indicam que seus centros de reação não se encontram danificados em sua totalidade. Isto nos leva à forçosa conclusão de que a discrepância entre a disponibilidade de centros de reação, assim como o baixo rendimento quântico observado neste grupo se deve à incapacidade de direcionar de maneira adequada a energia captada. De fato, o amarelamento observado nas folhas dos indivíduos do EXPE a partir da terceira medição com o IRGA indica redução nos teores de clorofila *a*, e aumento no conteúdo de carotenoides, possível método de captação de luz pelos complexos antena. Além da degradação da clorofila, a reduzida capacidade de utilização da energia captada pode estar diretamente relacionada aos danos causados pelo estresse oxidativo em diferentes estruturas na membrana do tilacóide. A aferição da atividade antioxidante por diversos métodos é uma importante forma de verificar a capacidade celular de eliminar radicais livres geradoras de estresse oxidativo. Estes métodos contém reagentes capazes de interagir e reagir com compostos antioxidantes, apresentando alterações na coloração da solução, e fornecendo uma medida da

atividade contra radicais livres. Estas medidas podem ser influenciadas por diversos processos, como extração, tempo de reação, solubilidade do composto, entre outros (MOON, 2009). Em nosso estudo, verificamos que tais resultados confirmam os relatos da literatura, que afirmam que plantas com acesso à luz apresentam maiores conteúdos de compostos fenólicos, graças à atividade fotossintética (ROYCHOUDHURY et al., 2014).

Em condições normais, os processos de respiração e fotossíntese realizados pelos vegetais produzem certa quantidade de ERO. Normalmente, a acumulação destas é mantida sob controle por mecanismos de captura (tanto enzimáticos como não-enzimáticos) desencadeados como resposta (SHARMA, 2016). Contudo, diante da introdução de estresse luminoso, as vias de síntese destes mecanismos se veem prejudicadas, posto que (sobretudo os compostos fenólicos e flavonoides) são dependentes da presença de luz (HASANUZZAMAN, 2020). Na impossibilidade de lidar com o acúmulo de ERO, o delicado equilíbrio estabelecido entre a geração de ERO e sua captura é perturbado, passando a alimentar um ciclo vicioso de dano oxidativo, que se retroalimenta. Isto, em última instância, também reduzirá a capacidade de moléculas de NADP^+ de agirem como drenos de elétrons no PSI, causando congestionamento na cadeia transportadora de elétrons.

Este congestionamento ocasionará fotoinibição, devido ao fechamento dos centros de reação, resultando em reduzida protonação do lúmen do tilacóide. A liberação de hídrons (cátions H^+) pelo plastoquinol (PQH, forma reduzida da plastoquinona - PQ) no lúmen do tilacóide é condição necessária para a geração de um gradiente que ativará o funcionamento da enzima F-ATPase (ALLEN, 2002). Esta, utilizando-se da movimentação dos hídrons a favor do gradiente, fosforila uma molécula de ADP, resultando em ATP, que será disponibilizado para a efetiva assimilação de carbono em moléculas de glicose pela enzima RuBisCO, no decorrer do ciclo de Calvin-Benson. Estando a cadeia transportadora de elétrons sobrecarregada, ocorre redução da síntese de ATP, reduzindo sua disponibilidade e acarretando menor capacidade de assimilação,

conforme verificado nos dados da A. Também ocorre desequilíbrio estequiométrico entre o PSII e o PSI, reduzindo a capacidade deste último de captar e transferir energia, reduzindo ainda mais a eficiência fotossintética (SCHÖTTLER, 2014).

