

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
UNIDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGRÁRIAS

**ENVOLVIMENTO DO ÁCIDO ABCÍSI
NA
REGULAÇÃO DA ABERTURA ESTOMÁTICA
EM CONDIÇÕES DE DÉFICE HÍDRICO**

Maria João Caboz B. Correia

FARO
1993



TESES
3D

Envolvimento do ácido
abscísico na regulação da
abertura estomática - Correia, M. J. C. B.



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
UNIDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGRÁRIAS

**ENVOLVIMENTO DO ÁCIDO ABCÍSICO NA
REGULAÇÃO DA ABERTURA ESTOMÁTICA
EM CONDIÇÕES DE DÉFICE HÍDRICO**

Maria João Caboz B. Correia

Dissertação apresentada na
Universidade do Algarve para
efeito da prestação de Provas de
Doutoramento

FARO
1993

SECRETARIA DE AGRICULTURA
SECRETARIA DE DOCUMENTAÇÃO

81294/13041
58 1.1
CCR - Env

1

ÍNDICE

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	v
I. INTRODUÇÃO	1
II. ESTADO ACTUAL DOS CONHECIMENTOS	
1. Ácido abcísico: principal agente de regulação da abertura estomática em situações de secura do solo?	
1.1. Resposta estomática à aplicação exógena de ácido abcísico	3
1.2. Resposta diferencial dos estomas das duas superfícies foliares ao défice hídrico e à aplicação exógena de ácido abcísico.....	5
1.3. Variação dos níveis endógenos de ácido abcísico em situações de défice hídrico.....	6
2. Como explicar as discrepâncias observadas entre a condutância estomática e o teor em ácido abcísico?	
2.1. Compartimentação intercelular do ácido abcísico	9
2.2. Compartimentação intracelular do ácido abcísico e a importância de conhecer a sua concentração apoplástica.	12
2.3. Variação da sensibilidade estomática à introdução de ácido abcísico no fluxo transpiratório	19
3. Papel desempenhado pelos outros reguladores de crescimento no controlo da abertura estomática em situações de défice hídrico	22
3.1. Citocininas	23
3.2. Auxinas	28
3.3. Giberelinas, etileno e outros reguladores de crescimento	31
III. MATERIAL E MÉTODOS	
1. Material vegetal	
1.1. <u>Commelina communis</u> L.	
1.2. <u>Helianthus annuus</u> L.	35
1.3. <u>Lupinus albus</u> L.	
1.4. <u>Vitis vinifera</u> L.	36
2. Medição da condutância foliar para a difusão do vapor de água em condições naturais	
2.1. Porómetros de difusão dinâmica	37
2.2. Porómetros de difusão em equilíbrio ("steady-state") ..	39

3.	Medição das taxas de trocas gasosas e da condutância foliar em condições de temperatura e humidade controladas	40
4.	Estudo da resposta estomática à aplicação exógena de reguladores de crescimento	
4.1.	Preparação das soluções de ácido abscísico e citocininas	
4.2.	Destacamento das folhas e aplicação dos reguladores de crescimento	44
5.	Determinação da área foliar	
6.	Determinação do teor em água do solo	45
7.	Estudo das relações hídricas das plantas	
7.1.	Potencial hídrico	
7.1.1.	Câmara de pressão	46
7.1.2.	Higrómetros de ponto de orvalho	48
7.2.	Potencial osmótico e potencial de pressão	50
7.3.	Teor relativo em água das folhas	
7.4.	Concentração de solutos e potencial osmótico no estado de máxima hidratação	53
8.	Recolha de amostras para quantificação do ácido abscísico	
8.1.	Amostras de tecidos foliares	54
8.2.	Amostras da solução xilémica foliar	55
9.	Quantificação do ácido abscísico	
9.1.	Cromatografia gasosa	56
9.1.1.	Extracção do ácido abscísico	57
9.1.2.	Purificação do ácido abscísico	58
9.1.3.	Metilação do ácido abscísico	59
9.1.4.	Quantificação do ácido abscísico por cromatografia gasosa com detector de captura de electrões	60
9.2.	Técnica imunoenzimática - ELISA tipo competitivo	61
10.	Determinação das concentrações de glucose, frutose e sacarose	65
11.	Estimativa da concentração de ácido abscísico no xilema, tendo em conta a contaminação floémica dos exsudados ..	66
12.	Análise estatística dos resultados	68
IV.	EFEITOS DA DESIDRATAÇÃO DAS RAÍZES SOBRE A ABERTURA ESTOMÁTICA, NA AUSÊNCIA DE DÉFICE HÍDRICO FOLIAR	
1.	Introdução - Sinais positivos <u>versus</u> sinais negativos ou cumulativos	69
2.	Material vegetal e condições experimentais	71
3.	Resultados	73
4.	Discussão	78
5.	Conclusões	81

V.	EFEITOS DA IMPOSIÇÃO E ALÍVIO DE DÉFICES HÍDRICOS SEVEROS SOBRE A ABERTURA ESTOMÁTICA	
1.	Introdução - Efeitos a <u>posteriori</u> dos défices hídricos sobre a abertura dos estomas	83
2.	Efeitos da imposição e alívio de défices hídricos severos na condutância foliar e na concentração de ABA na epiderme abaxial de <u>Commelina communis</u> L.	
2.1.	Material vegetal e condições experimentais	92
2.2.	Resultados	93
2.3.	Discussão	96
3.	Efeitos da imposição e alívio de défices hídricos severos na condutância foliar e na concentração de ABA no xilema de <u>Helianthus annuus</u> L.	
3.1.	Material vegetal e condições experimentais	99
3.2.	Resultados	103
3.3.	Discussão	110
4.	Efeitos da imposição e alívio de défices hídricos severos na condutância foliar e na concentração de ABA no xilema de <u>Lupinus albus</u> L.	
4.1.	Material vegetal e condições experimentais	
4.1.1.	Ensaio com plantas em desenvolvimento reprodutivo ...	115
4.1.2.	Ensaio com plantas em desenvolvimento vegetativo	116
4.2.	Resultados	
4.2.1.	Ensaio com plantas em desenvolvimento reprodutivo ...	117
4.2.2.	Ensaio com plantas em desenvolvimento vegetativo	131
4.3.	Discussão	145
5.	Conclusões	154
VI.	EFEITO DA DISPONIBILIDADE DE ÁGUA NO SOLO NA VARIAÇÃO DA CONDUTÂNCIA FOLIAR DE <u>Vitis vinifera</u> L. EM CONDIÇÕES DE CAMPO	
1.	Introdução - Variação da abertura estomática ao longo do dia	157
2.	Material vegetal e condições experimentais	161
3.	Resultados	
3.1.	Variação da condutância foliar em plantas intactas	
3.1.1.	1990	163
3.1.2.	1991	168
3.2.	Resposta estomática à aplicação exógena de ácido abcísico	
3.2.1.	1991	177

3.2.2. 1992	179
4. Discussão	184
5. Conclusões	192
VII. CONCLUSÕES GERAIS	193
RESUMO	197
ABSTRACT	199
REFERÊNCIAS	201
AGRADECIMENTOS	225

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

a_a	actividade da água
A	taxa de fotossíntese aparente
ABA	ácido abcísico
ADP	adenosina bifosfatada
ATP	adenosina trifosfatada
BA	benziladenina
c_s	concentração osmolar de solutos
CEPA	ácido 2-cloroetilfosfónico
CIN	cinetina
e_a	pressão de vapor de água no ar
e_{sf}	pressão de vapor saturante à temperatura da folha
$e_{sf}-e_a$	défice de pressão de vapor entre a folha e o ar
E	taxa de transpiração
ELISA	"enzyme-linked immunosorbent assay"
Et-ABA	etilabcisato
GA ₃	ácido 3-giberélico
g	condutância para a difusão do vapor de água
I_p	densidade de fluxo fotónico incidente
IAA	ácido indol-3-acético
IRGA	analizador de gases por infravermelho
ln	logarítmo natural
m_s	massa foliar seca
m_t	massa foliar no estado de máxima hidratação
Me-ABA	metilabcisato
NADPH	nicotinamida dinucleótido fosfato, reduzido
n_a	número de moles de água
n_s	número de osmoles de solutos
P_i	pressão parcial de CO ₂ nos espaços intercelulares
P	nível de significância estatística
PAR	radiação fotossinteticamente activa (usualmente entre 400 nm e 700nm)
r^2	quadrado do coeficiente de correlação
R	constante dos gases
T_f	temperatura foliar
V	volume
W	massa de água
θ	teor relativo em água
σ	tensão superficial da água
Ψ	potencial hídrico

Ψ_p potencial de pressão
 Ψ_{Π} potencial osmótico
 $\Psi_{\Pi 100}$ potencial osmótico no estado de máxima hidratação

I. INTRODUÇÃO

O presente trabalho pretende contribuir para a elucidação dos mecanismos fisiológicos que regulam a abertura estomática e as perdas de água por transpiração, em situações de reduzida humidade no solo. Nestas condições, a taxa de assimilação de carbono é também regulada em larga medida pelas variações na abertura dos estomas, pelo menos no curto termo.

No meio terrestre a água encontra-se essencialmente no solo, onde não penetra a radiação solar necessária à fotossíntese. Assim, o sucesso da colonização da parte emersa do planeta pelas plantas implicou a separação entre as estruturas de absorção de água (subterrâneas) e as superfícies fotossintetizantes (aéreas) e, conseqüentemente, a diferenciação de um sistema vascular de transporte que assegura o fornecimento de água até à parte aérea.

A água move-se espontaneamente no sistema solo-planta-atmosfera no sentido de potencial hídrico decrescente. No entanto, as diferenças de potencial hídrico que se registam entre os tecidos foliares e a atmosfera (muito pobre em água) são geralmente bastante superiores às que ocorrem entre o solo e as folhas. Daí poderiam resultar elevadas taxas de evaporação, as quais, combinadas com a resistência ao transporte de água desde o solo até às folhas, conduziriam rapidamente à desidratação dos tecidos e à perda de actividade metabólica. Tal situação não é generalizada devido à interposição de consideráveis resistências à perda de água pelas folhas.

A desidratação das folhas é restringida pelo facto de serem delimitadas por uma epiderme cutinizada relativamente impermeável. Contudo, a cutina impede a transferência não só da água mas também do dióxido de carbono. Assim, a existência de epidermes cutinizadas inviabilizaria o processo fotossintético caso a epiderme foliar não fosse munida de numerosos poros - os estomas - que possibilitam as trocas gasosas entre as folhas e a atmosfera.

Os estomas são delimitados por um par de células especializadas - as células guarda. Dadas as propriedades mecânicas das paredes destas células, os estomas abrem quando a pressão de turgescência e o volume das células guarda aumentam por estas células absorverem água, de acordo com a diferença entre o seu potencial hídrico e o do tecido epidérmico adjacente. As referidas diferenças de turgescência, das células guarda relativamente às células epidérmicas adjacentes, estão associadas

a diferenças de potencial osmótico, as quais são geradas por mecanismos activos de trocas iónicas.

O estudo do comportamento das células guarda tem revelado que estas respondem a uma grande variedade de estímulos, tanto internos como externos. Particularmente importante em termos do controlo do estado hídrico das plantas é a resposta de encerramento dos estomas provocada pelo abaixamento do teor em água do solo, na medida em que dela resulta a limitação da transpiração em situações propícias ao desenvolvimento de défices hídricos internos.

O presente trabalho insere-se no estudo do controlo hormonal do encerramento estomático em situações de défice hídrico. A hipótese de o encerramento estomático então verificado estar associado à produção pelas raízes de um inibidor da abertura dos estomas foi avaliada no capítulo IV, analisando os efeitos da remoção das raízes desidratadas sobre a recuperação da condutância estomática. Nos capítulos seguintes são apresentados os resultados de ensaios cuja realização visou testar a hipótese de o ácido abscísico ser o principal agente causador do encerramento dos estomas.

Apesar de este tema ter sido alvo de inúmeros trabalhos, não foi ainda completamente elucidado qual o papel do ácido abscísico, nomeadamente no que diz respeito aos efeitos a posteriori do défice hídrico sobre a abertura estomática, bem como na variação da condutância estomática ao longo do dia. Estes dois problemas serão abordados, respectivamente, nos capítulos V e VI. Simultaneamente, com o presente trabalho procurou-se contribuir para a melhoria dos métodos de avaliação da concentração xilémica de ácido abscísico, sem o que se tornaria difícil atingir os objectivos propostos.

Apesar de o principal objectivo deste trabalho ser a avaliação do papel desempenhado pelo ácido abscísico na regulação da abertura estomática, este composto não é o único regulador de crescimento que afecta a abertura dos estomas. Visto que a resposta dos estomas ao ácido abscísico pode ser alterada pela presença de outros reguladores de crescimento, no capítulo inicial inclui-se também um breve resumo dos dados bibliográficos disponíveis quanto ao eventual envolvimento de outros reguladores de crescimento no controlo da condutância estomática.

II. ESTADO ACTUAL DOS CONHECIMENTOS

A hipótese de os reguladores endógenos de crescimento constituírem agentes naturais de regulação da abertura estomática em situações de carência de água no solo é sustentada por um grande número de trabalhos publicados nas 2 últimas décadas. Estes revelam que, não só a aplicação exógena de reguladores de crescimento naturais, ou seus análogos, pode resultar em significativas alterações da abertura estomática, como o desenvolvimento de défices hídricos, tanto ao nível do solo como das folhas, está geralmente associado a modificações do balanço hormonal das plantas.

1. Ácido abscísico: principal agente de regulação da abertura estomática em situações de *secura* do solo?

De entre os diversos reguladores endógenos de crescimento vegetal, é o ácido abscísico (ABA) aquele cuja hipótese de participação no controlo estomático é mais consistente. Tal hipótese baseia-se não só nas alterações da concentração endógena de ABA em situações de défice hídrico, como nos efeitos da aplicação exógena deste composto, nomeadamente, na semelhança da sensibilidade diferencial dos estomas abaxiais e adaxiais ao défice hídrico e à aplicação exógena de ácido abscísico.

1.1. Resposta estomática à aplicação exógena de ácido abscísico.

A hipótese de o ácido abscísico desempenhar um papel relevante na regulação da abertura estomática baseia-se, particularmente, nos estudos levados a cabo com o mutante *flacca* do tomateiro (Imber & Tal, 1970; Bradford *et al*, 1983). Este mutante, que possui uma deficiência genética que o incapacita de sintetizar ácido abscísico, murcha mesmo quando a escassez de água é mínima, porque os seus estomas nunca fecham completamente. No entanto, a aplicação de ácido abscísico sintético - (+)ABA - seja por introdução no fluxo transpiratório ou aspersão foliar, resulta na reversão fenotípica deste mutante, aumentando a capacidade de encerramento dos seus estomas.

Mas não é só naquele mutante de tomateiro que a aplicação exógena de ABA induz o encerramento dos estomas. A redução da abertura estomática constitui a resposta generalizada à aplicação

exógena de ácido abscísico sintético [(+)-ABA], tanto em epidermes destacadas (Horton, 1971; Das *et al*, 1976; Milborrow, 1980; Wardle & Short, 1981; Wilson, 1981; Jewer *et al*, 1982; Snaith & Mansfield, 1982a,b; Blackman & Davies, 1983), como em folhas intactas, destacadas (Mittelheuser & van Steveninck, 1969; Cooper *et al*, 1972; Davies, 1978; Ackerson, 1980; Radin *et al*, 1982; Radin, 1984; Henson & Turner, 1991) ou não (Mizrahi *et al*, 1970; Kriedemann *et al*, 1972; Davies, 1978; Bradford, 1983; Burschka *et al*, 1983). Tal resposta foi detectada, nomeadamente, em Lupinus luteus (Henson & Turner, 1991), cuja sensibilidade estomática ao ácido abscísico tinha sido posta em dúvida por um trabalho anterior (Lancaster *et al*, 1977).

Kriedemann *et al* (1972) verificaram, em folhas destacadas de Xanthium strumarium, que o enantiómero natural do ácido abscísico - (+)ABA - era duas vezes mais activo (ao nível dos estomas) do que a mistura de isómeros sintéticos - (+)ABA. Este facto levou-os a sugerir que a abertura estomática não seria afectada pelo enantiómero (-), o qual não ocorre na natureza. Tal veio a ser posteriormente confirmado, por Milborrow (1980), em epidermes destacadas de Commelina communis e de Trapaeolum majus. A resposta de encerramento dos estomas após aplicação de (+)ABA parece assim ser específica do enantiómero natural (+), o que reforça a hipótese de o ácido abscísico endógeno constituir um agente natural de promoção do encerramento dos estomas.

No mesmo sentido apontam as observações de que o ácido abscísico é capaz de afectar as relações osmóticas das células guarda. Concretamente, aquele regulador de crescimento estimula o efluxo de iões potássio (Weyers & Hillman, 1980; MacRobbie, 1981), cloro (MacRobbie, 1981) e malato (van Kirk & Raschke, 1978) a partir das células guarda, daí resultando o estabelecimento de um gradiente epidérmico de potencial osmótico que conduzirá ao encerramento dos estomas (Zeiger, 1983).

Por outro lado, quando a aplicação exógena de ABA é prolongada, Quarrie & Jones (1977) detectaram, em plantas de trigo, não só a redução da área foliar, como a diminuição do número de estomas por folha e o aumento da produção de tricomas. Estes resultados indicam que a aplicação exógena de ácido abscísico pode limitar a transpiração das plantas por duas vias: induzindo o rápido encerramento dos estomas e, a médio prazo, alterando o desenvolvimento foliar.

1.2. Resposta diferencial dos estomas das duas superfícies foliares ao défice hídrico e à aplicação exógena de ácido

abcísico.

Apesar do desenvolvimento de déficit hídrico conduzir ao encerramento dos estomas tanto da epiderme abaxial como adaxial, nem sempre o decréscimo da condutância ocorre simultaneamente nas duas superfícies da folha. Estudos levados a cabo em plantas de soja (Sionit & Kramer, 1976), algodoeiro (Jordan et al, 1975), Xanthium strumarium (Mott & O'Leary, 1984) e sorgo (Turner et al, 1978) indicaram que os estomas adaxiais encerravam mais precocemente em situações de déficit hídrico. No caso de girassol, apesar de Sionit & Kramer (1976) não terem detectado qualquer diferença de sensibilidade ao stress hídrico entre as duas superfícies foliares, Turner et al (1978) e Mott & O'Leary (1984) verificaram que a amplitude da resposta dos estomas adaxiais era maior.

Apesar de nos trabalhos anteriormente referidos se ter detectado uma maior sensibilidade ao déficit hídrico por parte dos estomas adaxiais, isso nem sempre se verifica. Pereira et al (1987), por exemplo, não detectaram qualquer diferença na resposta estomática ao déficit hídrico por parte das duas superfícies de folhas adultas de Eucalyptus globulus. Em contrapartida, no caso de Lupinus angustifolius (Henson & Turner, 1991) e L. cosentinii (Henson et al, 1989b) o déficit hídrico resulta no encerramento mais acentuado dos estomas abaxiais.

As diferenças interespecíficas no que diz respeito à sensibilidade estomática diferencial das duas superfícies foliares ocorrem também noutras situações de stress, nas quais foi sugerido o envolvimento do ABA para explicar o encerramento estomático então verificado, como por exemplo em condições de encharcamento do solo (Bradford, 1983; Jackson & Hall, 1987; Zhang & Davies, 1987a; Jackson, 1991). Enquanto que em Pisum sativum o encharcamento afecta igualmente os estomas das duas superfícies foliares (Jackson & Hall, 1987), em Populus deltoides, Salix nigra e Eucalyptus camaldulensis, os estomas adaxiais fecham mais rapidamente do que os abaxiais quando as plantas são sujeitas ao alagamento (Pereira & Kozlowski, 1977).

Quando se procede à aplicação exógena de ácido abcísico foram também detectadas diferenças interespecíficas quanto à sensibilidade diferencial dos estomas abaxiais e adaxiais. Assim, enquanto em Commelina communis (Pemadasa, 1982a) e Xanthium strumarium (Raschke, 1975) os estomas adaxiais são aparentemente mais sensíveis ao ácido abcísico do que os estomas abaxiais, precisamente o inverso ocorre em Lupinus luteus (Lancaster et al,

1977; Henson & Turner, 1991), L. cosentinii e L. angustifolius (Henson & Turner, 1991).

