



Métodos analíticos para o estudo da dinâmica de íons de Potássio em plantas através do estímulo de Raio X de Luz Síncrotron.

THIAGO F. C. OLIVEIRA¹; GABRIELA N. REISSIG²; GUSTAVO M. SOUZA³

¹ Universidade Federal de Pelotas – fthicar@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – gabriela.niemeyer.reissig@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – gumaia.gms@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Hoje temos a compreensão de como a comunicação é vital para qualquer sistema, de aviônica a microorganismos, sendo o transporte de informação crucial para existência. As plantas, sobretudo, por serem organismos sésseis e modulares necessitam que as informações captadas sejam comunicadas por toda a sua estrutura, quando necessário, de uma forma rápida e coesa sem a necessidade de um órgão controlador central. Por conseguinte, observamos no reino plantae um evolução nos estudos que dizem respeito a comunicação célula a célula e comunicação a longa distância (CHOI et al., 2016).

Comunicação sistêmica ou comunicação de longa distância tem como objetivo transportar para toda a planta informações captadas por seus sensores, por exemplo estímulos abióticos como déficit hídrico, ataque de hibervoria, etc. Esta comunicação se dá através de alguns mecanismos como, por exemplo, sinais elétricos que podem ser de diferentes tipos como potencial de ação (AP), potencial de variação (VP), potencial sistêmico (SP), entre outros. Porém, todos esses sinais elétricos se baseiam no transporte de íons (Ca^{+2} , K^{+1} , Cl^-) devido ao desequilíbrio da membrana plasmática se assemelhando a um capacitor causando assim uma diferença de potencial elétrico (ddp) que pode ser “descarregado” convenientemente (TOLEDO et al., 2019). Na realidade todos esses sinais podem ocorrer ao mesmo tempo na planta, o que torna o trabalho de caracterização mais dificultoso, prejudicando sua análise (VAN BEL e HAFFKE, 2013). Todavia, estudos recentes (DEBONO, 2013; SARAIVA et al., 2017; SOUZA et al., 2017) mostram que tais sinais mesmo misturados podem representar um conjunto de informação, que neste caso foi denominado de eletroma, que descreve as correntes iônicas em diferentes escalas de organização (SARAIVA et al., 2017).

Isso posto, este trabalho visa analisar métodos analíticos para caracterizar a dinâmica de influxo e efluxo de íons de Potássio em células vegetais.

2. METODOLOGIA

Para a captação dos dados foi realizada a medição do sinal da fluorescência do Potássio no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) na Linha de Luz SXS utilizando o detector SDD Vortex ME-4 com XSpres3 eletrônico com taxa de amostragem de um quadro a cada 0.1s. Nas amostras foram realizados cortes longitudinais de 2mm x 2mm para a remoção das células da camada epidérmica externa, após, foi aplicado um filme Ultralene para impedir a desidratação. As amostras utilizadas foram de soja com aproximadamente 3-4 semanas de idade, como 2 radicular de folha totalmente desenvolvidos.

Considerando que a energia de ligação para o K^{+1} é de 3,6 KeV e que nosso objetivo é a variação nas concentrações de Potássio entre células vizinhas, os sinais foram medidos usando uma energia abaixo de 5 KeV. Uma microsonda foi utilizada para redução da área amostral o que evitou um excesso de ruído (VANDER ENT, 2017). As análises foram feitas com o feixe ligado por 5 minutos, após uma aplicação de estresse mecânico e mais 15 minutos de amostragem. Ocorreram medições controle onde o estresse não fora aplicado.

A caracterização dos dados ocorreu utilizando um código em linguagem *Python* com as bibliotecas *numpy*, *scipy*, *matplotlib* e *obspy*. Os métodos matemáticos utilizados foram um filtro *Forward-Backward (filtfilt)* para filtragem e consequente redução do ruído e *Time Delay Method (TDM)* com o intuito de remover certas tendências oriundas das séries temporais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram captadas duas ROIS a cada medida, uma com a taxa de fluorescência do Potássio e outra para Cloro, fornecidos pelo Vortex ME-4. Neste trabalho foi utilizado apenas dados para o Potássio.