No entanto, um dos gráficos nos chama a atenção: F_v/F_m . Apesar de que a visão geral das trocas gasosas e fluorescência tenha nos proporcionado uma versão coesa e lógica dos eventos ocorridos durante o experimento, os resultados deste parâmetro suscitaram curiosidade. Sendo F_v/F_m uma estimativa obtida da relação entre as fluorescências variável e máxima, através dos valores obtidos podemos determinar a eficiência dos centros de reação na utilização dos *quanta* absorvidos (BJÖRKMAN, 1987; JOHNSON et al., 1993). Alterações nestes valores indicariam mudanças na eficiência dos mecanismos de dissipação não-fotoquímica (MAXWELL, 2000; ORDÖG, 2011). A eficiência quântica fotoquímica do PSII dos indivíduos sujeitos ao déficit luminoso apresenta-se menor do que aquele observado nos grupos com acesso à luz. No presente estudo, observou-se redução dos valores de F_v/F_m , indicando infraexcitação do aparato fotossintético, sobretudo em comparação com os grupos com amplo acesso à luz. Estes resultados estão em consonância com os valores obtidos nos demais componentes da dissipação, tanto fotoquímica como bioquímica, e com o Φ_{PSII} . Isto é, conforme detalhado anteriormente, resultado do fechamento dos centros de reação em consequência do aumento da pressão eletrônica decorrente da incapacidade de reparar as proteínas D1/32kDa em tempo hábil (VASILIKIOTIS, 1994; SCHÖTTLER, 2014). Em comparação com o grupo CE, composto também por indivíduos sob déficit luminoso, o resultado é coerente com o esperado: ainda que estivessem em comunicação via sistema radicular, o déficit luminoso foi, para ambos os indivíduos, fatal.

Estresses como o promovido pelo déficit luminoso afetam profundamente o crescimento e o desenvolvimento de plantas, e no presente estudo, esperava-se que os indivíduos do complexo experimental sem acesso à luz, por terem seu sistema radicular em comunicação com um indivíduo com acesso à luz, apresentassem alterações no conteúdo de compostos fenólicos totais e de

flavonoides totais. No entanto, este efeito não foi observado neste experimento, observação que nos leva a sugerir que o estresse causado pelo elevado nível de oxidantes tenha sido elevado a ponto de danificar irreversivelmente as células. Dado que a única diferença entre o grupo CE e o complexo EXPC-EXPE consistia no fato de que os indivíduos do EXPE compartilhavam solução nutritiva com indivíduos com acesso irrestrito à luz, propomos que este contato radicular propiciou a comunicação entre os indivíduos a partir de compostos orgânicos exsudados pelas raízes, induzindo respostas sistêmicas (uma vez que os dados analisados sugerem ajustes fotoquímicos em condições de sombra), garantindo sobrevivência à planta sob déficit luminoso, resistência ao dano causado por estresse oxidativo significativa, o que propiciou sobrevivência prolongada em comparação com as plantas sem comunicação com indivíduos cultivados em condições normais de luminosidade. É digno de nota o fato de que, nas raízes, os valores de ABTS em EXPE não apresentaram diferença estatística significativa em comparação com os demais tratamentos, o que indica elevada capacidade controle do estresse oxidativo. No entanto, conforme mencionado anteriormente, o déficit luminoso prejudica as vias de resposta ao acúmulo de ERO. Desta forma, inferimos que a manutenção de níveis similares aos dos grupos controle de atividade antioxidante devem-se à comunicação planta-planta no complexo experimental. A absorção destes compostos exsudados por indivíduos do EXPC pode explicar a elevada capacidade dos indivíduos do EXPE de lidar com o estresse oxidativo.

Para além das questões relacionadas à atividade antioxidante, há que se considerar que os indivíduos em déficit luminoso tiveram sensível redução de sua capacidade de assimilação de carbono e, por conseguinte, de seu rendimento fotossintético. Tais alterações fisiológicas acarretam a incapacidade de atender à demanda energética de diversos processos imprescindíveis para a manutenção do vegetal. Ainda assim, e a despeito desta constatação, os vegetais do grupo submetido ao déficit luminoso em comunicação radicular com indivíduos com acesso à luz permaneceram vivos até o final do experimento, diferentemente do observado em indivíduos

comunicados sem acesso à luz. É inevitável sentir-nos compelidos a conjecturar que, além de metabólitos secundários, há possibilidade não negligível de que a transferência de outras classes de moléculas entre os indivíduos possa ter ocorrido. Sobretudo se levamos em consideração os precedentes amplamente estabelecidos na literatura (SIMARD, 2010, 2015; LAMBERS, 2018) acerca da transferência líquida de fotoassimilados via exsudatos radiculares.