Contudo, Henson & Turner (1991) concluíram que a sensibilidade das células guarda para o ácido abscísico não difere entre as duas superfícies foliares. Segundo aqueles autores, a quantidade de ABA que é necessário acumular-se por complexo estomático para que se desencadeie o encerramento estomático é igual nas duas superfícies foliares. Diferenças quanto à frequência estomática estarão na origem da aparente sensibilidade diferencial das duas superfícies foliares para o ácido abscísico: a frequência estomática era maior na página adaxial do que na página abaxial das 3 espécies de Lupinus cuja superfície abaxial se revelou ser mais sensível ao déficit hídrico; conseqüentemente, para uma dada concentração de ABA no fluxo transpiratório, a taxa de acumulação daquele composto por complexo estomático era menor na superfície adaxial do que na abaxial (Henson & Turner, 1991). Em contrapartida, nas espécies lenhosas anfistomáticas em que Pereira & Kozlowski (1977) detectaram uma maior sensibilidade da superfície adaxial ao encharcamento do solo, a frequência estomática era superior na página abaxial do que na adaxial.

Note-se que, em Lupinus angustifolius e L. cosentinii, o decréscimo da condutância estomática é mais acentuado na superfície abaxial do que na adaxial tanto em resposta à aplicação exógena de ácido abscísico (Henson & Turner, 1991), como ao déficit hídrico (Henson et al, 1989b; Henson & Turner, 1991). Em contrapartida, a redução da abertura dos estomas de Xanthium strumarium é mais acentuada na página adaxial do que na abaxial tanto em resposta ao déficit hídrico (Mott & O'Leary, 1984) como à aplicação exógena de ABA (Raschke, 1975). Estes resultados sugerem que a sensibilidade relativa dos estomas abaxiais e adaxiais ao déficit hídrico poderá ser determinada pela sensibilidade relativa das duas superfícies foliares ao ácido abscísico.

1.3. Variação dos níveis endógenos de ácido abscísico em situações de déficit hídrico.

O envolvimento do ácido abscísico no sistema interno de controlo da abertura dos estomas em situações de déficit hídrico é também suportado pela constatação de que o encerramento dos estomas, então verificado, é acompanhado pelo aumento da concentração endógena daquele regulador de crescimento. As primeiras indicações nesse sentido datam de 1969, quando Wright &

Hiron verificaram que o teor em (+)ABA de folhas de trigo aumentava 40 vezes quando eram colocadas numa atmosfera seca e a sua massa foliar sofria um decréscimo de 9%. A partir de então têm-se vindo a acumular provas de que o desenvolvimento de défice hídrico foliar, provocado tanto por escassez de água no solo, como por desidratação de folhas destacadas, é acompanhado pelo aumento da concentração foliar em ácido abcísico nas mais variadas espécies (Loveys & Kriedemann, 1973; Beardsell & Cohen, 1975; Aharoni et al, 1977; Loveys, 1977; Hoad, 1978; Ackerson, 1980; Pierce & Raschke, 1980, 1981; Zeevaart, 1983; Henson et al, 1989b; Norman et al, 1990; Liu & Dickmann, 1992). Pelo contrário, a re-hidratação foliar resulta na redução dos níveis de ácido abcísico (Beardsell & Cohen, 1975; Aharoni et al, 1977; Pierce & Raschke, 1981; Zeevaart, 1983; Liu & Dickmann, 1992).

O efeito do défice hídrico foliar sobre a acumulação de ABA parece resultar, essencialmente, do estímulo da biossíntese deste composto e não da inibição da sua degradação (Harrison & Walton, 1975; Pierce & Raschke, 1981; Meyer et al, 1989), nem da sua libertação a partir de formas conjugadas (Pierce & Raschke, 1981; Lehmann & Schütte, 1984; Meyer et al, 1989). Em contrapartida, a redução dos níveis de ácido abcísico durante a re-hidratação foliar está associada, não só à inibição da síntese deste regulador de crescimento, como ao estímulo da sua conversão em ácido faseico e di-hidrofaseico (Pierce & Raschke, 1981; Zeevaart, 1983).

A acumulação de ácido abcísico em folhas sujeitas a défice hídrico parece depender da síntese desta hormona ao nível das células do mesófilo. O desenvolvimento de défice hídrico foliar resulta na acumulação de ABA em epidermes de Vicia faba (Loveys, 1977; Weiler et al, 1982; Harris & Outlaw, 1991), Commelina communis e Tulipa gesneriana (Singh et al, 1979). Contudo, Loveys (1977) não detectou qualquer aumento da concentração de ABA em fragmentos de epiderme, destacados de Vicia faba, após estes serem submetidos a um stress osmótico suficientemente intenso para induzir a acumulação daquela hormona em folhas intactas. Estes resultados indicam que, ao nível das folhas, a capacidade de biossíntese do ácido abcísico se encontra restrita ao mesófilo.

Quando se reduz a disponibilidade de água no solo, as variações da condutância estomática encontram-se, por vezes, mais estreitamente relacionadas com o estado hídrico do solo do que com o estado hídrico foliar (Gollan et al, 1985; Turner et al, 1985; Henson et al, 1989a; Jensen et al, 1989). Em alguns

trabalhos verificou-se, inclusivamente, que a secagem do solo induz o encerramento dos estomas mesmo quando não se registam variações significativas no potencial hídrico e no potencial de pressão das folhas (Bates & Hall, 1981; Blackman & Davies, 1985; Zhang *et al.*, 1987; Henson *et al.*, 1989a; Jensen *et al.*, 1989; Saliendra & Meinzer, 1989; Zhang & Davies, 1989a; Trejo & Davies, 1991; Liu & Dickmann, 1992). Este tipo de resposta estomática ocorre particularmente em plantas cujo sistema radicular é capaz de explorar um volume de solo relativamente grande e/ou quando a secagem do solo não é homogénea, ou seja, quando coexistem no solo zonas que ainda contêm água suficiente para assegurar a manutenção da turgescência foliar e outras zonas nas quais a secura é acentuada. Um decréscimo significativo da condutância estomática foi também detectado em plantas não regadas mas cuja turgescência foliar era mantida pela pressurização do sistema radicular (Gollan *et al.*, 1986, 1992; Munns & King, 1988; Schurr *et al.*, 1992). Estas observações apoiam a hipótese, que tem começado a tomar consistência nos últimos anos, segundo a qual as raízes poderão comunicar ao resto da planta a ocorrência de perturbações no ambiente edáfico, nomeadamente as causadas pela redução da disponibilidade de água (Davies *et al.*, 1986, 1990; Davies & Zhang, 1991).

As raízes constituem um dos locais de síntese de ácido abscísico, tendo-se verificado que a sua concentração aumenta significativamente quando se desidratam raízes destacadas de várias espécies (Walton *et al.*, 1976; Cornish & Zeevaart, 1985b; Robertson *et al.*, 1985; Lachno & Baker, 1986; Zhang & Davies, 1987b). Por outro lado, quando a desidratação radicular é imposta em plantas intactas, mesmo em casos em que a desidratação afecta uma pequena fracção do sistema radicular, verificou-se que a concentração de ABA quadruplicava, tanto no xilema de plantas de girassol (Neales *et al.*, 1989) como de milho (Zhang & Davies, 1990). De acordo com Hartung & Slovick (1991), o referido aumento da concentração xilémica de ácido abscísico é suficiente para provocar a acumulação daquele regulador de crescimento ao nível das folhas. Estes dados sugerem que a comunicação da informação quanto ao estado hídrico das raízes, envolvendo a variação do transporte de ABA para a parte aérea, poderá constituir um sistema bastante eficaz, permitindo que as células guarda detectem as variações do estado hídrico do solo, mesmo quando estas afectam somente uma fracção limitada do sistema radicular (Davies *et al.*, 1990; Davies & Zhang, 1991).

Apesar dos dados referidos até aqui apontarem no sentido de

o ácido abscísico ser um elemento preponderante no sistema de regulação da abertura estomática em situações de déficit hídrico, algumas discrepâncias entre as variações da concentração de ABA e da condutância estomática parecem não ser consistentes com esta hipótese. Concretamente, o encerramento estomático pode ocorrer antes que seja detectado qualquer aumento da concentração daquele regulador de crescimento (Beardsell & Cohen, 1975; Ackerson, 1982 e Trejo & Davies, 1991, por exemplo). Noutros casos, apesar da concentração de ABA aumentar, tal não parece ser suficiente para induzir a resposta de encerramento verificada, quando se consideram os dados obtidos aquando da aplicação exógena de ácido abscísico (Munns & King, 1988).

2. Como explicar as discrepâncias observadas entre a condutância estomática e o teor em ácido abscísico? .

2.1. Compartimentação intercelular do ácido abscísico.

Apesar de Henson *et al* (1989b) terem verificado que, após a supressão da rega a plantas de Lupinus cosentinii e Triticum aestivum, o decréscimo da abertura estomática se encontrava correlacionado com o aumento da concentração foliar global de ácido abscísico, outros trabalhos têm revelado algumas discrepâncias entre a resistência estomática e o teor foliar daquele regulador de crescimento. Quando folhas de Zea mays eram destacadas e submetidas a condições atmosféricas conducentes a altas taxas de transpiração, por exemplo, Beardsell & Cohen (1975) constataram que o aumento da concentração de ABA era posterior ao início do encerramento dos estomas. Estas discrepâncias entre condutância estomática e níveis foliares de ácido abscísico endógeno não são incompatíveis com a hipótese de esta hormona ter um papel preponderante no controlo do encerramento dos estomas. Visto que os receptores específicos do ácido abscísico se localizam no plasmalema das células guarda (Hornberg & Weiler, 1984), provavelmente será a concentração de ABA nessas células, ou suas imediações, que estará relacionada com o fecho dos estomas e não o nível foliar global. Correspondendo as células guarda a uma pequena fracção do volume da folha, o conteúdo foliar em ácido abscísico será um fraco indicador da sua concentração junto dos receptores, no caso de a hormona não se encontrar homogeneamente distribuída pelos diferentes tecidos foliares.

Em experiências nas quais foram aplicadas soluções de ¹⁴C-

ABA a folhas de várias espécies, concluiu-se ser necessário menos de 0,5 pmol de ABA, por mm² de área foliar, para induzir o encerramento dos estomas (Kriedemann et al, 1972; Itai et al, 1978). A partir dos dados de Loveys (1977), Davies & Mansfield (1983) calcularam que o ácido abscísico existente em folhas túrgidas de espinafre corresponderia a uma concentração de 5,6 pmol mm⁻² quando expresso em função da área foliar, ou seja, superior à concentração mínima capaz de desencadear o encerramento estomático de acordo com Kriedemann et al (1972) e Itai et al (1978). Parece assim realista pensar que uma rápida redistribuição do ABA, no sentido da sua acumulação ao nível da epiderme, poderá ser suficiente para promover o fecho dos estomas na fase inicial de desenvolvimento do défice hídrico foliar, antes de se registar qualquer aumento da concentração daquele regulador de crescimento na globalidade da folha.

Os resultados de Hartung et al (1983) indicam que um dos efeitos iniciais da desidratação foliar é, efectivamente, o de conduzir à redistribuição do ácido abscísico pré-existente, no sentido da sua acumulação na epiderme. Em fragmentos foliares de Valerianella locusta, previamente marcados com ABA radioactivo, aqueles autores detectaram a libertação da hormona a partir do mesófilo e o seu rápido aparecimento na epiderme, em condições de elevada evapotranspiração. Por outro lado, Weiler et al (1982) constataram que, na fase inicial de desenvolvimento do défice hídrico em folhas de faveira, a acumulação de ABA era mais rápida na epiderme do que no mesófilo, o mesmo se verificando em folhas de Commelina communis (Doerffling & Tietz, 1985). O trabalho de Zhang et al (1987) indica que, mesmo na ausência de défice hídrico foliar, o ABA transportado no fluxo transpiratório pode acumular-se na epiderme. Aquelles autores verificaram que a desidratação parcial do sistema radicular de Commelina communis não afectava o teor foliar global em ácido abscísico, mas este composto acumulava-se na epiderme ao fim de 4 dias de tratamento.

Apesar dos trabalhos anteriormente referidos demonstrarem que a acumulação de ácido abscísico é mais rápida ao nível da epiderme do que no resto da folha, as variações da concentração epidérmica daquele regulador de crescimento não permitem explicar o encerramento dos estomas na fase inicial de desenvolvimento do défice hídrico. Efectivamente, em folhas destacadas de Commelina communis, Doerffling & Tietz (1985) verificaram que a acumulação de ácido abscísico ao nível da epiderme ocorria posteriormente a ter sido detectado o início do encerramento dos estomas. No caso do trabalho de Zhang et al (1987), a acumulação de ABA na

epiderme foi detectada no dia em que ocorria a redução mais substancial da condutância estomática. Contudo, esta tinha começado a decrescer no dia anterior, altura em que também já se tinha registado um significativo aumento da concentração de ácido abcísico nas raízes desidratadas.

Uma possível explicação para o aumento do teor epidérmico em ABA só ser detectado após o início do fecho estomático, seria a ocorrência prévia de uma redistribuição da hormona ao nível da própria epiderme, no sentido da sua acumulação nas células guarda. Esta hipótese parecia ser apoiada pela observação de que, quando o meio de incubação de epidermes de Commelina communis contém ácido abcísico radioactivo, este se acumula preferencialmente nas células guarda (Itai et al, 1978; Weyers & Hillman, 1979; Doerffling & Tietz, 1985). Por outro lado, quando folíolos de faveira são desidratados, Harris & Outlaw (1991) verificaram que a acumulação de ácido abcísico era mais rápida nas células guarda do que nas células epidérmicas e nas células do mesófilo. Contudo, a acumulação preferencial de ABA exógeno nas células guarda ocorre também em epidermes não vivas (Doerffling & Tietz, 1985), assim como quando os estomas estão fechados (Itai et al, 1978). Por outro lado, observações recentes indicam que, em folhas túrgidas e com os estomas abertos, as células guarda possuem concentrações de ácido abcísico muito superiores às existentes tanto nas células do mesófilo (Lahr & Raschke, 1988), como nas restantes células do tecido epidérmico (Brinckmann et al, 1990). As elevadas concentrações de ABA nas células guarda podem estar relacionadas com o facto de, ao nível das folhas, só aquelas células possuírem mecanismos de acumulação de ácido abcísico associados à existência de transportadores membranares daquela hormona (Hartung & Slovik, 1991). Estes resultados indicam que a acumulação preferencial de ácido abcísico nas células guarda será pouco relevante para a determinação da abertura estomática. Itai et al (1978) sugeriram que a acumulação de ABA naquelas células poderia mesmo constituir uma forma de sequestração da hormona, de modo a afastá-la dos seus locais de acção. Esta hipótese é reforçada por trabalhos mais recentes nos quais foi posta em evidência a capacidade da epiderme (Singh et al, 1979) e, particularmente, das células guarda (Grantz et al, 1985) converterem o ácido abcísico em metabolitos inactivos ao nível dos estomas.

Hartung (1983) detectou respostas de encerramento estomático em epidermes destacadas de Valerianella locusta, quando estas eram incubadas em soluções de ácido abcísico, mesmo em condições

nas quais esta hormona não penetra nas células guarda. Estes resultados demonstram que a acumulação de ABA nas células guarda não é necessária para a indução do encerramento estomático. Para além disso, os resultados de Hartung (1983) sugerem que o ABA actuará ao nível do apoplasto das células guarda. Consequentemente, em termos de fisiologia estomática será mais importante conhecer a concentração apoplástica de ácido abscísico do que a sua concentração no interior das células guarda.

2.2. Compartimentação intracelular do ácido abscísico e a importância de conhecer a sua concentração apoplástica.

Tendo em conta que as células guarda diferenciadas não possuem plasmodesmos (Palevitz, 1981; Sack, 1987), é improvável que o transporte do ABA até àquelas células se processe por via simplástica, quer este regulador de crescimento provenha do mesófilo ou tenha origem radicular. Não só o transporte do ácido abscísico até às células guarda se deverá processar essencialmente por via apoplástica, mais precisamente através do fluxo transpiratório, como a ligação desta hormona aos receptores específicos existentes nas células guarda parece ocorrer na face externa do plasmalema daquelas células (Hartung, 1983; Hornberg & Weiler, 1984). Consequentemente, qualquer tentativa de explicar o controlo da abertura estomática com base na acção do ABA, deverá ter em consideração os processos de compartimentação intracelular deste regulador endógeno de crescimento.

A redistribuição intracelular do ABA é controlada por gradientes de pH. O ácido abscísico acumula-se nos compartimentos celulares mais alcalinos, nos quais aquele ácido fraco se encontra principalmente na sua forma aniónica para a qual as membranas são impermeáveis (Heilmann *et al.*, 1980; Kaiser & Hartung, 1981; Hartung & Slovik, 1991).

Diferenças quanto ao processo de compartimentação intracelular do ácido abscísico poderão contribuir para explicar os efeitos da idade foliar sobre a sensibilidade estomática ao desenvolvimento de défices hídricos. Apesar de Zhang & Davies (1989b) terem concluído que a idade das folhas não afecta a resposta dos estomas de girassol ao desenvolvimento de défice hídrico, outros trabalhos indicam que a sensibilidade estomática ao défice hídrico varia com a idade das folhas. Contudo, o sentido dessa variação não é constante. Enquanto que em plantas de Citrus sinensis o potencial hídrico em que ocorre o encerramento dos estomas é inferior nas folhas mais velhas do que

nas folhas jovens (Syvertsen, 1982), em plantas de algodoeiro (Jordan et al, 1975; Radin, 1981), milho, sorgo e tabaco (Turner, 1974), foi detectado um padrão de encerramento sequencial dos estomas precisamente contrário.

Turner (1974) constatou que, apesar de os estomas das folhas jovens encerrarem a potenciais hídricos inferiores àqueles em que ocorria o fecho estomático nas folhas mais velhas, estas últimas possuíam um potencial osmótico superior ao das folhas jovens, pelo que a relação entre a condutância estomática e o potencial de pressão não variava com a idade foliar. Estes resultados sugerem que a aparente sensibilidade diferencial ao déficit hídrico, por parte de folhas com diferente idade, estaria relacionada com os efeitos da idade foliar sobre as relações hídricas celulares. A acumulação de ABA nas folhas (Ackerson & Radin, 1983) e a sua libertação no apoplasto (Hartung et al, 1983) parecem ser desencadeadas pela redução do volume do simplasto, não sendo uma resposta à diminuição do potencial hídrico em si. Por outro lado, a relação entre o volume do simplasto e o potencial hídrico depende do módulo de elasticidade das paredes celulares, da distribuição da água entre o simplasto e o apoplasto e do potencial osmótico no estado de máxima hidratação (Pavlik, 1984; Kikuta & Richter, 1986; Sen Gupta & Berkowitz, 1987), os quais podem variar com a idade foliar (Wenkert et al, 1978; Jones & Turner, 1980; O'Neill, 1983). Assim, é admissível que a relação entre o potencial hídrico e a acumulação de ácido abscísico varie com a idade das folhas.

Em alguns trabalhos verificou-se que a acumulação de ABA, em resposta ao desenvolvimento de déficit hídrico, pode variar com a idade das folhas. Quando o déficit hídrico é imposto a plantas intactas de Xanthium strumarium, a acumulação foliar de ácido abscísico não varia (Raschke & Zeevaart, 1976), ou então decresce com o aumento da idade das folhas (Cornish & Zeevaart, 1984; Zeevaart & Boyer, 1984). A acumulação preferencial de ABA nas folhas jovens, que também foi observada em plantas de algodoeiro (Jordan et al, 1975) e Euphorbia lathyris (Sivakumaran & Hall, 1978), ocorre mesmo quando o decréscimo da turgescência é mais acentuado nas folhas mais velhas (Cornish & Zeevaart, 1984) e está associada ao facto de as folhas em expansão importarem, por via floémica, ácido abscísico produzido nas folhas mais velhas (Cornish & Zeevaart, 1984; Zeevaart & Boyer, 1984).