Como o feixe possui uma baixa de energia com o passar da análise, o primeiro passo a ser feito foi a normalização dos dados para 100eV. Dados que se encontram nas Figuras 1 e 2.

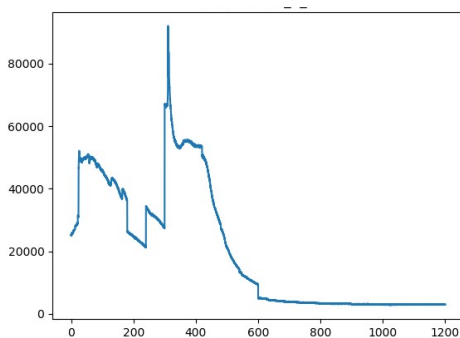


Figura 1: Quantidade de Potássio por Tempo. Amostra submetida ao estresse mecânico aos 300 segundos. Normalizada para 100eV.

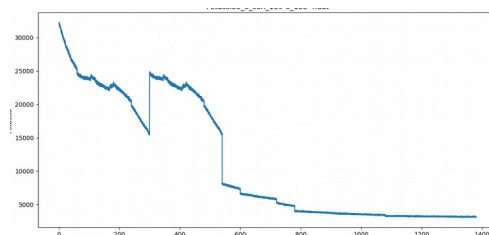


Figura 2: Quantidade de Potássio por Tempo. Amostra controle, sem aplicação do estresse. Normalizada para 100eV.

Nas Figuras 3 e 4, podemos ver o primeiro tratamento aplicado aos dados normalizados usando TDM, onde basicamente foi realizado uma subtração do estado (x_0) e o estado subsequente na série temporal (x_1) (ou seja, $x_1 - x_0$), como uma básica autocorrelação para as séries temporais. Este método apesar de matar a informação quantitativa pode nos fornecer uma análise qualitativa de uma maneira mais clara e objetiva sobre o comportamento do Potássio com o passar do tempo. Esta análise possibilitou uma visão mais clara do comportamento do Potássio, no entanto, ele não conseguiu eliminar picos oriundos de ruídos do equipamento.

Nas Figuras 5 e 6 encontramos os gráficos para as análises dos dados normalizados utilizando o método de filtragem *Forward-Backward* que utiliza da técnica computacional para armazenar todo sinal de entrada na memória do computador possibilitando assim a aplicação de um filtro recursivo, destacando a amplitude do filtro e zerando a resposta de fase. Esta técnica também se utiliza do teorema da convolução para igualar o produto ponto a ponto das transformadas

de Fourier de cada função de ida e de volta, para sair do domínio do tempo para o domínio da frequência, neste caso, e assim realizar a filtragem (CHUNG, 1991). Para este filtro utilizamos os parâmetros de *HighPass* de 0.5, *LowPass* de 32 e um *Notch* de 60. Estes parâmetros fazem parte do entendimento de que se trata de um sistema biológico, portanto, podemos considerar esses cortes, pois, a planta não passaria de uma taxa de 60Hz por exemplo.

A filtragem com *Forward-Backward* se mostrou muito eficiente no que se refere a rapidez e consumo computacional, diferentemente do método TDM, este método conseguiu eliminar os picos de ruídos e se a análise quantitativa não foi perdida.

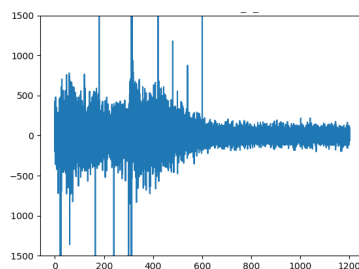


Figura 3: Quantidade de Potássio por Tempo. Análise de TDM para a amostra com estresse.