A interpretação dos dados, assim como sua comparação com os demais parâmetros, em conjunto com as análises bioquímicas, nos levam a reconsiderar as afirmações tidas como postulados durante a execução do experimento (e mesmo após, durante a análise dos dados). Sempre tivemos como assentado que o grupo CI deveria ser o padrão contra o qual todos os demais tratamentos deveriam ser comparados, uma vez que se tratava de indivíduos crescendo em condições ótimas, livres da introdução de estímulos estressantes e sem o modificador representado pela introdução da comunicação radicular com indivíduos adjacentes. No entanto, após termos nos deparado com os resultados acima discutidos, fomos obrigados a repensar estes conceitos. Ora, plantas de *P. sativum*, quando *in natura*, não crescem de maneira isolada, mas o fazem em grupos. Mesmo aquelas cultivadas para consumo humano são plantadas em estreita proximidade, o que propicia a formação de complexas redes radiculares, inclusive com formação de redes de ectomicorizas. Assim sendo, partimos da premissa equivocada ao presumir que plantas individuais serviriam como controle, uma vez que esta não é sua condição de crescimento natural (e, portanto, ótima). Isto explica por que, em virtualmente todos os parâmetros aferidos, os indivíduos do grupo CC demonstraram melhor performance do que aqueles do grupo CI: ao forçar o crescimento destes indivíduos separados de outros, introduzimos, inadvertidamente, um outro fator estressante: o isolamento. Esta constatação vem de encontro ao que vimos afirmando a respeito da capacidade melhorada de resposta ao dano causado pelo estresse oxidativo observado em indivíduos submetidos à comunicação radicular.

Contudo, embora estudos recentes tenham exposto mecanismos de sinalização desencadeados por eventos estressantes (VERHAGE, 2021) e as respostas dos indivíduos e de plantas adjacentes, a natureza dos compostos exsudados ainda permanece por ser desvelada por futuros estudos.

CONCLUSÃO

O presente estudo encontrou evidências de que a comunicação via exsudatos do sistema radicular entre dois indivíduos da mesma espécie aumenta a possibilidade de sobrevivência dos indivíduos submetidos a déficit luminoso severo.

Embora sejam inegáveis os indícios de que o prolongamento da sobrevivência dos indivíduos sujeitos a déficit luminoso esteja relacionada com a absorção de metabólitos secundários responsáveis pela captura e controle dos níveis de ERO, a natureza destes compostos não foi completamente elucidada por este estudo.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALLEN, J. Photosynthesis of ATP— Electrons, Proton Pumps, Rotors, and Poise. **Cell**, v. 110, p. 273–276, 2002.

ANGERS, D. A.; CARON, J. Plant-induced changes in soil structure: Processes and feedbacks. **Biogeochemistry**, [s. l.], n. 42, p. 55–72, 1998.

AWAD, Mohamed A.; DE JAGER, Anton; VAN WESTING, Lucie M. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. *Scientia Horticulturae*, v. 83, n. 3, p. 249-263, 2000.

BALUŠKA, F. et al. The “root-brain” hypothesis of Charles and Francis Darwin: Revival after more than 125 years. **Plant Signaling and Behavior**, [s. l.], v. 4, n. 12, 2009.

BALUŠKA, František; GAGLIANO, Monica; WITZANY, Guenther. **Memory and Learning in Plants**. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, 2018.

BARBER, J.; ANDERSSON, B. Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 61–66, 1992.

BARBER, J.; CHAPMAN, D. J.; TELFER, A. Characterisation of a PS II reaction centre isolated from the chloroplasts of *Pisum sativum*. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 220, n. 1, p. 67–73, 1987.