Apesar de a acumulação preferencial de ABA nas folhas em expansão ser concordante com o facto do encerramento dos estomas de folhas jovens de Citrus sinensis preceder o decréscimo da

condutância estomática das folhas mais velhas (Syvertsen, 1982), nem sempre as diferenças de sensibilidade estomática entre folhas em expansão e folhas adultas podem ser explicadas com base na acumulação diferencial de ácido abscísico. Em algodoeiro, por exemplo, o encerramento estomático ocorre primeiro nas folhas mais velhas, apesar de serem as folhas mais jovens aquelas que acumulam maiores quantidades de ABA (Jordan et al, 1975). Os resultados de Radin & Hendrix (1988) podem contribuir para explicar esta aparente contradição. Aqueles autores verificaram que as folhas mais velhas de algodoeiro libertavam uma maior proporção de ABA no apoplasto do que as folhas em expansão, facto que, provavelmente, estará relacionado com a diminuição da capacidade de acidificação do apoplasto que se verifica com o aumento da idade foliar (Gepstein, 1982). Estes resultados indicam que os efeitos da idade das folhas, sobre a resposta dos estomas ao desenvolvimento de défice hídrico, poderão estar relacionados com alterações no processo de compartimentação intracelular do ácido abscísico.

A compartimentação intracelular do ABA depende, não só da idade da folha mas também do estado hídrico. Estudos recentes indicam que o desenvolvimento de défice hídrico, tanto nas folhas (Hartung et al, 1988) como nas raízes (Gollan et al, 1992), está associado a um aumento do pH no apoplasto. Em contrapartida, a imposição de défice hídrico resulta na acidificação do estroma dos cloroplastos (Berkowitz & Gibbs, 1983). Tais alterações de pH deverão resultar na redistribuição intracelular do ácido abscísico, visto que esta depende, como já foi referido, de gradientes de pH (Heilmann et al, 1980; Kaiser & Hartung, 1981; Hartung & Slovik, 1991). Loveys (1977) verificou que 96,6% do ABA presente em folhas túrgidas de espinafre se localizava nos cloroplastos, mas esta proporção diminuía após a imposição de défice hídrico moderado. Posteriormente, Hartung et al (1983) verificaram que a incubação de fragmentos foliares em meios com baixo potencial osmótico provocava a libertação de ácido abscísico do protoplasma para o meio de incubação, o que é equivalente, em termos de folhas intactas, à libertação da hormona no apoplasto. Por outro lado, Radin & Hendrix (1988) verificaram que a experiência de défice hídrico em folhas de algodoeiro provocava um aumento da proporção de ácido abscísico libertado no xilema, enquanto que Cornish & Zeevaart (1985a) detectaram, em folhas de Xanthium strumarium desidratadas na câmara de pressão, que a acumulação de ABA nos exsudados xilémicos precedia o aumento da sua concentração ao nível do resto da folha. Também quando o

défice hídrico é imposto a plantas intactas se detectou um aumento da concentração de ácido abscísico no apoplasto, mais precisamente nos exsudados xilémicos de raízes de Xanthium strumarium (Zeevaart & Boyer, 1984) e de girassol (Hoad, 1975; Neales & McLeod, 1991). Mesmo quando a desidratação das raízes ocorre sem que se desenvolva défice hídrico foliar, foi detectada a acumulação de ácido abscísico no xilema de Zea mays (Zhang & Davies, 1990), girassol (Neales et al., 1989; Zhang & Davies, 1989b; Schurr et al., 1992) e trigo (Munns & King, 1988).

Considerando os resultados obtidos quando da aplicação exógena de ácido abscísico, Zhang & Davies (1989b, 1990) concluíram que as variações da condutância estomática por eles observadas, tanto em plantas de milho como de girassol, podiam ser explicadas com base nas variações da concentração xilémica de ABA. Esta conclusão é reforçada pelos resultados obtidos num trabalho posterior, no qual Zhang & Davies (1991) verificaram que a solução xilémica recolhida de plantas de milho não regadas induzia o encerramento estomático quando aplicada a folhas destacadas de trigo, ou a epidermes destacadas de Commelina communis. Contudo, após passar por uma coluna de imunoafinidade que retinha o ácido abscísico, essa mesma solução deixava de ter qualquer efeito inibitório sobre a abertura estomática.

Contudo, os resultados obtidos noutros trabalhos parecem ser contraditórios com a hipótese da condutância estomática ser regulada pela concentração xilémica de ABA. Ackerson (1982), por exemplo, verificou que os estomas de plantas de algodoeiro não regadas começavam a fechar quando o potencial hídrico foliar atingia -1,2 MPa, mas o ácido abscísico só se acumulava no xilema das folhas após Ψ decrescer para -1,6 MPa. Também no caso da cultivar Cacahuete-72 de feijoeiro, Trejo & Davies (1991) verificaram que a condutância estomática de plantas não regadas decrescia 2 dias antes de ser detectável qualquer acumulação de ABA no xilema. Já anteriormente Munns & King (1988) tinham questionado a hipótese de o ácido abscísico ser o principal inibidor da abertura estomática em plantas de trigo. Munns & King (1988) verificaram que a concentração de ABA no xilema de plantas não regadas era 50 vezes superior à concentração existente no xilema de plantas regadas. Contudo, concluíram que tal não explicaria o encerramento estomático visto que a concentração endógena máxima por eles detectada ($0,05 \text{ mmol m}^{-3}$) era 10 vezes inferior à concentração exógena mínima capaz de induzir o fecho dos estomas de folhas destacadas de plantas regadas. Esta conclusão de Munns & King (1988) baseou-se também

nos resultados obtidos quando os exsudados recolhidos de plantas não regadas eram aplicados a folhas destacadas de plantas regadas: aqueles exsudados tinham um forte efeito inibitório sobre a abertura estomática, o qual se mantinha mesmo após a sua passagem por uma coluna de imunoafinidade que retinha o ABA. Aliás, e estranhamente, o seu efeito inibitório aumentava após a remoção do ácido abscísico. Note-se também que os próprios exsudados recolhidos de plantas regadas provocavam o decréscimo da transpiração quando aplicados a folhas destacadas. Munns & King (1988) não avançaram qualquer explicação para tal facto. Contudo, os resultados de Zhang & Davies (1991) sugerem que os ensaios realizados por Munns & King (1988) com folhas destacadas poderão ter sido afectados pela contaminação das amostras de xilema com partículas capazes de bloquear o fluxo de água e, eventualmente, induzir o desenvolvimento de défice hídrico.

Quando se pretende avaliar a relação entre a concentração apoplástica de ABA e a condutância estomática, um dos problemas que se coloca é a selecção do método de recolha dos exsudados de modo a que a sua composição se aproxime, tanto quanto possível, da composição da solução xilémica de uma planta a transpirar. Ackerson (1982) recolheu os exsudados xilémicos de folhas pressurizadas na câmara de pressão, aplicando uma sobrepressão relativamente elevada - 0,5 MPa - durante 50 minutos. A aplicação de sobrepressões elevadas para a recolha dos exsudados aumenta a probabilidade do volume de exsudado recolhido ser superior ao volume de água apoplástica da folha. Quando tal acontece a concentração xilémica de ácido abscísico será subestimada, pois o exsudado será mais diluído do que a solução xilémica em virtude de conter água filtrada pelas membranas celulares (Jachetta *et al.*, 1986; Meinzer & Moore, 1988).

Contudo, a pressurização foliar não é o único método de recolha de amostras de xilema que pode conduzir a erros na estimativa da concentração xilémica de ácido abscísico. O próprio acto de destacar a parte aérea, com vista à recolha dos exsudados das raízes, perturba o fluxo de água na planta, podendo alterar a concentração de solutos pré-existente no xilema, nomeadamente, a concentração de ABA (Meinzer *et al.*, 1991). Zhang & Davies (1990) determinaram a concentração de ABA no xilema de *Zea mays* com base na análise de exsudados de raízes não pressurizadas. A concentração de ácido abscísico nestes exsudados poderá ser superior à existente no xilema antes do destacamento da parte aérea, em virtude da taxa de exsudação ser inferior à taxa de transpiração na planta inteira (Meinzer *et al.*, 1991). Contudo,

tal facto não deverá afectar as conclusões de Zhang & Davies (1990), uma vez que o ABA exógeno foi aplicado na água de rega e o seu efeito estomático expresso em função da concentração determinada nos exsudados recolhidos por idêntico processo. No caso do trabalho de Munns & King (1988), as plantas cresceram em vasos pressurizados, tendo a pressão sido regulada de modo a que a taxa de exsudação fosse igual à taxa de transpiração determinada antes do destacamento. Consequentemente, a concentração de ácido abcísico nos exsudados deverá ser semelhante à concentração antes do destacamento, pelo que a eventual diluição da solução apoplástica no processo de recolha dos exsudados não parece ser uma hipótese plausível para explicar as discrepâncias entre os resultados obtidos por Munns & King (1988) e Zhang & Davies (1990).

Na origem de alterações da composição dos exsudados pode também encontra-se a contaminação floémica (Hartung *et al.*, 1988; Meinzer & Moore, 1988), a qual pode conduzir à sobrestimação da concentração xilémica de ácido abcísico, visto que este composto se acumula no floema alcalino (Zeevaart & Boyer, 1984). Contudo, nos trabalhos anteriormente referidos (Ackerson, 1982; Munns & King, 1988; Zhang & Davies, 1989b, 1990; Trejo & Davies, 1991) não foi testado o grau de contaminação floémica dos exsudados xilémicos. Assim, não é possível avaliar se as discrepâncias entre esses trabalhos estarão relacionadas com a variação do grau de contaminação floémica dos exsudados analisados.

Quando se pretende relacionar a condutância estomática com a concentração de ABA no xilema, deverá ter-se em consideração que esta última não é necessariamente igual à concentração deste regulador de crescimento no apoplasto das células guarda. A concentração de ácido abcísico nas células guarda é muito elevada mesmo em folhas túrgidas (Itai *et al.*, 1978; Behl & Hartung, 1986; Lahr & Raschke, 1988; Brinckmann *et al.*, 1990). Por outro lado, quando estas células são sujeitas a stress osmótico foi detectado um aumento dos seus níveis de ácido abcísico livre (Weiler *et al.*, 1982), assim como o efluxo deste composto do citoplasma para o apoplasto (Behl & Hartung, 1986). Com base nestas observações foi sugerido que, na fase inicial de encerramento dos estomas, as células guarda poderão ser uma importante fonte de ABA. De acordo com esta hipótese, a resposta inicial dos estomas ao défice hídrico resultaria da libertação no apoplasto das células guarda do ácido abcísico previamente existente no simplasto dessas mesmas células (Weiler *et al.*, 1982; Doerffling & Tietz, 1985; Behl & Hartung, 1986).

Contudo, Hartung & Slovik (1991) questionaram a hipótese do encerramento estomático resultar da redistribuição intracelular de ácido abscísico exclusivamente ao nível das células guarda. Segundo aqueles autores, caso o processo de compartimentação intracelular só fosse alterado nas células guarda, a hormona libertada por aquelas células difundiria-se rapidamente para a epiderme e mesófilo, pelo que daí não resultaria a acumulação de ABA no apoplasto das células guarda. No entanto, o modelo de distribuição do ácido abscísico, apresentado por Hartung & Slovik (1991), não exclui a possibilidade da concentração daquele regulador de crescimento diferir entre o apoplasto das células guarda e o xilema. Aquelos autores consideraram a possibilidade da acumulação de ácido abscísico no apoplasto das células guarda e, conseqüentemente, o encerramento dos estomas serem desencadeados pela alteração localizada dos gradientes de pH e compartimentação intracelular do ABA ao nível da epiderme. A referida acumulação de ABA no apoplasto da epiderme e das células guarda não dependeria do aumento do transporte daquele regulador de crescimento através do fluxo transpiratório, pelo que não seria detectada quando o ABA é quantificado no xilema das folhas e muito menos das raízes. Esta hipótese permite explicar as discrepâncias observadas entre a condutância estomática e a concentração xilémica de ácido abscísico, sem pôr em causa a importância do papel desta hormona ao nível da regulação da abertura estomática, mas carece de comprovação experimental: não só faltam dados experimentais quanto à concentração de ABA ao nível do apoplasto das células guarda e epiderme em geral, como também não existem dados experimentais quanto a alguns parâmetros necessários à modelação da distribuição daquela hormona, como seja a condutância do plasmalema das células epidérmicas para o ácido abscísico e a localização intracelular dos processos de degradação deste regulador de crescimento (Hartung & Slovik, 1991).

Para a correcta avaliação do papel do ácido abscísico xilémico no controlo da abertura estomática torna-se assim necessário aprofundar os estudos sobre os mecanismos que regulam a sua distribuição na folha. Mas aquele objectivo também não será alcançado sem que se consiga determinar com exactidão a concentração de ácido abscísico no xilema. Isto só será possível se forem melhorados os métodos de recolha e análise das amostras de xilema, tendo em vista, nomeadamente, eliminar as interferências que a contaminação floémica das amostras pode ter sobre a estimativa da concentração de ABA no xilema.

2.3. Variação da sensibilidade estomática à introdução de ácido abscísico no fluxo transpiratório.

A regulação hormonal dos processos fisiológicos depende, não só da concentração endógena do regulador de crescimento, como da sensibilidade da resposta dos tecidos às variações da concentração hormonal (Trewavas, 1986; 1991). Concretamente, quando se pretende avaliar o papel desempenhado pelo ácido abscísico no controlo da abertura estomática deverá ter-se em consideração que a sensibilidade estomática à aplicação exógena deste regulador de crescimento não é constante: as condições ambientais e a idade foliar podem afectar tanto a concentração mínima de ABA que é capaz de induzir o encerramento estomático, como o declive da relação entre a abertura dos estomas e a concentração daquele regulador de crescimento.

Apesar de Raschke & Zeevaart (1976) não terem detectado qualquer efeito da idade foliar sobre o declive da resposta estomática à aplicação de ABA exógeno em folhas destacadas de Xanthium strumarium, outros trabalhos indicam que a sensibilidade estomática para o ácido abscísico pode variar com a idade das folhas e das plantas. Contudo, os resultados são contraditórios quanto ao sentido desse efeito. Radin & Hendrix (1988), por exemplo, verificaram que a concentração mínima de ABA capaz de inibir a abertura dos estomas de algodoeiro era maior nas folhas em expansão, ou recém-expandidas, do que nas folhas mais velhas. Os resultados obtidos por Henson & Turner (1991) também indicam que a sensibilidade estomática para o ácido abscísico aumenta com o envelhecimento das folhas. Aqueles autores compararam os efeitos da idade foliar sobre a resposta estomática ao ABA exógeno em Lupinus luteus, tendo verificado que, apesar da aplicação de uma elevada concentração de ABA (10 mmol m^{-3}) a folhas de plantas regadas induzir o encerramento dos estomas independentemente da idade foliar, só os estomas das folhas mais velhas fechavam quando se aplicavam concentrações mais baixas de ácido abscísico ($0,1 \text{ mmol m}^{-3}$). Contrariamente aos resultados obtidos por Radin & Hendrix (1988) e Henson & Turner (1991), noutros trabalhos verificou-se que a sensibilidade estomática para o ácido abscísico decresce com a idade das folhas. Este tipo de resposta foi detectado, nomeadamente, em plantas de milho (Blackman & Davies, 1984a), Commelina communis (Willmer *et al.*, 1988) e trigo (Atkinson *et al.*, 1989a). Neste último caso verificou-se que a sensibilidade estomática para baixas

concentrações de ABA diminuía com o envelhecimento (das folhas e das plantas), facto que não estava relacionado com a diminuição da taxa de transporte de ácido abscísico.

A idade foliar não é o único factor que afecta a sensibilidade estomática à aplicação exógena de ácido abscísico. Esta depende também das condições ambientais, nomeadamente daquelas que afectam a taxa de transporte do ABA através do fluxo transpiratório. Efectivamente, Loveys (1991) verificou que a introdução de ácido abscísico no fluxo transpiratório de folhas de Vitis vinifera, numa concentração de $0,4 \text{ mmol m}^{-3}$, só afectava a abertura estomática quando o défice de pressão de vapor entre a folha e o ar era elevado. Segundo Hartung & Slovik (1991), o decréscimo da condutância estomática quando diminui a humidade relativa do ar, mantendo-se constante a concentração de ABA no xilema, pode ser explicada pelo facto de o acréscimo na transpiração aumentar a taxa de transporte do ABA e conduzir à sua acumulação na folha, nomeadamente no apoplasto das células guarda.

A sensibilidade estomática para o ácido abscísico depende também da temperatura foliar. Concretamente, o efeito inibitório do ABA sobre a abertura dos estomas diminui quando a temperatura se reduz (Rodriguez & Davies, 1982; Cornic & Ghashghaie, 1991), mesmo quando o défice de pressão de vapor entre a folha e o ar se mantém constante (Cornic & Ghashghaie, 1991).

Os trabalhos anteriormente referidos indicam que os testes de resposta estomática à aplicação exógena de ácido abscísico deverão ser feitos em condições de temperatura e evapotranspiração potencial semelhantes àquelas a que estavam sujeitas as plantas nas quais se determinou a concentração endógena daquele regulador de crescimento. Mas a resposta estomática à introdução de ABA no fluxo transpiratório não depende só das condições ambientais no momento em que se procede à aplicação exógena daquele composto. As condições a que as plantas estiveram previamente sujeitas, nomeadamente, a exposição prévia a défices hídricos, podem também afectar a sensibilidade estomática à aplicação de ABA exógeno. Ackerson (1980) observou, em folhas de Gossypium hirsutum, que a quantidade de ABA requerida para reduzir a condutância estomática, de $0,4$ para $0,3 \text{ cm s}^{-1}$, diminuía consideravelmente após as plantas terem sido sujeitas a períodos de défice hídrico. Já anteriormente Davies (1978) tinha constatado que a experiência de défice hídrico provocava a diminuição da concentração mínima de ABA capaz de induzir o encerramento dos estomas de Vicia faba quando aquele

composto era aplicado por aspersão foliar ou através do fluxo transpiratório. Também em epidermes de Commelina communis (Wilson, 1981) a resposta estomática à aplicação de ácido abscísico exógeno é maior quando as epidermes são destacadas de plantas não regadas. Por seu lado, Henson & Turner (1991) verificaram, em folhas jovens de Lupinus luteus, que a experiência de déficit hídrico sensibilizava os estomas para baixas concentrações de ABA ($0,1 \text{ mmol m}^{-3}$), apesar de não afectar a resposta estomática a elevadas concentrações (10 mmol m^{-3}), as quais provocavam o quase completo encerramento dos estomas, independentemente da experiência prévia de déficit hídrico.

Segundo Ackerson (1980), a sensibilização dos estomas para o ácido abscísico, que está associada à imposição de déficit hídrico a plantas de algodoeiro, é uma consequência da acumulação de ABA então verificada. Esta conclusão baseou-se na observação de que a aplicação exógena de ácido abscísico é capaz de sensibilizar as células guarda para posteriores aplicações (Ackerson, 1980). No entanto, isto nem sempre se verifica. No caso de folhas de trigo, por exemplo, Atkinson et al (1989a) verificaram que a sensibilidade estomática para o ABA diminui em aplicações sucessivas.

A abertura dos estomas, nomeadamente a sensibilidade das células guarda para o ácido abscísico, depende também de factores não hormonais, nomeadamente da disponibilidade de nutrientes e do pH apoplástico. Tanto a deficiência em fósforo (Radin, 1984), como em azoto (Radin et al, 1982; Radin & Hendrix, 1988) sensibilizam os estomas de algodoeiro para baixas concentrações de ABA. A redução da concentração de iões potássio no meio de incubação de epidermes destacadas tem um efeito semelhante sobre a resposta dos estomas de Vicia faba (Wardle & Short, 1981) e Commelina communis (Snaith & Mansfield; 1982a) à aplicação de ácido abscísico. Também a concentração de cálcio pode afectar a abertura estomática. Contudo, apesar de estudos em epidermes destacadas indicarem que a presença de iões cálcio sensibiliza as células guarda para o ácido abscísico (De Silva et al, 1985), a imposição de deficiência em cálcio em plantas intactas traduz-se numa redução da condutância estomática (Atkinson et al, 1989b). Quanto ao efeito do pH, Paterson et al (1988) verificaram que a alcalinização do meio de incubação de epidermes destacadas de Commelina communis resultava no aumento do declive da relação entre a abertura estomática e a concentração de ABA, bem como na redução da concentração mínima daquele composto que é capaz de inibir a abertura dos estomas.