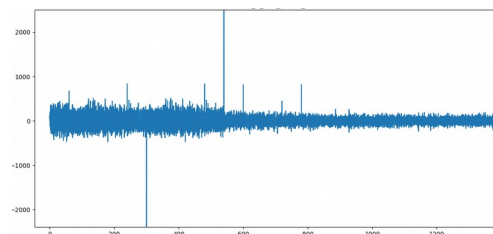


Figura 4: Quantidade de Potássio por Tempo. Análise de TDM para a amostra de controle.

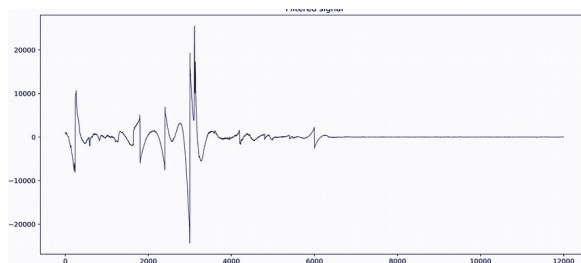


Figura 5: Quantidade de Potássio por Tempo. Análise de Forward-Backward para a amostra com estresse.

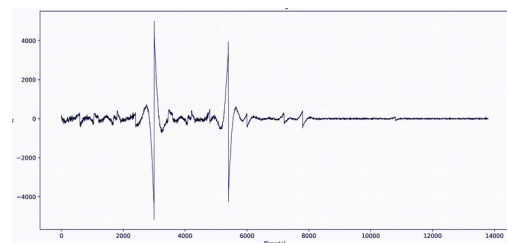


Figura 6: Quantidade de Potássio por Tempo. Análise de Forward-Backward para a amostra de controle.

4. CONCLUSÕES

As técnicas de caracterização empregadas serviram como um trabalho preliminar para futura análise dos dados obtidos na pesquisa de dinâmica de Potássio em plantas. Como fomos pioneiros ao utilizar a Linha SXS para analisar a dinâmica de um sistema macro biológico ainda vivo obtivemos muito aprendizado e desafios a ser superados. A metodologia estatística empregada se torna mais um destes desafios.

As análises, principalmente a filtragem *Forward-Backward*, obtiveram um bom desempenho no que diz respeito a eficiência computacional e acurácia dos dados. O próximo passo será realizar novas análises estatísticas para fins de confiabilidade mais aprofundada. Após, daremos início com as análises eletrofisiológica e por fim a conferência e escrita do trabalho realizado.



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHOI, W.; HILLEARY, R.; SWANSON, S.J.; KIM, SH.; GILROY, S. Rapid, long-distance electrical and calcium signalling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.29, n.67, p.287-307, 2016.

SARAIVA, G.F.R.; FERREIRA, A.S.; SOUZA G.M.; Osmotic stress decreases complexity underlying the electrophysiological dynamic in soybean. **Plant Biology**, v.19, p.702-708, 2017.

Souza, G.M.; Ferreira, A.S.; Saraiva, G.F.R.; Toledo, G.R.A. Plant “electrome” can be pushed toward a self-organized critical state by external cues: Evidences from a study with soybean seedlings subject to different environmental conditions. **Plant Signaling & Behavior**, v.12, n.3, p.99-116, 2017.

Van Bel, A.J.E.; Hafke, J.B. Calcium along the phloem pathway as a universal trigger and regulator of systemic alarms and signals. In: Baluska F (ed) Long-distance Systemic Signalling and Communication in Plants. **Berlin: Springer**, v.19, p.363-392. 2013.

van der Ent, A; et al. X-ray elemental mapping techniques for elucidating the ecophysiology of hyperaccumulator plants. **New Phytologist**, v.218, p.432-452, 2018.

Toledo, G.R.A.; et al. Plant electrome: the electrical dimension of plant life. **Springer Brazilian Society of Plant Physiology**, v.31, p.21–46, 2019

Chung, S.H.; Kennedy, R.A. Forward-backward non-linear filtering technique for extracting small biological signals from noise. **Journal of Neuroscience Methods**, v.40, p.71-86, 1991.