BENZIE, Iris FF; STRAIN, John J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BJÖRKMAN, O.; DEMMIG, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, [s. l.], v. 170, n. 4, p. 489–504, 1987.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

CALVO, P.; SAHI, V. P.; TREWAVAS, A. Are plants sentient? **Plant Cell and Environment**, [s. l.], v. 40, n. 11, p. 2858–2869, 2017.

CAPARROTTA, S. et al. Induction of priming by salt stress in neighboring plants. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 147, n. August 2017, p. 261–270, 2018.

CHEYNIER, V. et al. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, [s. l.], v. 72, p. 1–20, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>

COPPOLA, M. et al. Plant-To-plant communication triggered by systemin primes anti-herbivore resistance in tomato. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-15481-8>

DEMONGEOT, J.; HASGUI, H.; THELLIER, M. Memory in plants: Boolean modeling of the learning and store/recall memory functions in response to environmental stimuli. **Journal of**

Theoretical Biology, [s. l.], v. 467, p. 123–133, 2019. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2019.01.019>>

DICKE, M.; BRUIN, J. Chemical information transfer between plants: **Biochemical Systematics and Ecology**, [s. l.], v. 29, n. 10, p. 981–994, 2001.

DICKE, M.; DIJKMAN, H. Within-plant circulation of systemic elicitor of induced defence and release from roots of elicitor that affects neighbouring plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s. l.], v. 29, n. 10, p. 1075–1087, 2001.

ELHAKEEM, A. et al. Aboveground mechanical stimuli affect belowground plant-plant communication. **PLoS ONE**, [s. l.], p. 1–15, 2018.

FALIK, O. et al. Rumor has it.: Relay communication of stress cues in plants. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 11, p. 1–6, 2011.

FANKHAUSER, C.; CHORY, J. Light Control of Plant Development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 203–229, 1997.

FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 87, n. 19, p. 7713–7716, 1990.

FOYER, C. H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 154, p. 134–142, 2018. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.003>

GAGLIANO, M. et al. Learning by Association in Plants. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. July, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep38427>>

GAGLIANO, M. et al. Experience teaches plants to learn faster and forget slower in environments where it matters. **Oecologia**, [s. l.], v. 175, n. 1, p. 63–72, 2014.

GAGLIANO, M.; ABRAMSON, C. I.; DEPCZYNSKI, M. Plants learn and remember: lets get used to it. **Oecologia**, [s. l.], v. 186, n. 1, p. 29–31, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00442-017-4029-7>

HASANUZZAMAN, M. et al. Regulation of ros metabolism in plants under environmental stress: A review of recent experimental evidence. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 22, p. 1–44, 2020.

HASEGAWA, P. M. et al. PLANT CELLULAR AND MOLECULAR RESPONSES TO HIGH SALINITY. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 463–499, 2000. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.51.1.463>>

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 125, n. 1, p. 189–198, 1968.

HOAGLAND & ARNON (1938). *The water-culture method for growing plants without soil* (Circular (California Agricultural Experiment Station), 347. ed.). Berkeley, Calif.: University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station.

HOLDSWORTH, W. **A community resource for exploring and utilizing genetic diversity in the USDA pea single plant plus collection**, 2017.

JACOB, C. E.; TOZZI, E.; WILLENBORG, C. J. Neighbour presence, not identity, influences root and shoot allocation in pea. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 1–12, 2017.

JOHNSON, G. N. et al. The dissipation of excess excitation energy in British plant species. **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 673–679, 1993.

JOHNSON, G. N. et al. Adaptations to extreme low light in the fern *Trichomanes speciosum*. *New Phytologist*, [s. l.], v. 148, n. 3, p. 423–431, 2000.