Como já foi referido anteriormente, quer os défices hídricos foliares (Hartung et al, 1988), quer a redução da disponibilidade de água no solo na ausência de défice hídrico foliar (Gollan et al, 1992) resultam na alcalinização do xilema. Também a absorção de nutrientes pelas raízes e o seu transporte para a parte aérea podem ser afectados negativamente em situações de défice hídrico. Apesar de Gollan et al (1992) não terem detectado qualquer correlação entre o teor em água do solo e a concentração de potássio no xilema de girassol, Parrondo et al (1975) verificaram que a desidratação de raízes de milho provoca uma diminuição da taxa de absorção de rubídio (ião análogo do ião potássio em termos de transporte nas plantas). Para além disso, no xilema de girassol, a concentração de cálcio, fosfatos e nitratos decresce linearmente à medida que se reduz o teor em água no solo (Gollan et al, 1992). Um significativo decréscimo na absorção e no transporte para a parte aérea de nitratos foi também detectado em plantas de Artemisia tridentata sujeitas a défice hídrico (BassiriRad & Caldwell, 1992).

Os resultados obtidos por Schurr et al (1992) indicam que as alterações do pH e da concentração de nutrientes no xilema terão de ser consideradas para se poder explicar as variações da condutância estomática associadas à desidratação do solo. Aqueles autores não conseguiram estabelecer nenhuma relação geral entre a condutância estomática e a concentração de ácido abscísico no xilema de plantas de girassol não regadas. Tal impossibilidade resultou de aquela relação variar entre plantas individuais. Esta variabilidade estava relacionada com a concentração xilémica de cálcio e nitratos, cujo decréscimo estava associado à diminuição do declive da relação entre a condutância estomática e a concentração de ABA no xilema.

Tal como Trewavas (1986, 1991) já tinha salientado, do acima exposto torna-se evidente que a avaliação do papel do ABA xilémico na regulação da abertura estomática, em situações de défice hídrico, não será possível sem ter em consideração eventuais alterações da capacidade das células guarda responderem ao aumento da concentração xilémica daquele regulador endógeno de crescimento.

3. Papel desempenhado pelos outros reguladores de crescimento no controlo da abertura estomática em situações de défice hídrico

Apesar do ácido abscísico ser o regulador endógeno de

crescimento cujo papel no controlo da abertura estomática se encontra mais bem documentado, alguns dados experimentais sugerem que a condutância estomática poderá também ser afectada por outros reguladores de crescimento.

3.1. Citocininas

As respostas dos estomas à aplicação de citocininas são aparentemente contraditórias. Sabe-se já há muito tempo que a aplicação exógena de citocininas resulta no aumento da taxa de transpiração de várias gramíneas, nomeadamente, Hordeum vulgare (Livnè & Vaadia, 1965; Cooper et al, 1972), Avena sativa (Luke & Freeman, 1968), Triticum aestivum (Mittelheuser & van Steveninck, 1969), Lolium multiflorum (Luke & Freeman, 1968) e Antheophora pubescens (Incoll & Whitelam, 1977). Também em Kalanchoe daigremontiana (Jewer & Incoll, 1981) e Nicotiana tabacum (Mizrahi et al, 1970) foi detectada a promoção da abertura estomática pela aplicação exógena de citocininas.

Exceptuando as duas últimas, todas as espécies, até agora referidas, em que se detectaram efeitos estomáticos positivos das citocininas pertencem à família das gramíneas. Em contrapartida, os estomas de muitas dicotiledóneas e algumas monocotiledóneas, nomeadamente uma gramínea, revelaram-se aparentemente insensíveis à aplicação de citocininas. Assim, por exemplo, Luke & Freeman (1968) não detectaram qualquer aumento na taxa de transpiração após a aplicação de cinetina em plantas de Vigna sinensis, Phaseolus vulgaris, P. lunatus, Glycine max, Cucurbita pepo e Helianthus annuus, assim como em folhas destacadas de Acer saccharinum e Liquidambar styraciflua. Também Henson et al (1989b) não detectaram qualquer resposta estomática à aplicação de zeatina em folhas destacadas de Lupinus cosentinii. Por outro lado, experiências com epidermes destacadas de Vicia faba (Horton, 1971), Commelina communis (Blackman & Davies, 1983) e do mutante argenteum de ervilheira (Jewer et al, 1982) não revelaram qualquer promoção da abertura dos estomas à luz, em resultado da introdução de cinetina no meio de incubação contendo K^+ exógeno e na ausência de CO_2 no ar. Resultados idênticos foram obtidos na gramínea Zea mays quando fragmentos foliares eram incubados sem uma fonte exógena de potássio (Blackman & Davies, 1983). Tanto nesta espécie, como em Commelina communis, a abertura dos estomas não era também afectada pela zeatina (Blackman & Davies, 1983), o mesmo se verificando em epidermes destacadas de Vicia faba relativamente à benziladenina (Horton, 1971). Do mesmo modo, na

presença de CO₂ no ar, a cinetina não promove a abertura dos estomas em epidermes destacadas de Commelina benghalensis e Tridax procumbens (Das et al, 1976).

Estes resultados negativos, não são contudo suficientes para regeitar a hipótese de as citocininas endógenas afectarem a abertura dos estomas. Note-se que, apesar de Luke & Freeman (1968) não terem detectado quaisquer efeitos da cinetina sobre a transpiração de girassol e feijoeiro, trabalhos posteriores revelaram que a abertura dos estomas é promovida quando folhas de girassol são aspergidas com soluções de zeatina (Kuraishi et al, 1981) e quando fragmentos foliares de feijoeiro são incubados em soluções de benziladenina (Goering et al, 1984). Também no caso de epidermes destacadas de Vicia faba, nas quais Horton (1971) não tinha detectado efeitos da cinetina, Wardle & Short (1981) verificaram que esta citocinina sintética promovia a abertura dos estomas quando as epidermes eram incubadas na presença de CO₂ no ar, mas não na sua ausência. Respostas semelhantes foram detectadas em fragmentos foliares de milho (Blackman & Davies, 1984b). Estes resultados sugerem que, no caso concreto dos trabalhos com epidermes destacadas ou fragmentos foliares, as condições experimentais normalmente utilizadas poderão obscurecer os efeitos das citocininas. Note-se que nos trabalhos em que se verificou que as citocininas promoviam a abertura dos estomas em epidermes destacadas, estas foram incubadas no escuro (Jewer & Incoll, 1981), sem fonte exógena de K⁺ (Incoll & Whitlam, 1977) ou em ar com CO₂ (Wardle & Short, 1981), o que não corresponde às condições de incubação que promovem a abertura máxima dos estomas.

Outro aspecto que deverá ser tido em conta é o facto da maior parte dos trabalhos serem efectuados com citocininas sintéticas (cinetina e benziladenina), as quais poderão não reproduzir os efeitos das citocininas endógenas. Das et al (1976) constataram que a abertura estomática não era afectada pela inclusão de cinetina no meio de incubação de epidermes destacadas de Commelina benghalensis e Tridax procumbens, mas a substituição da cinetina por benziladenina estimulava a abertura dos estomas. Também no tomateiro, apesar da cinetina não afectar a condutância estomática, esta podia ser aumentada pela aspersão foliar com benziladenina e ribósidos de benziladenina (Bradford, 1983). As diferentes citocininas parecem assim não ter igual grau de actividade ao nível dos estomas, o que vai de encontro às observações de Radin & Loomis (1971). Estes detectaram, em raízes de Raphanus sativus, a existência de dois tipos de citocininas

endógenas quimicamente diferentes (uma derivada da zeatina e a outra não identificada quimicamente), as quais pareciam desempenhar funções fisiológicas distintas; nomeadamente, só uma delas (aquela não identificada) era exportada para a parte aérea, desse modo podendo, eventualmente, vir a actuar ao nível dos estomas.

Assinale-se também que, no caso de epidermes destacadas de Commelina communis, Blackman & Davies (1983) verificaram que a abertura dos estomas diminuía quando a concentração de cinetina era aumentada de 1 para 100 mmol m^{-3} , o mesmo ocorrendo quando a concentração de zeatina era elevada de 10 para 100 mmol m^{-3} . Já anteriormente Livnè & Vaadia (1965) e Jewer & Incoll (1981) tinham verificado que a promoção da abertura estomática, tanto pela cinetina como pela zeatina, não aumentava linearmente com a concentração dessas citocininas, havendo uma concentração óptima para a qual ocorria a máxima abertura estomática. Também Das et al (1976) verificaram que a abertura dos estomas em epidermes destacadas de Commelina benghalensis só era promovida por uma pequena gama de concentrações de benziladenina. Estes resultados indicam que, antes de se tirar qualquer conclusão sobre os efeitos estomáticos das citocininas, deverão ser examinadas as respostas dos estomas à aplicação de uma gama larga de concentrações de várias citocininas.

A idade das folhas é outro factor a considerar quando se analisam os efeitos estomáticos das citocininas. Livnè & Vaadia (1965) observaram que a resposta de folhas jovens de cevada à aplicação de cinetina era menos acentuada do que a registada em folhas mais velhas. Também os resultados obtidos por Blackman & Davies (1984a) indicam que os efeitos estomáticos das citocininas dependem da idade das folhas. Concretamente, a resposta de folhas de milho, na ausência de CO_2 , só é detectável após terminada a expansão foliar. Ora, o material vegetal utilizado em estudos de fisiologia estomática é frequentemente bastante jovem, particularmente nos estudos com epidermes destacadas. Este facto levou Blackman & Davies (1984a) a sugerir que algumas das plantas, cujos estomas se revelaram anteriormente aparentemente insensíveis às citocininas exógenas, poderão responder a estes compostos se eles forem aplicados em folhas de idade mais avançada.

Tal como acontecia no caso do ácido abcísico, também as condições de crescimento, particularmente a prévia exposição a défices hídricos, podem afectar a resposta dos estomas à aplicação de citocininas. Aharoni et al (1977) verificaram que,

apesar da cinetina não afectar a abertura dos estomas de folhas túrgidas de alface, o fecho estomático era consideravelmente retardado quando essa citocinina sintética era aplicada no decurso de processos de desidratação foliar. Mesmo no caso do trigo, apesar da transpiração de folhas túrgidas ser estimulada pela aplicação de cinetina, o efeito desta citocinina é bastante mais intenso se as folhas tiverem sofrido previamente um período de défice hídrico (Bengtson et al, 1979). Por outro lado, Blackman & Davies (1985) verificaram que a cinetina e a zeatina aliviavam a inibição da abertura dos estomas de plantas de milho sujeitas a secagem parcial do solo, apesar de nenhuma daquelas citocininas afectar a abertura estomática de plantas regadas.

O aumento da resposta estomática à aplicação de citocininas, após a exposição das folhas a défices hídricos, poderá estar relacionado com o aumento da concentração de ABA então verificado e com o facto de as citocininas antagonizarem o encerramento estomático induzido por aquele inibidor da abertura dos estomas. A primeira indicação da existência de uma interacção entre a cinetina e o ácido abscísico, ao nível da regulação da abertura dos estomas, foi obtida por Cooper et al (1972) em folhas de cevada. Também em Zea mays, tanto a cinetina como a zeatina podem reduzir parcialmente o fecho dos estomas induzido pela introdução de ABA no meio de incubação de epidermes (Blackman & Davies, 1983) ou discos foliares (Blackman & Davies, 1984a), mesmo quando estes últimos eram de folhas muito jovens, nas quais, como foi anteriormente referido, não são detectáveis quaisquer efeitos da aplicação isolada de citocininas. A cinetina também é capaz de suprimir parcialmente o aumento da sensibilidade dos estomas para o ABA exógeno, que ocorre em plantas de algodoeiro previamente sujeitas a défice hídrico (Radin & Hendrix, 1988), assim como em plantas deficientes em azoto (Radin et al, 1982; Radin & Hendrix, 1988) ou fósforo (Radin, 1984). Contrariamente ao observado nestes trabalhos, Henson et al (1989b) não detectaram quaisquer efeitos da zeatina na sensibilidade estomática à aplicação exógena de ácido abscísico em folhas destacadas de plantas bem regadas de Lupinus cosentinii. Contudo, estes autores verificaram que a sensibilidade estomática para o ABA aumentava quando este composto era aplicado a folhas sujeitas previamente a um período de destacamento prolongado, tratamento este que é previsível ter provocado o decréscimo da concentração foliar em citocininas. No entanto, não foi testada a capacidade da aplicação simultânea de citocininas reverter o referido aumento de sensibilidade estomática para o ácido abscísico. Por outro lado, Henson et al

(1989b) só testaram o efeito da variação da concentração de zeatina sobre o encerramento estomático induzido pela aplicação de ABA numa concentração relativamente elevada (1 mmol m^{-3}). Ora Fußeder et al (1992) verificaram que a variação da concentração de citocininas no xilema de Prunus dulcis só afectava a condutância estomática quando a concentração xilémica de ABA não ultrapassava $0,2 \text{ mmol m}^{-3}$. Estes resultados indicam que as citocininas só são capazes de antagonizarem a inibição da abertura estomática induzida pelo ácido abscísico quando a concentração deste último não é muito elevada.

Quanto aos efeitos dos défices hídricos sobre os níveis endógenos de citocininas, os escassos dados experimentais disponíveis indicam que, contrariamente ao que acontece no caso do ácido abscísico, a concentração de citocininas se mantém constante ou decresce após a exposição a défices hídricos. Efectivamente, foi detectada uma redução da actividade de citocininas em folhas destacadas de tabaco (Itai & Vaadia, 1971) e alface (Aharoni et al, 1977) quando desidratadas devido à diminuição da humidade atmosférica. Itai & Vaadia (1971) sugeriram que o decréscimo do potencial hídrico foliar provocaria a inactivação reversível das citocininas, hipótese esta apoiada por Walker & Dumbroff (1981). Estes autores verificaram que a diminuição dos níveis de zeatina em folhas de tomateiro, provocada por soluções nutritivas de baixo potencial osmótico, era acompanhada, na fase inicial, por um aumento transitório do teor foliar em ribósidos de zeatina, o que os levou a sugerir que estes derivados da zeatina constituiriam uma etapa na inactivação desta citocinina. Segundo Itai & Benzioni (1976), os efeitos negativos do défice hídrico foliar sobre a concentração de citocininas poderão não ser uma resposta directa à redução do potencial hídrico foliar mas sim uma consequência da acumulação de ácido abscísico, já que este, quando aplicado exogenamente, estimula a metabolização das citocininas.

Por outro lado, o trabalho de Itai & Vaadia (1965) sugere que o défice hídrico nas raízes resulta na redução da taxa de transporte de citocininas para a parte aérea. Aqueles autores detectaram uma substancial diminuição da actividade do tipo citocinina na solução xilémica de plantas de girassol sujeitas a baixos potenciais hídricos do solo. Resultados semelhantes foram obtidos em resposta à adição de cloreto de sódio à solução nutritiva de Eucalyptus occidentalis (Itai, 1978).

Apesar dos dois trabalhos anteriormente referidos indicarem que a desidratação das raízes conduz ao decréscimo da

concentração de citocininas no xilema, nomeadamente de girassol (Itai & Vaadia, 1965), num outro estudo levado a cabo nesta mesma espécie, Neales et al (1989) não detectaram qualquer variação na concentração xilémica de citocininas em resultado da desidratação parcial das raízes. Note-se que Itai & Vaadia (1965) suspenderam o fornecimento de água a todo o sistema radicular. Em contrapartida, no trabalho de Neales et al (1989) só parte do sistema radicular foi desidratado, permanecendo em solo húmido uma parte substancial das raízes, as quais eram capazes de assegurar o adequado fornecimento à parte aérea de água e, eventualmente, citocininas. A aparente contradição entre os resultados obtidos em girassol por Itai & Vaadia (1965) e Neales et al (1989) poderá significar que a concentração xilémica de citocininas só será reduzida quando o sistema radicular sofre défices hídricos relativamente severos, contrariamente ao que parece acontecer no caso do ABA, cuja concentração xilémica aumenta mesmo quando a desidratação é imposta a uma pequena fracção do sistema radicular (Neales et al, 1989; Zhang & Davies, 1990).

Do acima exposto resulta que a hipótese dos efeitos estomáticos das citocininas serem restritos às gramíneas, a qual era encarada como bastante plausível nos fins dos anos 60, não é actualmente sustentável. Os dados experimentais existentes sugerem que a sensibilidade dos estomas às citocininas dependerá, não tanto da espécie, mas fundamentalmente da idade das folhas e das condições de crescimento das plantas. Concretamente, a resposta dos estomas à aplicação de citocininas aumenta com a idade das folhas, com a ocorrência de défices hídricos e com a deficiência em nutrientes inorgânicos. As citocininas parecem interferir com a resposta estomática ao ácido abscísico, antagonizando o encerramento dos estomas induzido por este último. Assim, o fecho dos estomas em situações de défice hídrico poderá resultar não só do aumento da concentração de ácido abscísico, mas também da diminuição dos níveis endógenos de citocininas e conseqüente aumento da sensibilidade estomática para aquele inibidor da abertura dos estomas.

3.2. Auxinas

Os efeitos estomáticos da aplicação exógena das auxinas naturais só foram postos em evidência na última década. Anteriormente, a principal auxina natural, o ácido indol-3-acético (IAA), não tinha revelado qualquer efeito sobre a

abertura dos estomas de folhas destacadas de Avena sativa (Livnè & Vaadia, 1965; Luke & Freeman, 1968) e de epidermes abaxiais destacadas de Commelina communis (Ogunkanmi et al, 1973), pelo que foram inesperados os resultados de Pemadasa (1982a). Este autor, ao investigar a disparidade da capacidade de abertura dos estomas abaxiais e adaxiais de Commelina communis, verificou que a aspersão foliar com IAA (100 mmol m^{-3}) não afectava os estomas abaxiais, mas promovia a ampla abertura dos estomas adaxiais. Daí resultava a eliminação da disparidade de abertura que normalmente existe entre os estomas das duas superfícies foliares. Estes dados levaram Pemadasa (1982a) a sugerir que as diferenças de condutância estomática entre as duas páginas de algumas folhas anfiestomáticas estariam relacionadas com diferenças entre as duas epidermes foliares quanto aos níveis de auxinas endógenas, ou à sensibilidade das células guarda para estes reguladores de crescimento.

Não é só na superfície adaxial que a abertura estomática é promovida pela aplicação de ácido indol-3-acético. Pemadasa (1982a) comparou também a resposta dos estomas à inclusão de IAA no meio de incubação de epidermes destacadas de Commelina communis, em diferentes regimes de iluminação, concentração de CO_2 no ar e concentração de cloreto de potássio no meio de incubação. Para além de confirmar que a resposta dos estomas adaxiais é mais acentuada, este estudo revelou a existência de efeitos positivos daquela auxina ao nível da abertura dos estomas abaxiais, desde que o ar contenha CO_2 e seja baixa a concentração de KCl no meio de incubação. Também Snaith & Mansfield (1982b) verificaram que, quando as epidermes abaxiais de Commelina communis eram incubadas na presença de ar desprovido de CO_2 o ácido indol-3-acético praticamente não tinha qualquer efeito estomático. Contudo, na presença de CO_2 , a abertura dos estomas passava a variar com a concentração de IAA no meio de incubação, a qual reduzia o efeito inibitório do CO_2 sobre a abertura estomática. Assim, tal como acontece no caso da resposta às citocininas, as condições experimentais podem mascarar as respostas estomáticas à aplicação de auxinas no meio de incubação de epidermes de Commelina communis.

A promoção da abertura dos estomas pelo IAA não se restringe a Commelina communis. Em folhas destacadas de Phaseolus vulgaris (Eamus & Wilson, 1984) e em epidermes destacadas de Vicia faba (Levitt et al, 1987) aquela auxina pode promover a abertura dos estomas, desde que seja aplicada na presença de CO_2 no ar.

O trabalho de Pemadasa (1982a), para além de ter posto em

evidência o papel do IAA como promotor da abertura dos estomas, revelou também a existência de uma forte interacção entre esta auxina e o ácido abcísico. Concretamente, o IAA era capaz de suprimir, parcialmente, o fecho dos estomas induzido pelo ABA exógeno, tanto em epidermes abaxiais como adaxiais de Commelina communis. Tal facto veio a ser confirmado por Snaith & Mansfield (1982a), os quais, usando uma vasta gama de concentrações de ABA e de ácido indol-3-acético, verificaram que as curvas de dose-resposta do fecho dos estomas induzido pelo ácido abcísico exógeno, em fragmentos da epiderme abaxial de Commelina communis, eram fortemente modificadas pela inclusão daquela auxina no meio de incubação, de tal modo que o ácido abcísico deixava de ter qualquer efeito na presença de elevadas concentrações de IAA (100 mmol m⁻³). Por outro lado, Pemadasa (1982b) verificou que a inclusão de ácido fenilacético no meio de incubação de epidermes destacadas de Commelina communis também é capaz de contrariar o fecho induzido pelo ácido abcísico exógeno. Estes resultados indicam que o ácido indol-3-acético não é a única auxina natural que interfere com a resposta dos estomas ao ácido abcísico.