KARBAN, R. **Plant Sensing and Communication**. Chicago; London.: University of Chicago Press, 2015. Disponível em: <http://www.bibliovault.org/BV.landing.epl?ISBN=9780226264844>

KARBAN, R. Explaining evolution of plant communication by airborne signals. **Trends in Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 137–144, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2009.09.010>>

KIM, J. H.; NEMSON, J. A.; MELIS, A. Photosystem II reaction center damage and repair in *Dunaliella salina* (green alga): Analysis under physiological and irradiance-stress conditions. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 181–189, 1993.

KIM, J.; SHIN, W. How to do random allocation (randomization). **Clinics in Orthopedic Surgery**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 103–109, 2014.

LAMBERS, H. et al. How belowground interactions contribute to the coexistence of mycorrhizal and non-mycorrhizal species in severely phosphorus-impooverished hyperdiverse ecosystems. **Plant Soil** 424, 11–33 (2018).

MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V.; ÇAKMAK, I. Root-induced changes of nutrient availability in the rhizosphere. **Journal of Plant Nutrition**, [s. l.], v. 10, n. 9–16, p. 1175–1184, 1987.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], 2000.

MICHMIZOS, D.; HILIOI, Z. A roadmap towards a functional paradigm for learning & memory in plants. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 232, p. 209–215, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.11.002>

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 57, n. 5, p. 1655–1666, 2009.

MUNNS, R. Hoagland's Nutrient Solution. **Prometheus Protocols**, 2017. Protocolo para preparo da solução de Hoagland e Arnon nº2 (1938), modificado para utilização em solução. Disponível em: <<https://prometheusprotocols.net/experimental-design-and-analysis/experimental-treatments/salinity/hoaglands-nutrient-solution/>>. Acesso em: 16-04-2020.

MURCHIE, E. H. Safety conscious or living dangerously: what is the 'right' level of plant photoprotection for fitness and productivity? **Plant Cell and Environment**, [s. l.], v. 40, n. 8, p. 1239–1242, 2017.

NOROUZITALLAB, P. et al. Can epigenetics translate environmental cues into phenotypes? *Science of the Total Environment*, [s. l.], v. 647, p. 1281–1293, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.063>

OLIVEIRA, Felipe. **MEMÓRIA FISIOLÓGICA E COMUNICAÇÃO RADICULAR**. Dissertação (mestrado) – UNESP. Botucatu. [s. l.], 2019.

OLLE, M. The yield, height and content of protein of field peas (*Pisum sativum* L.) in Estonian agro-climatic conditions. **Agronomy Research**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 1725–1732, 2017.

ÖRDÖG, V.; ZOLTÁN, M. Water and nutrients in plants. **Plant physiology**, [s. l.], p. 2–32, 2011. Disponível em: http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0010_1A_Book_angol_01_novenyelettan/ch02.html#id466693

PASCUAL, J.; RAHIKAINEN, M.; KANGASJÄRVI, S. Plant Light Stress. eLS, [s. l.], n. April, p. 1–6, 2017.

PAVEK, P. L. S. Plant Guide for pea (*Pisum sativum* L.). **USDA-Natural Resources Conservation Service, Pullman, WA.**, [s. l.], p. 1–6, 2012.

PAVLOV, I. P. (1997). Excerpts from The Work of the Digestive Glands (W. H. Thompson, Trans.). *American Psychologist*, 52(9), 936–940. <https://doi.org/10.1037/0003-066X.52.9.936>

PROEBSTING, W. M.; DAVIES, P. J.; MARX, G. A. Photoperiod-induced changes in gibberellin metabolism in relation to apical growth and senescence in genetic lines of peas (*Pisum sativum* L.). **Planta**, [s. l.], v. 141, n. 3, p. 231–238, 1978.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, [s. l.], v. 26, n. (9-10), p. 1231–1237, 1999. Disponível em: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/50321545/Re_R._et_al._Antioxidant_activity_applyi20161115-18929-iek29e.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1508998733&Signature=2ICy4YP1daVEDPJvzowzUwyQZwQ%3D&response-content-disposition=inlin

ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, [s. l.], v. 2, n. DEC, p. 1–13, 2014.