Darbyshire (1971) detectou, em folhas de tomateiro, um aumento linear da actividade da oxidase do ácido indol-3-acético à medida que o potencial hídrico se reduzia. Por outro lado, potenciais hídricos inferiores a -1,0 MPa inibem o transporte do IAA através do pecíolo para a lâmina foliar (Davenport et al, 1980). Estes dados sugerem que os défices hídricos poderão reduzir a concentração foliar de auxinas endógenas. Esta hipótese é apoiada pelas observações de Kannangara et al (1982), os quais constataram, em plantas de sorgo, que os níveis de ácido indol-3-acético se reduziam ligeiramente quando se suspendia a rega. Contudo, o mutante flacca do tomateiro apresenta uma actividade do tipo auxínico muito elevada, apesar da reduzida turgescência foliar (Tal et al, 1979). No entanto, é necessário ter em conta que neste mutante é difícil discriminar os efeitos resultantes do défice hídrico em si e aqueles que são devidos à limitada produção de ácido abcísico. Tal et al (1979) verificaram que a aplicação exógena de ABA diminui a actividade de síntese do ácido indol-3-acético e aumenta a sua oxidação. Os efeitos do défice hídrico foliar sobre o metabolismo do IAA poderão assim ser indirectos, dependendo do aumento da concentração de ácido abcísico.

Tal como o ácido abcísico, o IAA é também um ácido fraco e a sua distribuição poderá ser afectada pelo pH dos diversos compartimentos celulares. Contudo, segundo Hartung & Slovik

(1991), o plasmalema é muito mais permeável à forma aniónica desta auxina do que ao ácido abscísico dissociado. Daí que a redistribuição intracelular do IAA deve ser menos sensível à variação do pH apoplástico do que a redistribuição do ácido abscísico. Efectivamente, a alcalinização do apoplasto de folhas de algodoeiro desidratadas não resulta na acumulação de IAA no apoplasto, contrariamente ao que se verifica no caso do ácido abscísico (Hartung et al, 1992). Assim, o quociente entre as concentrações apoplásticas de ácido indol-3-acético e de ácido abscísico diminui em resultado da alcalinização do apoplasto em situações de défice hídrico. Esse facto poderá contribuir para o encerramento dos estomas então verificado, visto que, tal como as citocininas, as auxinas naturais podem suprimir parcialmente os efeitos inibitórios do ABA sobre a abertura estomática.

3.3. Giberelinas, etileno e outros reguladores de crescimento.

Relativamente às giberelinas, a única referência quanto aos efeitos da desidratação foliar sobre os seus níveis endógenos provém do trabalho de Aharoni et al (1977). Estes autores detectaram um rápido decréscimo na concentração de giberelinas à medida que se reduzia o teor relativo em água de folhas destacadas de alface; a concentração daqueles reguladores de crescimento aumentava quando as folhas eram re-hidratadas. São também escassos os dados experimentais disponíveis quanto à acção das giberelinas ao nível dos estomas. Tal como as citocininas, o ácido 3-giberélico (GA_3) aumenta a transpiração de folhas destacadas de cevada (Livnè & Vaadia, 1965) e a abertura dos estomas no escuro em fragmentos foliares de feijoeiro (Goering et al, 1984). Em contrapartida, em epidermes destacadas de Vicia faba (Horton, 1971) e Commelina communis (Ogunkanmi et al, 1973) não foi detectada qualquer resposta estomática à inclusão de GA_3 no meio de incubação. Por outro lado, Aharoni et al (1977) verificaram que a aplicação de GA_3 não afectava a resistência estomática de folhas túrgidas de alface, mas retardava o fecho dos estomas quando as folhas eram desidratadas, tal como acontecia em resposta à aplicação de cinetina. Contudo, contrariamente às citocininas, o ácido 3-giberélico não revelou qualquer efeito sobre a transpiração de folhas destacadas de aveia (Luke & Freeman, 1968).

Relativamente ao etileno são bastante contraditórios os dados existentes quanto ao seu efeito ao nível dos estomas: há referências tanto de estímulo como de inibição da abertura

estomática, bem como de ausência de resposta. Em Lycopersicon esculentum (Bradford, 1983), alface (Aharoni, 1978), Zea mays e Pisum sativum (Pallaghy & Raschke, 1972) a condutância estomática não parece ser afectada pelo aumento da concentração de etileno no ar. Contudo, tanto em Arachis hypogaea (Pallas & Kays, 1982) como em soja (Gunderson & Taylor, 1988) foi detectado o encerramento dos estomas quando as folhas eram expostas a ar contendo etileno. Já anteriormente Browning (1974) tinha observado uma redução da taxa de transpiração e da abertura dos estomas após a aspersão de folhas de Coffea arabica com ácido 2-cloroetilfosfónico (CEPA), o qual liberta etileno in vivo. Contudo, este mesmo composto promove a abertura estomática em epidermes destacadas de Vicia faba (Levitt et al, 1987), bem como em folhas de Olea europaea (Vitagliano, 1975) e Prunus cerasus (Masia et al, 1985).

Apesar de não ter sido detectada qualquer alteração na produção de etileno por folhas de Citrus sinensis quando do desenvolvimento de défice hídrico em plantas intactas (Ben-Yehoshua & Aloni, 1974), a desidratação de folhas destacadas de trigo (Wright, 1977, 1980), alface (Aharoni, 1978) e também de laranjeira (Ben-Yehoshua & Aloni, 1974) estimula a emissão de etileno. Com base em dados obtidos em algodoeiro, feijoeiro e roseira, Morgan et al (1990) concluíram que a produção de etileno é estimulada pela rápida desidratação de folhas destacadas, mas não é afectada quando plantas intactas são sujeitas a um processo de secagem lenta do solo. No mesmo sentido apontam os resultados obtidos por Ben-Yehoshua & Aloni (1974) em laranjeira. Contudo, o estímulo da produção de etileno pelo défice hídrico foi também detectado em plantas intactas de faveira (El-Beltagy & Hall, 1974).

Há que ter em consideração o facto de a produção de etileno ser influenciada pela concentração de outros reguladores de crescimento. Wright (1980) verificou que o tratamento prévio de folhas de trigo com citocininas, ou auxinas, estimula a produção de etileno quando as folhas são posteriormente desidratadas. Também o ácido abscísico afecta a síntese de etileno, mas o seu efeito parece depender da espécie: a aplicação exógena de ABA estimula a produção de etileno tanto em tomateiro como em citrinos (Riov et al, 1990), mas tem um efeito oposto em folhas de trigo (Wright, 1980).

Parece assim, que a intensidade com que o défice hídrico irá estimular a produção de etileno depende do balanço hormonal existente quando os tecidos são desidratados. Contudo, são

difíceis de avaliar as consequências da produção de etileno sobre a abertura dos estomas, dado serem contraditórios os efeitos estomáticos deste regulador de crescimento.

Os compostos anteriormente referidos não são os únicos que afectam a abertura dos estomas. As folhas de algumas espécies de mirtáceas, particularmente de Eucalyptus grandis, contêm três reguladores de crescimento, designados por substâncias G (Dhawan et al, 1979), cuja capacidade de inibir a abertura dos estomas foi posta em evidência em Vigna radiata, Eucalyptus rupicola (Paton et al, 1980), E. grandis, Xanthium strumarium (Sharkey et al, 1982) e Commelina benghalensis (Raghavendra & Reddy, 1987).

A abertura dos estomas pode também ser inibida por outros compostos naturais de mais ampla distribuição nas plantas. É o caso de alguns ácidos gordos, como o ácido decanoico, que se acumulam em folhas desidratadas de feijoeiro e cevada (Willmer et al, 1978). Estes ácidos gordos inibem a abertura estomática quando introduzidos no meio de incubação de epidermes destacadas de Commelina communis (Willmer et al, 1978; Plumbe & Willmer, 1986), mas não efectam a abertura estomática quando introduzidos no fluxo transpiratório de folhas destacadas (Willmer et al, 1978). A inibição da abertura estomática foi também detectada após a aplicação exógena de ácido jasmónico em epidermes destacadas de Commelina benghalensis (Raghavendra & Reddy, 1987), o mesmo se tendo verificado em resposta à introdução de ácidos fenólicos, como os ácidos cinâmico e cumárico, no meio de incubação de epidermes destacadas de C. communis (Plumbe & Willmer, 1986). Contudo, noutros trabalhos verificou-se que os mesmos ácidos fenólicos, em vez de inibirem a abertura estomática (Plumbe & Willmer, 1986), antagonizam os efeitos inibitórios do ácido abscísico sobre a abertura dos estomas tanto em folhas destacadas de feijoeiro e milho (Laloraya et al, 1986), como em epidermes destacadas de Allium cepa, Vicia faba (Laloraya et al, 1986) e Commelina communis (Rai et al, 1986).

Apesar de Plumbe & Willmer (1986) não terem detectado qualquer resposta dos estomas de Commelina communis à aplicação exógena de prolina, Klein & Itai (1989) sugeriram que este aminoácido, que se acumula em algumas espécies em situações de défice hídrico, poderá também contribuir para o decréscimo da condutância estomática. Esta hipótese baseou-se em observações de que a prolina, apesar de não induzir o encerramento de estomas abertos, inibe a abertura dos estomas em epidermes destacadas de Commelina communis. Para além disso, Klein & Itai (1989) verificaram que aquele aminoácido sensibilizava os estomas para

baixas concentrações de ácido abcísico.

Os dados apresentados anteriormente revelam o estado ainda embrionário em que se encontra o conhecimento sobre o papel desempenhado por alguns reguladores de crescimento, nomeadamente as giberelinas, na regulação da abertura dos estomas em situações de défice hídrico. Em contrapartida, foi amplamente demonstrado o envolvimento do ácido abcísico no controlo da abertura dos estomas em situações de défice hídrico, apesar de algumas tentativas de correlacionar a condutância estomática e a concentração endógena daquele regulador de crescimento terem sido infrutíferas. Algumas dessas discrepâncias poderão deixar de se verificar se forem considerados os processos de compartimentação intracelular do ácido abcísico e se for correctamente avaliada a sua concentração apoplástica. Contudo, não deverá ser descurada a hipótese de outros compostos, nomeadamente outros reguladores de crescimento, afectarem também a abertura dos estomas. Concretamente, a condutância estomática poderá depender de uma complexa interacção entre o ácido abcísico, auxinas e citocininas: a abertura dos estomas será determinada pelo equilíbrio de concentrações daqueles reguladores de crescimento, podendo as citocininas e auxinas suprimir parcialmente o encerramento estomático induzido pelo ácido abcísico.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo procura-se caracterizar o material e as metodologias gerais utilizadas. As condições em que se realizaram cada um dos ensaios serão descritas pormenorizadamente nas condições experimentais de cada um dos capítulos seguintes.

1. Material vegetal

Não existindo na Universidade do Algarve câmaras de crescimento com ambiente controlado, que possibilitassem a obtenção de material vegetal em boas condições de crescimento, ao longo de todo o ano, optou-se por estudar os efeitos dos défices hídricos em várias espécies, com diferentes épocas de crescimento. Procurou-se também seleccionar espécies que, em estudos anteriores, tivessem revelado comportamentos face à secura susceptíveis de serem controlados a nível hormonal.

1.1. Commelina communis L.

Commelina communis é uma monocotiledónea extensivamente utilizada em trabalhos de fisiologia estomática em virtude da relativa facilidade com que a sua epiderme abaxial pode ser destacada mantendo-se as células guarda funcionais (Weyers & Travis, 1981). Consequentemente, esta espécie constitui o material vegetal ideal quando se pretende determinar a concentração epidérmica de reguladores endógenos de crescimento. Os ensaios com Commelina communis foram realizados em plantas envasadas que cresceram, em câmaras de ambiente controlado, na Universidade de Lancaster, Inglaterra.

1.2. Helianthus annuus L.

Entre as plantas cultivadas em regime de sequeiro no período estival, o girassol caracteriza-se pelas suas elevadas taxas de crescimento, associadas a altas taxas de fotossíntese e transpiração. Apesar de ser cultivada em regime de sequeiro, alguns dados publicados anteriormente sugerem que o sistema radicular do girassol será pouco resistente a situações de secagem acentuada do solo (Robertson *et al*, 1990), pelo que é relativamente lenta a re-hidratação das plantas, após o alívio do

défice hídrico no solo (Sionit & Kramer, 1976; Semann *et al*, 1982). Os ensaios com girassol foram realizados em plantas envasadas que cresceram em Gambelas (Universidade do Algarve), em condições naturais.

1.3. Lupinus albus L.

O tremoceiro conta-se entre as leguminosas cultivadas, na agricultura tradicional, em consociação com o pomar de sequeiro. Apesar da sua sementeira ocorrer no Inverno, esta cultura pode estar naturalmente sujeita a períodos de défice hídrico quer durante a fase de desenvolvimento vegetativo, quer durante o período de desenvolvimento reprodutivo, o qual ocorre na Primavera.

Trabalhos realizados na tremocilha (Lupinus luteus) indicaram que esta planta possui uma fraca sensibilidade estomática à aplicação de ácido abscísico exógeno, particularmente no caso dos estomas da página adaxial da folha (Lancaster *et al*, 1977). Um dos objectivos dos ensaios realizados com tremoceiro foi determinar se a aparente fraca sensibilidade ao ácido abscísico, revelada por Lupinus luteus, se verificava também noutra espécie do mesmo género, Lupinus albus.

Os ensaios com tremoceiro foram realizados em plantas envasadas. As plantas cresceram em ambiente não controlado, apesar de um dos ensaios ter decorrido sob abrigo, com vista a viabilizar a imposição de défice hídrico durante o Inverno. Os ensaios realizaram-se em Gambelas (Universidade do Algarve) e em Lisboa (Instituto Superior de Agronomia).

1.4. Vitis vinifera L.

A ecofisiologia da videira, planta com inegável interesse económico em Portugal, tem sido alvo de vários estudos, tanto no nosso país, como no estrangeiro. A análise dos padrões diários de trocas gasosas foliares, em condições de campo, tem revelado que esta planta apresenta, frequentemente, um decréscimo gradual da condutância estomática e da taxa de fotossíntese, ao longo dos dias de Verão (Chaves *et al*, 1987). Apesar do decréscimo da condutância poder ocorrer na ausência de défices hídricos (Correia *et al*, 1990), o encerramento dos estomas ao longo do dia parecer ser acentuado pela redução da disponibilidade de água no solo (Downton *et al*, 1987), tendo sido sugerido o envolvimento do ácido abscísico no controlo do referido comportamento estomático

(Downton *et al*, 1987; Correia *et al*, 1990).

Os estudos em *Vitis vinifera* foram realizados, na cultivar Trincadeira preta, num ensaio de campo em Santarém (Escola Superior Agrária de Santarém).

2. Medição da condutância foliar para a difusão do vapor de água em condições naturais.

A condutância foliar para a difusão do vapor de água (g) foi determinada por porometria de difusão. Esta técnica baseia-se no facto de, para condições iguais de défice de pressão de vapor de água entre a folha e o ar, a taxa de perda de vapor de água pelas folhas aumentar linearmente com a condutância foliar. As perdas de vapor de água pelas folhas podem ocorrer tanto através dos estomas como da cutícula. Apesar de se assumir geralmente que a maior parte do vapor de água perdido pelas folhas se difunde através dos estomas, a importância da componente cuticular da transpiração aumenta à medida que os estomas encerram. Pela técnica de porometria de difusão o que se determina efectivamente é a condutância da superfície da folha para a difusão do vapor de água, compreendendo esta as duas componentes (estomática e cuticular).

Os porómetros de difusão subdividem-se em porómetros de difusão dinâmica e porómetros de difusão em equilíbrio, tendo ambos sido utilizados no presente trabalho.

2.1. Porómetros de difusão dinâmica

Nos porómetros de difusão dinâmica, a condutância da superfície da folha para a difusão do vapor de água é determinada a partir da medição da taxa de aumento da humidade do ar contido numa câmara não-ventilada, na qual parte da folha está encerrada.

O porómetro utilizado (modelo MK3 - Delta T Devices, Inglaterra) possui uma cabeça de medida com a forma de uma pinça, onde a folha é introduzida. Parte de uma das superfícies da folha (aproximadamente 1 cm^2) fica em contacto com uma pequena câmara onde se localiza um sensor de humidade de capacitância eléctrica (Vaisala). As temperaturas, da folha e da cabeça de medida, são determinadas por termistores. O vapor de água perdido pela folha provoca o aumento da humidade na câmara, sendo determinado o tempo que decorre até que a humidade relativa aumente até um valor pré-estabelecido (de 40 a 45% no presente caso). O aparelho incorpora ainda um sistema de bombagem que faz passar pela câmara

ar seco proveniente de um recipiente com sílica-gel. O sistema de bombagem é automaticamente ligado quando o ar na câmara atinge o valor máximo da gama seleccionada (45%), sendo desligado após a humidade relativa ter decrescido até um valor inferior ao mínimo do intervalo pré-seleccionado (35% neste caso). Os ciclos podem repetir-se até os valores de leitura estabilizarem. Contudo, não é aconselhável que a folha permaneça muito tempo na câmara de medida, visto que esta é opaca e, conseqüentemente, as operações de medida prolongadas resultam no encerramento dos estomas.

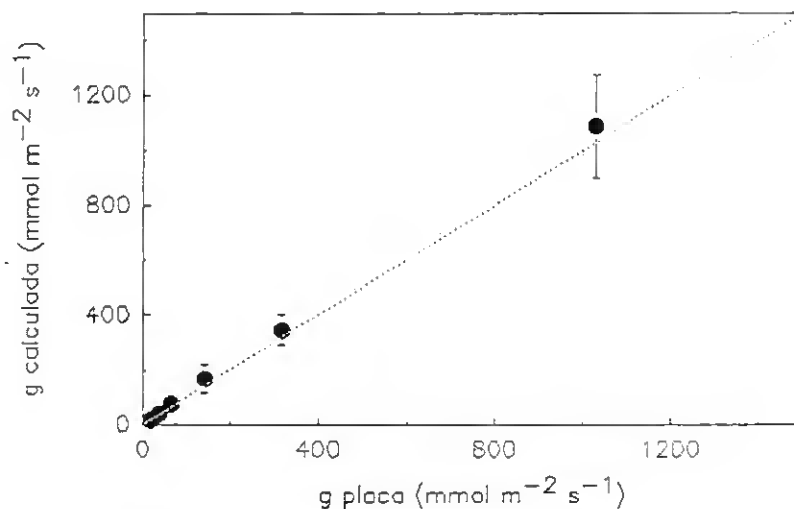


Fig. 1

Condutância para a difusão do vapor de água [g] das várias posições da placa de calibração do porômetro MK3 (Delta T Devices). São comparados os valores indicados pelo fabricante (g placa) com os que foram calculados a partir de medições efectuadas a temperatura variável (entre 18 °C e 28 °C), com base no programa de Monteith et al (1988) e numa calibração efectuada a 20 °C. Cada ponto corresponde à média de 7 determinações, sendo indicado o desvio padrão.

Usando uma placa de calibração fornecida pelo fabricante, a qual possui 6 posições perfuradas cuja condutância para a difusão do vapor de água é conhecida, é possível estabelecer curvas de calibração que relacionam o período de tempo necessário para se verificar o aumento seleccionado de humidade na câmara com a condutância da superfície da placa para a difusão do vapor de água. Esta condutância não inclui a componente da camada limite.

A condutância da superfície foliar pode ser calculada a partir de curvas de calibração determinadas à mesma temperatura e gama de humidades relativas em que se efectuam as medições na planta. Em alternativa, Monteith et al (1988) descreveram um programa em Basic, através do qual a condutância é calculada a partir dos dados de calibração determinados a 20 °C e na mesma gama de humidades relativas. Este programa foi testado efectuando

determinações da condutância da placa de calibração a várias temperaturas e comparando os valores de condutância calculados a partir do programa com a condutância indicada pelo fabricante para as várias posições da placa. Como se pode verificar na figura 1, esses valores eram muito aproximados. Assim, com exceção dos primeiros ensaios, realizados com Commelina communis, a condutância foliar foi calculada usando o programa de Monteith et al (1988), visto este ser o processo menos moroso.

2.2. Porómetros de difusão em equilíbrio ("steady-state")

Nos porómetros de difusão em equilíbrio a folha (ou parte dela) é encerrada numa câmara ventilada por um fluxo de ar que circula em sistema fechado, sendo determinado o fluxo de ar seco que tem de ser adicionado à câmara para contrabalançar o acréscimo de vapor de água resultante da transpiração foliar, ou seja, para que a humidade relativa na câmara se mantenha constante.

Contrariamente à humidade, as concentrações de dióxido de carbono e de oxigénio no ar que circula na câmara variam em resultado das trocas gasosas entre a folha e o ar. Dado que a abertura estomática é afectada pela concentração de CO₂ no ar (Raschke, 1975; Mansfield, 1976; Dubbe et al, 1978), a correcta avaliação da condutância foliar através de porómetros com circuito fechado só é possível se a folha não permanecer muito tempo na câmara.

O porómetro utilizado (Li-Cor 1600, E.U.A.), possui uma câmara de medida, com uma secção de 2 cm², em cujo topo se insere a folha em estudo. Enquanto se efectuam as medições numa das superfícies da folha, a outra superfície fica em contacto com o ar ambiente e sob iluminação natural. A humidade relativa é medida por um sensor de humidade do tipo Vaisala, enquanto que as temperaturas da folha e do ar da câmara são determinadas, respectivamente, por um termopar cromel-constantan e por um termistor. A câmara possui ainda um sensor de radiação fotossinteticamente activa (400-700 nm).

O porómetro incorpora um microprocessador que efectua os cálculos da taxa de transpiração (a partir do fluxo de ar seco que é bombeado para manter constante a humidade relativa), assim como da condutância foliar para a difusão do vapor de água (a partir da taxa de transpiração, temperatura foliar e humidade do ar no interior da câmara). Nestes cálculos é considerada a existência de camada limite, pelo que o valor obtido corresponde

à condutância da superfície foliar (estomática e cuticular). Por outro lado, para o cálculo da condutância considera-se que a força motriz da transpiração é a diferença de concentração de vapor de água entre a folha e o ar, em contraste com o que se verifica nos cálculos da condutância a partir das medições com o outro porómetro (ver 2.1.), ou das taxas de trocas gasosas (ver adiante), nas quais se considerou que a força motriz da transpiração é o défice de pressão de vapor entre a folha e o ar.

A humidade relativa que se manterá constante na câmara pode ser seleccionada de modo a aproximar-se das condições externas. Para que as condições de medição se aproximem, tanto quanto possível, das condições naturais, a operação de selecção da humidade deverá ser efectuada com regularidade e mantendo a câmara protegida da luz solar directa para evitar o seu sobreaquecimento. Contudo, mesmo quando tais precauções são tomadas, Tyree & Wilmot (1990) concluíram serem prováveis determinações erróneas, tanto da taxa de transpiração como da condutância, em resultado de incorrecções na medição da temperatura foliar e/ou de alterações da temperatura da folha após a sua introdução na câmara. Esta última situação terá somente implicações ao nível da validade da extrapolação das taxas de transpiração determinadas para folhas cujo ambiente não tenha sido perturbado pelo processo de medição. Já a incorrecta determinação da temperatura foliar irá afectar de erro o cálculo da concentração de vapor saturante à temperatura da folha e, conseqüentemente, o cálculo da condutância foliar. O mesmo tipo de erros poderá também ocorrer quando se utilizam porómetros de difusão dinâmica.

3. Medição das taxas de trocas gasosas e da condutância foliar em condições de temperatura e humidade controladas

As taxas de trocas gasosas, entre as folhas e o ar, foram determinadas com base na quantificação do acréscimo da concentração de vapor de água e decréscimo da concentração de dióxido de carbono que se verifica no ar, quando este passa através de uma câmara na qual parte de uma folha está encerrada. Utilizou-se um sistema aberto de medição de trocas gasosas ($\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$), com uma minicuvete de ambiente controlado, descrito por Lange & Tenhunen (1984) e fabricado pela firma Heinz Walz (Effertrich, Alemanha). Este sistema, esquematizado na figura 2, é constituído essencialmente por 4 partes: A- minicuvete de medida, com controlo de temperatura e fonte de luz artificial; B-

analisador diferencial de gases por infra-vermelhos (IRGA) para CO_2 e vapor de água (Binos, Leybold Heraus, Hanau, Alemanha); C- misturador de gases e unidade de controlo da humidade do ar e D- unidade de controlo e centralização da informação que integra as bombas de circulação de ar e respectivos controladores de fluxo.

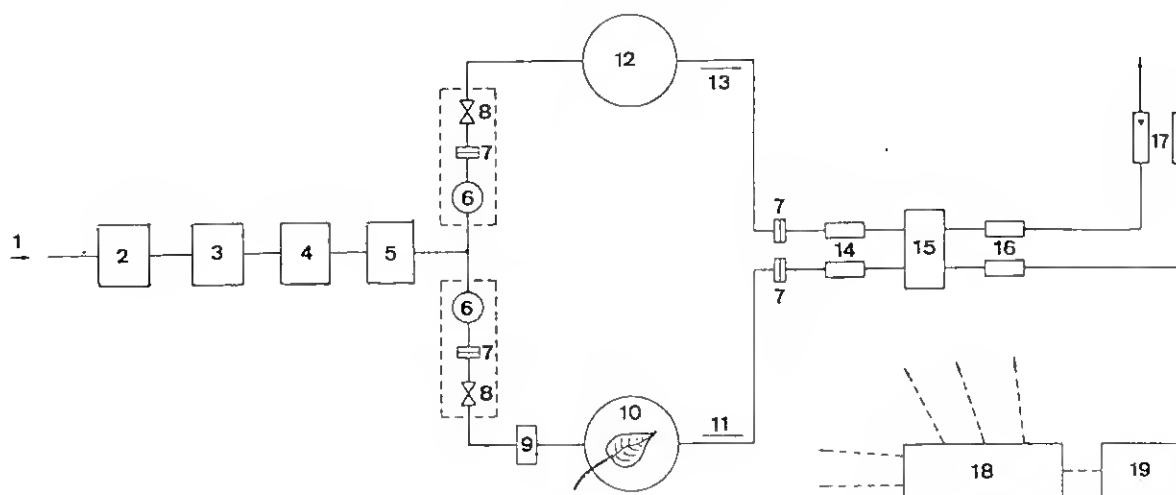


Fig. 2

Esquematização do sistema de medição das trocas gasosas com minicuvete (H. Walz). 1- entrada de ar; 2- recipiente para homogeneizar o ar; 3- misturador de gases; 4- garrafa de humificação do ar; 5- unidade de controlo da humidade do ar; 6- bomba; 7- filtro de ar; 8- válvula; 9- controlador e medidor de fluxo; 10- minicuvete de medida; 11- gás no circuito de medida; 12- recipiente com volume igual ao da minicuvete; 13- gás no circuito de referência; 14- analisador diferencial de vapor de água; 15- unidade para remover o vapor de água; 16- analisador diferencial de dióxido de carbono; 17- fluxímetro; 18- unidade de controlo e centralização de informação; 19- mostrador digital.

Este sistema integra uma unidade misturadora de gases, a qual permite fazer variar a concentração de dióxido de carbono e oxigénio do ar. Contudo, no presente trabalho, todas as medições foram efectadas a concentração ambiente, tanto de dióxido de carbono como de oxigénio, pelo que essa unidade não foi utilizada. Para que não ocorram flutuações bruscas nas concentrações de CO_2 e O_2 do ar que entra na cuvete, durante o período em que decorrem as medições, o ar só é admitido no sistema após passar por um recipiente homogeneizador com cerca de 50 l de volume.

Com vista a controlar a humidade do ar, este era previamente saturado de vapor (ao ser forçado a borbulhar em água), passando seguidamente a uma unidade de controlo da humidade. Nesta unidade, que é provida de elementos termoeléctricos de Peltier controlados electronicamente (H. Walz), o ponto de orvalho do ar

é reduzido para o valor seleccionado. Seguidamente, o ar é subdividido por 2 circuitos: o circuito de medida, no qual a minicuvete está intercalada, e o circuito de referência em que a composição do gás circulante não é afectada pelas trocas gasosas foliares e vai assim servir de referência para o analisador.

A minicuvete é de forma cilíndrica, com um volume interno de 200 ml. No seu interior possui uma pequena turbina que força a circulação de ar, com vista a reduzir a resistência da camada limite. A cuvete é coberta por uma tampa que possui uma janela circular, de vidro duplo, que permite a penetração da radiação. Sobre esta tampa pode ser montada a unidade de iluminação artificial, a qual é fornecida por uma lâmpada de projecção (General Electric, 12 volt/75 Watt). Um conjunto de filtros pode ser inserido entre a lâmpada e a cuvete de modo a fazer variar a intensidade da luz incidente sobre a folha. Sobre a janela da cuvete foi montado um vidro difusor para uniformizar a intensidade luminosa incidente sobre a folha.

A temperatura no interior da cuvete é controlada por um conjunto de elementos de Peltier. A temperatura do ar da cuvete é medida por um termistor, sendo a temperatura da folha medida através de um termopar (cromel-alumel). A junção de medida do termopar apoia-se sobre a superfície da folha e a junção de referência localiza-se perto do termistor. A minicuvete possui ainda um sensor de humidade (Vaisala) e dois sensores de radiação: um sensor de radiação fotossinteticamente activa (Li-Cor) que mede a radiação no exterior da câmara, e uma fotocélula de sílica localizada no interior da cuvete ao nível de inserção da folha. Este último sensor foi calibrado para fornecer resultados equiparados ao sensor externo.

A área foliar máxima que se pode introduzir na cuvete, ficando uniformemente iluminada, é de 19,63 cm² (correspondendo a um círculo de 5 cm de diâmetro). Nesse caso, no entanto, a superfície da folha isolará completamente o compartimento superior da cuvete, sendo então medidas somente as taxas de trocas gasosas da superfície inferior da folha. No presente trabalho, introduziu-se na cuvete uma pequena fracção da folha, com uma área aproximada de 10 cm², em média. Deste modo procurou-se também evitar que as diferenças de concentração, quer de vapor de água como de dióxido de carbono, entre os circuitos de medida e de referência, ultrapassassem os limites de sensibilidade do IRGA.

No que se refere ao funcionamento do IRGA, após ser efectuada a análise diferencial da concentração de vapor de água,

o ar de ambos os circuitos é canalizado para uma unidade de controlo da humidade, onde o ponto de orvalho é reduzido a 2 °C. Só em seguida é efectuada a determinação da diferença de concentração de CO₂. Deste modo são minimizadas as interferências do vapor de água nas leituras das concentrações de dióxido de carbono.

A leitura dos dados é efectuada através de um mostrador digital, localizado na unidade central, que indica os valores da diferença de concentração de CO₂ e vapor de água entre os dois circuitos (em p.p.m.), temperatura do ar na cuvete, temperatura foliar, humidade relativa do ar na cuvete, fluxo de ar à entrada da cuvete, densidade de fluxo fotónico no exterior e no interior da cuvete, temperatura mínima na cuvete e ponto de orvalho do ar à saída do controlador de humidade.

Os cálculos da taxa de transpiração, taxa de fotossíntese, condutância para a difusão do vapor de água e pressão parcial de CO₂ nos espaços intercelulares foram efectuados de acordo com von Caemmerer & Farquhar (1981), sendo as taxas expressas por unidade de área foliar projectada.

No cálculo da condutância não se considerou a condutância da camada limite (g_a), pelo que a condutância calculada (g) vai ser inferior à condutância da superfície foliar para a difusão do vapor de água (g_f): $1/g = 1/g_f + 1/g_a$, dado que a superfície foliar e a camada limite se encontram em série. Nas condições experimentais utilizadas, tanto o fluxo de ar na cuvete como a área foliar em que se efectuaram as medidas mantiveram-se praticamente constantes. Assim, a condutância da camada limite não deverá ter variado e qualquer decréscimo registado na condutância deverá reflectir uma diminuição da abertura estomática. Segundo Lange & Tenhunen (1984), a ventilação no interior da minicuvete assegura que a resistência da camada limite não ultrapassa 0,2 s cm⁻¹, no caso da página inferior de uma folha colocada horizontalmente na minicuvete. Este valor corresponde a uma condutância relativamente grande (2015 mmol m⁻² s⁻¹, a 25 °C), mas é suficiente para que a condutância total (folha e camada limite) seja significativamente menor que a condutância foliar, particularmente no caso de folhas com os estomas abertos: para uma folha com uma condutância de 500 mmol m⁻² s⁻¹ será calculada uma condutância total de 400 mmol m⁻² s⁻¹, ou seja, uma diferença de 20%; esta diferença aumentará para cerca de 33 % quando se considera uma folha que tenha uma condutância para a difusão do vapor de água de 1000 mmol m⁻² s⁻¹. As diferenças entre a condutância foliar e a condutância total

serão ainda maiores no caso de folhas anfiestomáticas, visto que a resistência da camada limite na página superior deverá ser maior do que o valor considerado por Lange & Tenhunen (1984) para a página inferior.

4. Estudo da resposta estomática à aplicação exógena de reguladores de crescimento

A resposta estomática à aplicação exógena de ácido abscísico e de citocininas foi determinada em folhas destacadas, sendo aqueles reguladores de crescimento introduzidos no fluxo transpiratório.

4.1. Preparação das soluções de ácido abscísico e citocininas

Para a preparação das soluções de ácido abscísico utilizou-se uma mistura de isómeros [(+)-ácido abscísico, Sigma], a qual, após dissolvida numa gota de etanol, foi diluída com água destilada até obter a concentração desejada. Para o cálculo da concentração, considerou-se que 50% desta mistura de isómeros corresponde ao isómero activo (isómero +).

A cinetina (6-furfurilaminopurina, Sigma) e a benziladenina (6-benzilaminopurina, Sigma) foram previamente dissolvidas, respectivamente, numa gota de ácido clorídrico a 10% e hidróxido de potássio 0,3 M, antes de serem diluídas com água destilada de modo a obter a concentração desejada.

Tanto no caso das soluções de citocininas como de ácido abscísico o pH foi ajustado a $6,8 \pm 0,1$. As soluções eram guardadas no escuro, a 4°C, até à sua utilização. Nunca se usaram soluções preparadas há mais de 5 dias.

4.2. Destacamento das folhas e aplicação dos reguladores de crescimento

É necessário tomar algumas precauções para impedir a ocorrência de cavitações extensivas quando se procede ao destacamento das folhas. Exceptuando os ensaios em que se analisou a variação ao longo do dia da sensibilidade estomática ao ácido abscísico, as folhas foram destacadas no início da manhã, quando o potencial hídrico foliar ainda era relativamente elevado. O destacamento foliar foi feito geralmente ao ar, excepto nos estudos realizados em videira. Nos ensaios com videira o destacamento foi feito com as folhas mergulhadas em

água, devido à grande vulnerabilidade do lenho da videira para a cavitação (Salleo & Lo Gullo, 1989). Imediatamente após o destacamento, a extremidade do pecíolo era recortada debaixo de água. Seguidamente as folhas eram transferidas para tubos de ensaio contendo água destilada ou uma solução de citocininas ou ácido abscísico. As folhas eram então mantidas no escuro durante pelo menos 15 minutos, de modo a permitir a reversão de eventuais cavitações que tivessem ocorrido aquando do destacamento, e só em seguida eram transferidas para um local iluminado. Os tubos contendo soluções de reguladores de crescimento foram mantidos permanentemente envoltos em papel de alumínio. Deste modo procurou-se minimizar a fotoisomerização do ácido abscísico.

Em alguns ensaios de aplicação exógena de reguladores de crescimento, para além de medições da condutância foliar, efectuaram-se também determinações gravimétricas das perdas de água por transpiração. Estas foram calculadas a partir da diferença entre a variação do peso dos tubos que continham as folhas destacadas e as perdas de água por evaporação directa a partir da superfície da solução. Esta última foi determinada com base na variação do peso de tubos que continham somente água.

5. Determinação da área foliar

A área foliar foi determinada em réplicas das folhas em papel, utilizando um medidor de áreas foliares (Delta-T Devices, Inglaterra).

6. Determinação do teor em água do solo

O teor em água no solo foi determinado, nos ensaios com plantas envasadas, pesando regularmente o conjunto vaso-plantas-solo. A este valor subtraiu-se a tara do vaso e a massa da parte aérea das plantas (determinada no fim dos ensaios), assim se calculando a massa do solo hidratado. No fim dos ensaios determinou-se também a massa dos vasos à capacidade de campo. Nesta etapa é necessário tomar algumas precauções para garantir que o solo se encontra com o seu máximo teor em água, particularmente no caso de vasos previamente sujeitos a défices hídricos severos: após cortar a parte aérea das plantas, os vasos eram regados, tapados com um saco de plástico, deixava-se escorrer o excesso de água, durante pelo menos 10 horas e só então os vasos eram pesados; este procedimento era repetido até se verificar que o teor em água do solo não aumentava entre duas

regas sucessivas. A massa seca do solo foi determinada após as amostras de solo permanecerem na estufa (80 °C), durante pelo menos 72 horas.

7. Estudo das relações hídricas das plantas

7.1. Potencial hídrico

Para a determinação do potencial hídrico foliar usaram-se duas técnicas: câmara de pressão (Scholander et al, 1964) e higrometria de ponto de orvalho (Campbell et al, 1973; Savage et al, 1981). Esta última foi também utilizada para a medição do potencial hídrico das raízes.

7.1.1. Câmara de pressão

A técnica de determinação do potencial hídrico (Ψ) pela câmara de pressão foi descrita por Scholander et al (1964), sendo os seus fundamentos teóricos posteriormente desenvolvidos, nomeadamente, por Tyree & Hammel (1972) e Tyree et al (1973).

Nesta técnica pressupõe-se que o órgão em que se efectuam as determinações se encontra em condições de equilíbrio, ou seja, o Ψ deverá ser igual nas diferentes células de que é composto. Mais precisamente, o potencial da água do xilema deverá ser igual ao potencial hídrico das células vivas da folha em estudo. Contudo, a concentração de solutos nas células vivas é, geralmente, muito superior à registada na seiva xilémica, daí resultando que esta última está normalmente sujeita a uma pressão hidrostática negativa. Quando uma folha é destacada do resto da planta, quebra-se a continuidade da água no xilema, sendo reduzida a tensão a que esta estava previamente sujeita. Assim, o potencial hídrico passa a ser menor nas células vivas do que no xilema. Consequentemente, a água tenderá a mover-se para as células e a seiva recua da extremidade de corte do pecíolo. Contudo, o movimento da interface ar-água será travado pelos poros das paredes celulares e pelas pontuações.

Se a folha for então encerrada numa câmara selada, em que somente a superfície de corte fique no exterior e for aumentada a pressão no interior da câmara, o potencial hídrico das células aumentará pelo valor da pressão aplicada, em resultado de esta provocar uma certa compressão das células. O potencial hídrico de uma célula na câmara pressurizada será igual à soma do seu potencial hídrico inicial com a pressão aplicada. A água que

tinha entrado nas células volta a sair, reaparecendo a seiva à superfície de corte do pecíolo. A pressão em que tal se verifica é designada por pressão de equilíbrio.

O potencial da água no xilema, e no apoplasto em geral, é dado por:

$$\Psi = -RTc_s - 2\sigma/r \quad (1)$$

em que R é a constante dos gases, T a temperatura absoluta, c_s a concentração osmolar de solutos, σ a tensão superficial da água e r o raio de curvatura do menisco da interface ar-água, o qual será tanto menor quanto maior a tensão a que a água estará sujeita. O aparecimento de água livre na superfície de corte (critério para a determinação da pressão de equilíbrio) significa que r é muito grande, ou seja, que a água do xilema se encontrará à pressão atmosférica. Segundo Tyree & Hammel (1972), a concentração de solutos na seiva xilémica é relativamente pequena, pelo que c_s se pode considerar igual a zero. Assim, quando a água do xilema está à pressão atmosférica (pressão de equilíbrio na câmara de pressão), o seu potencial hídrico será igual a zero. Sendo a pressão de equilíbrio determinada em condições de equilíbrio (i.e. quando o fluxo de água na superfície de corte é nulo), o potencial hídrico das células vivas do órgão (Ψ inicial + pressão na câmara) será também igual a zero. Ou seja, a pressão de equilíbrio será numericamente igual, mas de sinal contrário, ao potencial hídrico das células antes do órgão ter sido pressurizado na câmara de pressão.