SCHÖTTLER, M. A. et al. Photosynthetic complex stoichiometry dynamics in higher plants: Biogenesis, function, and turnover of ATP synthase and the cytochrome b6f complex. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 66, n. 9, p. 2373–2400, 2015.

SHARMA, P. et al. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, [s. l.], v. 2012, p. 1–26, 2012.

SHARMA, S.; YADAV, N. Reactive Oxygen Species, Oxidative stress and ROS scavenging system in plants. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 8, n. 5, 2016.

SIMARD, S. W. et al. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. **Nature**, [s. l.], v. 388, n. 6642, p. 579–582, 1997.

SIMARD, S. W. et al. Net carbon transfer between *Pseudotsuga menziesii* var. *Glauca* seedlings in the field is influenced by soil disturbance. **Journal of Ecology**, [s. l.], v. 98, n. 2, p. 429–439, 2010.

SIMARD, S. et al. Resource Transfer Between Plants Through Ectomycorrhizal Fungal Networks. In: HORTON, T. (Ed.). **Mycorrhizal Networks**. 1. ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 133–176.

ŠIMPRAGA, M.; TAKABAYASHI, J.; HOLOPAINEN, J. K. Language of plants: Where is the word? **Journal of Integrative Plant Biology**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 343–349, 2016.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry to total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. **American journal of enology and viniculture**, [s. l.], v. 16, n. 48, p. 144–58, 1965. Disponível em: <http://garfield.library.upenn.edu/classics1985/A1985AUG6900001.pdf>

SIRPIÖ, S.; KANERVO, E.; ARO, E. M. Photosystem II: Assembly and Turnover of the D1 Protein. **Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition**, [s. l.], v. 3, p. 508–511, 2013.

SMÝKAL, P. et al. Pea (*Pisum sativum* L.) in the Genomic Era. **Agronomy**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 74–115, 2012.

TESTE, F. P. et al. Access to mycorrhizal networks and roots of trees: Importance for seedling survival and resource transfer. **Ecology**, [s. l.], v. 90, n. 10, p. 2808–2822, 2009.

TRIPATHY, B. C.; OELMÜLLER, R. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. **Plant Signaling and Behavior**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 1621–1633, 2012. USDA. **A community resource for exploring and utilizing genetic diversity in the USDA pea single plant plus collection**, 2017.

VASILIKIOTIS, C.; MELIS, A. Photosystem II reaction center damage and repair cycle: Chloroplast acclimation strategy to irradiance stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 91, n. 15, p. 7222–7226, 1994.

VENTURI, V.; KEEL, C. Signaling in the Rhizosphere. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 187–198, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.005>

VERHAGE, L. Alert! Alert! Stress-induced systemic signals unraveled. **Plant Journal**, [s. l.], v. 107, n. 1, p. 5–6, 2021.

VIA, S. et al. Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. **Trends in Ecology & Evolution**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 212–217, 1995.

WANG, N. Q. et al. Root exudate signals in plant–plant interactions. **Plant Cell and Environment**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 1044–1058, 2021.

WEN, T. et al. Root exudate chemistry affects soil carbon mobilization via microbial community reassembly. **Fundamental Research**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 697–707, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fmre.2021.12.016>>

WITZANY, G. Plant communication from biosemiotic perspective: Differences in abiotic and biotic signal perception determine content arrangement of response behavior. context determines meaning of meta-, inter- and intraorganismic plant signaling. **Plant Signaling and Behavior**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 169–178, 2006.

ZHAO, T. et al. Phenotypic diversity of pea (*Pisum sativum* L.) varieties and the polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity of their seeds. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 50, n. 5, 2020.

ZHU, J. K. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. **Cell**, [s. l.], v. 167, n. 2, p. 313–324, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>>

ZHU, H. et al. Effects of low light on photosynthetic properties, antioxidant enzyme activity, and anthocyanin accumulation in purple pak-choi (*Brassica campestris* ssp. *Chinensis* Makino). **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1–17, 2017.