Contudo, a anterior afirmação só é válida se o potencial osmótico (Ψ_{Π}) da água do xilema não diferir muito de zero. Dados experimentais mostrando que a água do xilema tem uma concentração de solutos muito pequena (Ψ_{Π} igual ou superior a -0,1 MPa) foram obtidos em várias espécies, nomeadamente, em girassol (Baughn & Tanner, 1976; Jachetta *et al.*, 1986), algodoeiro (Hartung *et al.*, 1988), Vitis rotundifolia (Anderson & Brodbeck, 1989), Lupinus cosentinii (Jensen & Henson, 1990), soja, pimenteiro e batateira (Baughn & Tanner, 1976). No entanto, noutras espécies o potencial osmótico do apoplasto foliar pode ser inferior, rondando -0,2 MPa em Quercus agrifolia (Hardegree, 1989a) e Pinus ponderosa (Hardegree, 1989b), enquanto que na cana do açúcar oscila entre -0,25 MPa e -0,35 MPa (Meinzer & Moore, 1988). Nestes casos, o potencial hídrico celular poderá ser sobrestimado quando se utiliza a técnica da câmara de pressão, caso não se tenha em consideração a concentração de solutos na água do xilema.

A ocorrência de perdas de água pela folha, no período de tempo que medeia o seu destacamento e a determinação da pressão de equilíbrio, pode constituir outra fonte de erro, conduzindo esta à subestimação do potencial hídrico. Este erro é particularmente importante quando as folhas se encontram a transpirar intensamente, mas pode ser minimizado se, imediatamente antes do destacamento, a folha for envolta num saco plástico, procedendo-se à determinação da pressão de equilíbrio o mais rapidamente possível (Baughn & Tanner, 1976; Brown & Tanner, 1981; Turner, 1988). Foi este o procedimento adoptado no presente trabalho.

A pressão de equilíbrio pode também ser sobrestimada quando a resistência ao fluxo de água na folha é elevada. O risco de incorrer neste erro aumenta quando ocorrem cavitações durante o destacamento da folha (West & Gaff, 1976), ou quando se estudam folhas com paredes celulares pouco rígidas e, conseqüentemente, com vasos do xilema muito vulneráveis a sofrerem compressão devido à pressurização da câmara (Balling & Zimmermann, 1990).

No presente trabalho as medições do potencial hídrico foram feitas a temperatura ambiente variável. Segundo Tyree *et al* (1974), as variações de temperatura podem afectar a determinação do potencial hídrico com a câmara de pressão, visto que quando a temperatura aumenta se verifica uma diminuição do potencial osmótico e um acréscimo no potencial de pressão, não sendo proporcionais as referidas variações daquelas duas componentes do potencial hídrico. No presente trabalho evitaram-se os aumentos bruscos da pressão no interior da câmara, de modo a minimizar o aquecimento da folha. Por outro lado, a diminuição da taxa de pressurização da câmara reduz também os riscos de subestimação da pressão de equilíbrio resultantes do aparecimento de bolhas de ar, conjuntamente com floema, as quais podem ser confundidas com o humedecimento da extremidade de corte do pecíolo que caracteriza o estabelecimento da verdadeira pressão de equilíbrio (Brown & Tanner, 1981).

7.1.2. Higrómetros de ponto de orvalho

Através desta técnica determina-se o ponto de orvalho de uma atmosfera confinada em equilíbrio com os tecidos vegetais a estudar. No presente trabalho utilizaram-se 2 tipos de higrómetros: higrómetros foliares C52 (Wescor, E.U.A.) e higrómetros construídos nas oficinas da Universidade de Lancaster e descritos por Sharp (1981). A temperatura destes últimos era

mantida constante (20 °C) através de um banho termostático, enquanto que os primeiros se encontravam à temperatura ambiente. Os dois tipos de higrómetros encontravam-se ligados a um microvoltímetro de ponto de orvalho (HR-33T, Wescor, E.U.A.).

Cada higrómetro possui um termopar com 2 junções de cobre-constantan. Uma das junções (junção de referência) tem uma massa relativamente elevada, mantendo-se à temperatura ambiente. A segunda junção é de menor massa, encontrando-se em contacto com a atmosfera em equilíbrio com os tecidos foliares. A temperatura desta última junção pode diminuir por efeito de Peltier, o que conduz à condensação de vapor de água sobre ela, caso o ar da câmara higrométrica contenha vapor de água. Se, após desligar a corrente de arrefecimento, a temperatura da junção de referência só variar em resultado das trocas de calor latente associadas à condensação ou evaporação de água à sua superfície, essa temperatura convergirá para o ponto de orvalho do ar confinado na câmara. Sendo esta temperatura diferente da temperatura da junção de referência, tal facto gerará uma corrente eléctrica, a qual será uma função linear do potencial hídrico do ar em equilíbrio com os tecidos vegetais contidos na câmara (Campbell *et al*, 1973). O correspondente potencial hídrico é determinado a partir da calibração prévia dos higrómetros com soluções de cloreto de sódio de molalidade e, conseqüentemente, de potencial osmótico conhecidos.

Na prática é impossível que a junção de referência não esteja sujeita a transferências de calor sensível. Visto que, durante o processo de medição, a temperatura desta junção será inferior à temperatura do ar contido na câmara, este cederá calor à junção. Contudo, usando o efeito de Peltier, pode-se regular electricamente uma corrente de arrefecimento da junção que contrabalance o referido fluxo de energia. Se tal for efectuado quando o ar na câmara higrométrica estiver completamente seco, então, sempre que se provocar o humedecimento da junção de medida a sua temperatura convergirá para o ponto de orvalho do ar contido na câmara (Campbell *et al*, 1973; Savage *et al*, 1981).

Para a determinação do potencial hídrico das raízes colocaram-se em cada higrómetro 3-4 ápices radiculares, enquanto que no caso das folhas se utilizaram discos de lâmina foliar com cerca de 6 mm de diâmetro, o que corresponde aproximadamente ao diâmetro da câmara interna dos higrómetros. Procurou-se assim minimizar a razão entre a superfície de corte e o volume dos tecidos, de modo a diminuir os riscos de subestimação do potencial hídrico (Walker *et al*, 1984).

A determinação do potencial hídrico deverá ser feita somente após os tecidos vegetais terem permanecido nas câmaras dos higrômetros o período de tempo necessário para que se estabeleçam as condições de equilíbrio. Tal requer pelo menos 2 horas, podendo este período de tempo prolongar-se substancialmente no caso de folhas com cutícula espessa. A morosidade da obtenção de condições de equilíbrio dentro das câmaras higrométricas tem sido apontada como uma potencial fonte de erro na determinação de Ψ . No caso de tecidos em expansão, o potencial hídrico tenderá a decrescer, uma vez que a diminuição da turgescência resultante do processo de relaxamento das paredes celulares não é acompanhada pelo influxo de água nos tecidos destacados (Cosgrove *et al.*, 1984). Consequentemente, a determinação do potencial hídrico por esta técnica não é aconselhável em discos foliares destacados de folhas em expansão. Variações do potencial osmótico (e consequentemente do potencial hídrico) poderão também ocorrer durante o período de tempo em que os tecidos destacados permanecem nas câmaras higrométricas, quer se tratem de tecidos destacados de órgãos jovens, em expansão, como de órgãos maduros. A concentração de solutos pode decrescer, devido a consumo respiratório, ou aumentar, em resultado da hidrólise de hidratos de carbono não-estruturais, nomeadamente amido e/ou sacarose. Bennett *et al.* (1986), por exemplo, detectaram o decréscimo da concentração de amido, em discos foliares de milho e sorgo, durante o período de 4 horas que decorria entre o seu destacamento e a determinação do potencial hídrico por higrometria de ponto de orvalho. A grandeza da resultante subestimação do potencial hídrico pode variar ao longo do dia, assim como com a espécie e idade fisiológica das folhas, já que depende das quantidades de hidratos de carbono e da actividade das respectivas enzimas hidrolíticas existentes nos tecidos antes do destacamento.

7.2. Potencial osmótico e potencial de pressão

O potencial osmótico das raízes foi determinado por higrometria de ponto de orvalho (ver 7.1.2). Após a medição do potencial hídrico, os ápices radiculares foram retirados das câmaras, rapidamente embrulhados em papel de alumínio e mergulhados em azoto líquido durante cerca de 5 minutos. Após descongelados e terem atingido a temperatura ambiente (cerca de 2 minutos) foram colocados novamente nas câmaras higrométricas, sendo o seu potencial hídrico determinado 2 horas depois. No caso

das folhas o potencial osmótico foi determinado em discos foliares ou no suco celular, consoante o método usado para determinação do potencial hídrico. Quando este foi medido por higrometria, o potencial osmótico foi determinado nos mesmos discos foliares, por processo idêntico ao descrito para as raízes. No caso das folhas cujo Ψ foi determinado com a câmara de pressão, o seu potencial osmótico foi medido no suco celular. Após determinação da pressão de equilíbrio, parte da lâmina foliar era congelada em azoto líquido e, após descongelamento, procedia-se à extração do suco celular (por compressão numa seringa). Este era guardado numa arca frigorífica até que o seu potencial hídrico fosse determinado por higrometria de ponto de orvalho. Para tanto, colocava-se na câmara higrométrica um disco de papel de filtro saturado com uma amostra de suco celular. Neste caso bastam 15 minutos para que se estabeleçam as condições de equilíbrio nas câmaras. O valor de Ψ determinado no suco celular e nos tecidos vegetais previamente sujeitos a congelamento foi tomado como correspondendo ao potencial osmótico, visto a componente de pressão do potencial hídrico ser anulada pelo rompimento da parede celular em resultado do congelamento intracelular provocado pelo rápido arrefecimento dos tecidos em azoto líquido (Brown, 1972). O potencial de pressão foi calculado como a diferença entre o potencial hídrico e o potencial osmótico.

Na análise dos resultados deverão ser tidos em conta os erros potenciais a que está sujeita a determinação de Ψ_{II} . Concretamente, o potencial osmótico celular poderá ser sobrestimado em resultado da diluição devida à água apoplástica, daí resultando a subestimação do potencial de pressão (Wenkert, 1980; Markhart *et al.*, 1981). Em princípio, este erro deverá ser tanto maior quanto mais elevado for o teor relativo em água apoplástica (Markhart *et al.*, 1981). Segundo Kikuta & Richter (1992), a determinação do potencial osmótico no suco celular está sujeita a uma fonte adicional de erro que pode também conduzir à subestimação da concentração de solutos. Aqueles autores verificaram que o potencial osmótico determinado em discos foliares era sistematicamente inferior ao medido no suco celular extraído das mesmas folhas. Tais diferenças pareciam resultar da incompleta extração dos solutos celulares, durante o processo de obtenção do suco celular, particularmente quando não se efectuava uma homogeneização prévia dos tecidos.

Devido à diluição provocada pela água apoplástica, será de prever que, em tecidos desidratados para além do ponto de

emurchecimento (turgescência nula), o seu potencial hídrico antes do congelamento fosse inferior ao determinado após congelamento, ou na solução celular. Contudo, tal nem sempre se verifica (Bennett et al, 1986). Tal facto pode resultar de a diluição provocada pela água apoplástica ser reduzida, quer porque os tecidos em estudo têm um teor em água apoplástica muito baixo, quer porque a mistura da água apoplástica com a solução do simplasto pode ser incompleta (Wenkert, 1980). Por outro lado, a diluição provocada pela água apoplástica pode ser compensada pela produção de solutos, nomeadamente, devido à hidrólise do amido e/ou sacarose. Tal hipótese foi sugerida por Grange (1983) e Brown & Tanner (1983). Segundo estes autores, a destruição das membranas pelo congelamento intracelular pode anular a compartimentação de enzimas e respectivos substratos. Estas enzimas, caso se mantenham activas após o descongelamento, poderão actuar sobre os substratos libertados e desse modo contribuir para a subestimação do potencial osmótico e a sobrestimação do potencial de pressão. Segundo Grange (1983), a probabilidade deste erro ser significativo é maior quando o potencial osmótico é determinado em discos foliares do que quando aquela componente do potencial hídrico é medida no suco celular. Isto porque não só o tempo necessário a que se atinjam as condições de equilíbrio é superior no primeiro caso, como é menos provável a ocorrência de hidrólise do amido no suco celular, visto que a maior parte dos grãos de amido deverá ficar no resíduo sólido. Para tal conclusão Grange (1983) baseou-se em observações de que o potencial determinado em discos foliares era inferior ao obtido na solução celular das mesmas folhas. Bennett et al (1986) compararam o teor em amido de discos foliares de várias espécies, logo após o congelamento dos discos e ao fim do período requerido para atingir as condições de equilíbrio nas câmaras higrométricas, não tendo detectado quaisquer diferenças: a hidrólise do amido restringia-se ao período de tempo que separava o destacamento dos discos e a determinação higrométrica do potencial hídrico, antes do congelamento. Assim sendo, a hidrólise do amido resultaria na subestimação tanto do potencial hídrico como do potencial osmótico, mas o cálculo do potencial de pressão não seria afectado. Contudo, deverá ser tido em conta, tal como já foi referido anteriormente, que os erros na determinação dos potenciais hídrico e osmótico, resultantes da hidrólise do amido, vão depender das quantidades de amido e da actividade da amilase existentes nos tecidos antes do destacamento.

7.3. Teor relativo em água das folhas

O teor relativo em água das folhas (θ) foi determinado a partir da equação : $\theta = (m_f - m_s) / (m_t - m_s) * 100$, em que m_f é a massa foliar determinada no momento da colheita, m_t a massa foliar no estado de máxima hidratação e m_s a massa foliar seca. m_t foi determinada após as folhas permanecerem com a extremidade do pecíolo imersa em água destilada durante 2-3 horas, num local com intensidade luminosa moderada e cobertas com um saco de plástico transparente. A massa foliar seca foi determinada após as folhas permanecerem 48 horas numa estufa a 80 °C.

O teor relativo em água foi geralmente determinado nas mesmas folhas em que se mediu o potencial hídrico com a câmara de pressão. De acordo com Tyree *et al* (1984), durante o processo de despressurização da câmara são frequentes as cavitações ao nível do sistema vascular das folhas. Tal facto pode dificultar a posterior re-hidratação das folhas, conduzindo a incorrecções na estimativa do teor relativo em água devido à subestimação de m_t , caso o período de re-hidratação não seja suficientemente prolongado. Contudo, períodos de re-hidratação muito longos podem conduzir a outro tipo de erros: a biomassa foliar pode variar em resultado do consumo respiratório de hidratos de carbono ou da sua produção fotossintética. Por outro lado, quando se determina o teor relativo em água de folhas em expansão, m_t tende a ser sobrestimada (e θ subestimado), em virtude do processo de expansão foliar continuar durante o período de re-hidratação (Slavik, 1974).

7.4. Concentração de solutos e potencial osmótico no estado de máxima hidratação

O potencial osmótico (Ψ_{Π}) de uma solução é dado por:

$$\Psi_{\Pi} = RT \ln a_a / V_a \quad (2)$$

em que R é a constante dos gases, T a temperatura absoluta, a_a a actividade da água e V_a o volume molal parcial da água. Numa solução diluída, como é o caso da solução celular, $\ln a_a = -n_s/n_a$, em que n_a é o número de moles de água numa solução contendo n_s osmoles de solutos (Tyree & Jarvis, 1982). Então a equação 2 pode ser substituída por:

$$\Psi_{\Pi} = - RT n_s \delta_a / W \quad (3)$$

em que δ_a é a densidade da água e W é a massa de água. O número de osmoles de solutos do suco celular foi calculado a partir da equação 3 e do valor de potencial osmótico determinado (ver 7.2.), considerando uma temperatura constante de 25 °C e que numa folha $W = m_f - m_s$.

No estado de máxima hidratação, a folha conterà uma massa de água W_{max} e o seu potencial osmótico ($\Psi_{\Pi 100}$) é dado pela equação 3 desde que W seja substituído por W_{max} . Por outro lado, $W_{max} = W * 100/\theta$, em W e θ são, respectivamente, a massa de água e o teor relativo em água da folha quando esta não se encontra completamente hidratada. Assim, desde que se conheça o potencial osmótico (Ψ_{Π}) e o teor relativo em água de uma folha (θ), o seu potencial osmótico no estado de máxima hidratação pode ser calculado a partir da equação que se obtém quando W_{max} é substituído na eq. 3:

$$\Psi_{\Pi 100} = \Psi_{\Pi} * \theta / 100 \quad (4)$$

8. Recolha de amostras para quantificação do ácido abscísico

8.1. Amostras de tecidos foliares

Para possibilitar a quantificação do ABA ao nível da epiderme, a epiderme abaxial de folhas de Commelina communis foi separada do mesófilo, ficando este ligado à epiderme adaxial. Para tanto, seguiu-se o procedimento descrito por Weyers & Travis (1981). As epidermes acabadas de destacar eram colocadas numa caixa forrada com papel absorvente humedecido, num local escurecido para evitar a fotoisomerização do ácido abscísico. O papel absorvente era humedecido para que o ar dentro da caixa tivesse uma humidade relativa elevada, assim se procurando evitar a desidratação das epidermes. Apesar de humedecido, o papel absorvente nunca se encontrava saturado de água, pois a existência de água livre na sua superfície poderia conduzir à dissolução do ácido abscísico e, conseqüentemente, à subestimação da sua concentração ao nível dos tecidos vegetais. As mesmas precauções foram tomadas relativamente às porções de lâmina contendo o mesófilo.

Cada amostra de lâmina com mesófilo tinha cerca de 1 g. Para obter uma amostra de epiderme abaxial, suficientemente grande

para possibilitar a quantificação do ácido abscísico, era necessário destacar a epiderme de pelo menos 10 folhas (cerca de 0,3 g), o que correspondia à totalidade das folhas de uma planta. Após a colheita, as amostras eram pesadas, colocadas num tubo plástico envolto em papel de alumínio e mergulhadas em azoto líquido. O material era então guardado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até se proceder à extracção do ácido abscísico.

8.2. Amostras da solução xilémica foliar

Os exsudados xilémicos foram recolhidos em folhas pressurizadas na câmara de pressão. De modo a minimizar a contaminação dos exsudados com o conteúdo de células destruídas no processo de corte do pecíolo, após a determinação do potencial hídrico, a extremidade de corte era enxuta com papel absorvente. Em alguns casos procedeu-se também a uma lavagem prévia da superfície de corte com um jacto de água destilada, sendo desprezado o exsudado produzido quando se aumentava a pressão da câmara 0,1 MPa acima da pressão de equilíbrio. Só então se procedia à recolha das amostras de exsudados xilémicos. Para tanto, a pressão na câmara era aumentada de 0,2 a 0,3 MPa e o exsudado era recolhido, durante cerca de 3 minutos, num capilar de vidro. A amostra (10 a 20 μl) era transferida para um tubo "ependorf" e imediatamente congelada em azoto líquido, sendo posteriormente guardada numa arca a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até se proceder à sua análise. Em alguns ensaios, após a recolha desta primeira amostra, a pressão na câmara foi novamente aumentada, sendo recolhida uma segunda, ou mesmo uma terceira amostra, com um volume de exsudado semelhante ao anterior. A recolha das diversas amostras de uma dada folha demorou, no máximo, 20 minutos. De acordo com Ackerson & Radin (1983), este período de tempo é insuficiente para que ocorra produção de ácido abscísico por parte da folha pressurizada.

Deverá ser tido em conta que a composição das amostras assim recolhidas poderá não ser precisamente a mesma da solução do xilema foliar. O procedimento adoptado no presente trabalho, nomeadamente a selecção da sobrepressão a aplicar para a recolha da primeira amostra, corresponde àquele que, segundo Jachetta *et al* (1986), permite recolher exsudados de folhas de girassol que mais se aproximam da solução xilémica existente ao nível do pecíolo e nervuras principais. Segundo os mesmos autores, a fracção seguinte corresponderá a água proveniente das nervuras secundárias e paredes celulares, enquanto que os exsudados

recolhidos quando se aplicam sobrepressões superiores a 0,4 MPa conterão água proveniente das células vivas, a qual terá sido filtrada pelo plasmalema. Contudo, este método acarreta riscos de as amostras de xilema se encontrarem contaminadas com exsudados floémicos e com o conteúdo de células destruídas quando se efectuou o corte do pecíolo. Segundo Hartung *et al* (1988) e Meinzer & Moore (1988), a probabilidade de tal ocorrer é maior na fracção de amostra recolhida inicialmente. Um modo de evitar tal problema seria desprezar a fracção inicial de exsudado. Contudo, tal implicaria aumentar a sobrepressão a aplicar para provocar a exsudação, o que, como já foi referido, pode acarretar alterações ao nível da composição dos exsudados: quando se prolonga a recolha de exsudados, ou aumenta a pressurização, a concentração de solutos dos exsudados decresce progressivamente, reflectindo a contribuição crescente para a sua composição de água de origem celular filtrada através das membranas celulares (Jachetta *et al*, 1986; Meinzer & Moore, 1988).

9. Quantificação do ácido abscísico

A quantificação do ácido abscísico em *Commelina communis* foi feita por cromatografia gasosa. Nos restantes ensaios utilizou-se uma técnica imunoenzimática, mais precisamente o teste ELISA.

9.1. Cromatografia gasosa

Entre as várias técnicas de cromatografia gasosa, a análise do ácido abscísico foi feita por cromatografia gás-líquido, na qual a fase estacionária é um líquido de elevado ponto de ebulição, assente sobre um suporte sólido, a fase móvel é um gás inerte e os componentes da mistura a analisar são transportados na forma gasosa. Quanto ao modo de operação, usou-se a técnica de eluição, na qual o gás de arrastamento flui continuamente através da coluna. A amostra líquida volatizada é rapidamente introduzida no caudal gasoso e assim transportada ao longo da coluna onde tem lugar a separação dos componentes da amostra: cada um destes distribui-se de acordo com o seu coeficiente de partilha entre a fase móvel (gás) e a fase estacionária (líquida), emergindo assim da coluna em tempos diversos.

Como sistema de detecção utilizou-se um detector de captura de electrões. Este possui uma câmara de ionização, na qual o gás de arrastamento é ionizado por acção de uma fonte de emissão β . No processo de colisão são produzidos electrões de baixa energia,

os quais são recolhidos por um ânodo, produzindo-se uma corrente que é medida. Quando um composto electronegativo emerge da coluna, tem lugar uma reacção entre as moléculas do composto e os electrões, pelo que a corrente eléctrica diminui.

As técnicas utilizadas para extracção, purificação e análise do ácido abcísico foram propostas por Quarrie (1978), sendo as suas etapas descritas seguidamente.

9.1.1. Extracção do ácido abcísico

Para a análise do ácido abcísico por cromatografia gasosa com um detector de captura de electrões, as amostras têm de ser previamente metiladas de modo a formar metilabcisato (Me-ABA), o qual não só é fortemente electronegativo como é volatizável à temperatura da coluna do cromatógrafo (Seeley & Powell, 1970). O facto de o ABA ser detectado sob a forma de metilabcisato implica a necessidade de ter certos cuidados na escolha do solvente de extracção. Tanto o metanol como a acetona são solventes eficazes do ABA. Contudo, a utilização do metanol pode conduzir à formação de artefactos de extracção. Concretamente, pode-se formar metilabcisato a partir da transesterificação do ácido abcísico conjugado com glúcidos (Milborrow & Mallaby, 1975). Assim, a extracção com metanol pode conduzir à sobrestimação da concentração de ácido abcísico, visto este ser detectado sob a forma de metilabcisato na técnica empregue. Por essa razão optou-se por utilizar a acetona como solvente de extracção. Contudo, esta opção acarreta a necessidade de tomar cuidados reforçados no manuseamento das amostras, nomeadamente a sua protecção da luz, já que a fotoisomerização do ABA (conversão do isómero natural 2-cis no isómero 2-trans) é mais rápida em acetona do que em metanol (Milborrow & Mallaby, 1975).

Após serem transferidas para tubos de centrífuga, de vidro e com fundo cónico, adicionaram-se 3 ml de acetona a cada amostra contendo mesófilo. No caso das amostras de epiderme abaxial o volume de acetona foi reduzido para 1 ml. Durante todo o processo de extracção os tubos foram protegidos da luz, permanecendo também rolhados, sempre que possível, de modo a minimizar a evaporação da acetona. Para facilitar a extracção, provocou-se a ruptura das células por ultra-sons. Para tanto, foi usado um desintegrador por ultra-sons (Modelo P3G 100 150W, MSE Ltd., Inglaterra), equipado com uma micropona. Cada amostra foi sujeita a desintegração durante 10 minutos, a uma amplitude de 20 μm e 15 μm , respectivamente, no caso de amostras de mesófilo e

epiderme. Enquanto permaneciam no desintegrador por ultra-sons, os tubos contendo as amostras foram arrefecidos por imersão num banho de gelo salino. Seguidamente, as amostras foram centrifugadas a cerca de 650 g, durante 7 minutos e o sobrenadante foi guardado a -20 °C até se proceder à purificação.

Nas amostras que continham mesófilo, a eficácia da extracção foi controlada visualmente pela perda de coloração do sedimento. Caso este se apresentasse ainda verde, indicando a presença de clorofila, era ressuspenso em acetona e novamente sujeito a desintegração por ultra-sons, centrifugado e o segundo sobrenadante adicionado ao anterior. Em algumas amostras foi necessário proceder a uma terceira extracção.

Nas amostras de epiderme, o processo de desintegração celular e, conseqüentemente, a extracção do ABA, deverão ser mais eficazes, visto que o tecido possui uma única camada de células. Neste caso, os sobrenadantes das duas extracções sucessivas foram guardados separadamente. A análise do sobrenadante da 2ª extracção de algumas amostras revelou que o valor obtido por adição das quantidades de ácido abscísico presentes nos dois sobrenadantes não diferia do valor estimado a partir da análise do primeiro extracto, desde que se tivesse em consideração que ao recolher o sobrenadante não é possível recuperar a totalidade do volume de solvente adicionado às amostras, visto que parte deste fica retido juntamente com o sedimento. Assim, na maioria das amostras analisou-se somente o primeiro extracto.

9.1.2. Purificação do ácido abscísico

A purificação das amostras foi feita por cromatografia de camada fina em placas (50 por 100 mm) de sílica-gel com 0,25 mm de espessura (Merck 60F254). Em cada placa foram aplicados 600 µl de extracto, numa banda contínua distando cerca de 5 mm da base da placa. A aplicação das amostras foi feita sobre uma placa de aquecimento (temperatura inferior a 50 °C), sendo dirigido um caudal de ar sobre a banda de aplicação da amostra de modo a acelerar a evaporação da acetona. As placas eram guardadas no escuro até se proceder à migração das amostras. Esta teve lugar em acetato de etilo, dentro de cristalizadores de vidro, com tampa, cujas paredes internas estavam forradas com papel de filtro para assegurar a saturação de vapor dentro do tanque de cromatografia.

Após o desenvolvimento das placas, a posição da banda contendo o ABA foi determinada por comparação com uma placa de

referência desenvolvida simultaneamente. Nesta placa, juntamente com uma amostra de um dos extractos a analisar, aplicou-se também uma solução de ácido abcísico em etanol, suficientemente concentrada ($0,1 \text{ g l}^{-1}$) para poder ser visualizada pela atenuação da fluorescência quando irradiada com luz ultra-violeta de 254 nm. A banda contendo o ácido abcísico (5 mm de largura) era então removida, com o auxílio de um bisturi, para uma pipeta Pasteur cuja ponta tinha sido previamente cheia de lã de vidro. A eluição do ABA foi feita com cerca de 1 ml de acetato de etilo bidestilado e saturado com água. O eluente foi seguidamente evaporado, no escuro e sob um caudal de ar desprovido de oxigénio.

9.1.3. Metilação do ácido abcísico

A metilação das amostras purificadas e secas foi feita com diazometano. Para fazer cerca de 5 ml de solução de diazometano, preparou-se inicialmente uma mistura de reacção contendo etanol, éter dietílico e "diazald" (N-metil, N-nitroso-p-tolueno sulfonamida, Sigma) nas proporções 1:5:0,86 (vol./vol./massa), respectivamente. Esta mistura foi agitada num banho de gelo, durante 5 minutos, mantendo-se o tubo rolhado. Em seguida juntou-se 1 ml de uma solução aquosa a 50% de hidróxido de potássio. A mistura foi então aquecida em banho-maria, tendo início a libertação de gases quando a temperatura atingia os $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Para que a reacção tivesse lugar lentamente, a temperatura do banho foi mantida abaixo de $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O gás libertado, após passar por um tubo vazio (que era aquecido por uma corrente de ar quente, para evitar condensação), borbulhava num terceiro tubo contendo 3 ml de éter dietílico. Este tubo era arrefecido num banho de gelo para provocar a condensação. A solução de diazometano assim obtida era guardada em frascos de vidro, hermeticamente fechados, numa arca congeladora ($-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$) localizada numa câmara com exaustor de gases. Aliás, todas as etapas de preparação do diazometano, assim como a posterior metilação das amostras, foram levadas a cabo numa câmara com exaustor de gases, dado que os vapores libertados são altamente tóxicos.

Para a metilação das amostras, juntaram-se $150 \mu\text{l}$ da solução de diazometano ao resíduo seco de cada amostra, sendo os tubos imediatamente rolhados e mantidos no escuro durante 15 minutos. Em seguida, as amostras foram novamente secas em ar desprovido de oxigénio e o resíduo seco dissolvido em $100 \mu\text{l}$ de ciclo-hexano contendo $52,7 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ de etilabcisato (este último amavelmente

cedido pelo Doutor J. Zhang).

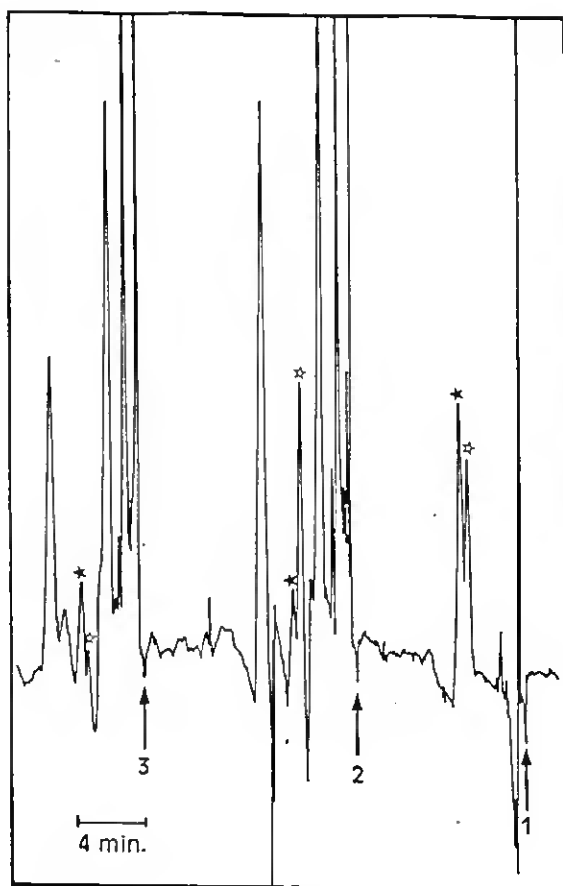


Fig. 3

Cromatogramas obtidos após injeção de 1 - 1,5 μ l de solução referência, 2 - 1 μ l de amostra de mesófilo de uma planta sujeita a déficit hídrico e 3 - 1 μ l de amostra de mesófilo de uma planta regada. São assinalados os picos correspondentes ao etilabscisato [símbolos a cheio] e ao metilabscisato [símbolos abertos].

9.1.4. Quantificação do ácido abscísico por cromatografia gasosa com detector de captura de electrões

No presente trabalho utilizou-se um cromatógrafo Pye Unicam 104. A temperatura do detector, coluna e injetor era de 250 $^{\circ}$ C, 230 $^{\circ}$ C e 240 $^{\circ}$ C, respectivamente. A fase estacionária era constituída por silicone SE-30 1,5% em diatomite de malha 80-100 (Phase Sep. Ltd, Inglaterra), contida numa coluna de vidro (150 x 0,4 cm). Como fase móvel utilizou-se azoto com um caudal de 40 ml por minuto.

Nestas condições, o metilabscisato (Me-ABA) é detectado cerca de 3 minutos após a injeção, sendo o etilabscisato (Et-ABA) detectado cerca de meio minuto depois (fig. 3). Os ésteres metílicos e etílicos do isómero trans-trans do ácido abscísico

emergem da coluna só 4 minutos depois da injeção da amostra. Os contaminantes detectados logo após o pico inicial correspondem a impurezas existentes nas placas de sílica-gel utilizadas no processo de purificação das amostras (Quarrie, 1978).

Só 1 μl de cada extracto é que foi injectado na coluna, sendo as áreas dos picos dos cromatogramas determinadas usando um integrador (Autolab minigrator, Spectra-Physics, U.S.A.). Antes de analisar as amostras, procedeu-se sempre à injeção de 2 μl de solvente (ciclo-hexano) para testar a limpeza da coluna. Seguidamente, era injectada uma solução de referência contendo Et-ABA (na mesma concentração que nas amostras - 52,7 $\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$) e Me-ABA (numa concentração de 53,7 $\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$) diluídos em ciclo-hexano. Na figura 3 apresentam-se cromatogramas representativos da solução de referência e de 2 amostras.

A concentração de ácido abscísico ([ABA]) nos extractos purificados foi determinada comparando a razão entre as áreas dos picos de metilabscisato (Me-ABA) e de etilabscisato (Et-ABA) no extracto e na solução de referência e multiplicando pela concentração de metilabscisato na solução de referência:

$$[\text{ABA}] \mu\text{l}^{-1} = \frac{[(\text{Me-ABA}) / (\text{Et-ABA})]_{\text{extracto}}}{[(\text{Me-ABA}) / (\text{Et-ABA})]_{\text{referência}}} * 53,7 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1} \quad (5)$$

Multiplicando pela razão volume total de extracto/massa da amostra, obtinha-se a concentração de ácido abscísico nas amostras de tecidos foliares.

9.2. Técnica imunoenzimática - ELISA do tipo competitivo

A aplicação das técnicas imunológicas ao estudo dos reguladores endógenos de crescimento vegetal veio facilitar a quantificação destes compostos (Monroe, 1984; Walker-Simmons & Abrams, 1991). A amostra em análise é posta em contacto com anticorpos específicos para o composto que se pretende quantificar. O número de ligações anticorpo-antigene irá depender da quantidade de composto existente na amostra, o que pode ser evidenciado pela introdução no ensaio de marcadores radioactivos (técnica imunoradioactiva), compostos fluorescentes (técnica de imunofluorescência) ou enzimas (técnica imunoenzimática).

A técnica utilizada - ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay") - é uma técnica imunoenzimática, em que os anticorpos são imobilizados sobre um suporte sólido, enquanto que as enzimas e

antigenes se encontram em solução (Monroe, 1984). No procedimento competitivo adoptado, a amostra contendo o antigene a analisar é misturada com uma quantidade conhecida de conjugado antigene-enzima. Os antigenes livres e conjugados vão competir entre si por um número limitado de locais de ligação nos anticorpos adsorvidos à superfície do suporte sólido. Após remover, por lavagem, o conjugado não ligado, adiciona-se o substrato enzimático e quantifica-se a actividade da enzima conjugada ligada. Esta será tanto maior quanto menor a quantidade de antigene livre presente na amostra em análise. Para que o teste tenha o máximo de sensibilidade, a quantidade de antigene conjugado deverá ser igual (ou ligeiramente superior) ao número de locais de ligação nos anticorpos. Por seu lado, a amostra deverá ser diluída de modo a que o número de antigenes livres não ultrapasse o número de locais de ligação.

Para quantificar o ácido abcísico utilizaram-se módulos de análise comercializados pela Idetek (San Bruno, California). A análise é feita com anticorpos monoclonais altamente específicos para o isómero natural do ácido abcísico. Contrariamente ao que se verifica frequentemente com os anticorpos policlonais (Weiler, 1980), bem como com outros lotes de anticorpos monoclonais (Walker-Simmons *et al.*, 1991), os anticorpos comercializados pela Idetek não se ligam quer ao isómero trans, quer ao ABA conjugado com glucose, metilabcisato e catabolitos do ácido abcísico (ácidos faseico e di-hidrofaseico). A elevada especificidade destes anticorpos permite simplificar grandemente as etapas de purificação das amostras.

A quantificação do ABA nas amostras de exsudados xilémicos foi feita sem qualquer purificação prévia, pois esta era praticamente inviável dado o reduzido volume de cada amostra (10-20 μ l). Belefant & Fong (1989) verificaram que alguns ácidos orgânicos podem interferir no processo de quantificação do ácido abcísico através do teste ELISA da Idetek. A presença de ácidos orgânicos foi detectada no xilema de várias espécies (Marangoni *et al.*, 1986; Canny & McCully, 1988; Anderson & Brodbeck, 1989). Contudo, a sua concentração xilémica é cerca de 10 vezes menor que a concentração mínima testada por Belefant & Fong (1989). Assim, mesmo quando as amostras de exsudados xilémicos não são sujeitas a qualquer processo de purificação prévia, não é previsível que a quantificação do ABA no xilema sofra interferências devido à presença de ácidos orgânicos.

O procedimento de análise foi o indicado no manual da Idetek. A sensibilidade do teste utilizado é muito elevada,

permitindo a quantificação em amostras que contenham entre 0,02 e 5 pmol de ácido abscísico. Isto significa que este regulador de crescimento pode ser quantificado em amostras de reduzido volume, facto particularmente importante quando se analisam amostras de exsudados xilémicos: mesmo que a concentração de ABA seja da ordem de 10^{-5} mol m^{-3} , a sua análise pode ser feita em amostras de somente 2 μ l. Em cada alvéolo revestido com anticorpos (Idetek), juntamente com a amostra (1 a 2 μ l de exsudado diluído com tampão Tris salino - pH 7,5 - até perfazer 100 μ l), adicionaram-se 100 μ l de ácido abscísico conjugado com a enzima fosfatase alcalina, conjugado este também comercializado pela Idetek. Após incubação a 4 °C, durante 3 horas, efectuaram-se 3 lavagens sucessivas dos alvéolos (solução de lavagem Idetek) e só então se adicionou o substrato enzimático: p-nitrofenilfosfato. Este composto é incolor, mas, por reacção catalisada pela fosfatase alcalina, converte-se em p-nitrofenil, o qual tem uma coloração amarela. Ao fim de 60-90 minutos de incubação a 37 °C, a actividade enzimática foi quantificada por colorimetria, determinando-se a densidade óptica a 405 nm. Para tanto utilizou-se um espectrofotómetro de feixe vertical (Titertek Multiskan-Plus) que efectua a leitura dos 98 alvéolos de uma placa quase instantaneamente (cerca de 5 segundos).

Para cada placa determinou-se uma curva de calibração a partir da análise de soluções de (+) cis-trans-ABA (Sigma) em tampão Tris salino (pH 7,5). As curvas de calibração foram obtidas a partir dos resultados de alvéolos (duplicados) que continham 0, 0,02, 0,05, 0,1, 0,5, 2, 5 e 100 pmol (+)-ABA. A densidade óptica dos duplicados era muito semelhante (fig. 4), pelo que nos cálculos posteriores para a determinação da recta de calibração se consideraram os valores médios das repetições. A solução mais concentrada permite determinar a actividade enzimática associada à ligação não específica da enzima (LNS). A actividade enzimática máxima era registada em alvéolos que só continham tampão. A percentagem de ligação em cada amostra (L), ou solução de referência, era calculada a partir das leituras de densidade óptica (D.O.) dos alvéolos que continham a amostra, dos alvéolos só com tampão (L_0) e dos alvéolos com a solução de ácido abscísico mais concentrada (LNS):

$$L = (D.O. amostra - D.O. LNS) / (D.O. L_0 - D.O. LNS) * 100 \quad (6)$$

O logarítmo da concentração de ácido abscísico relaciona-se com a percentagem de ligação de uma forma sigmoidal, mas, como se

ilustra na figura 5, está linearmente relacionado com:

$$\text{Logit } L/L_0 = \ln [(L/L_0) / (100-L/L_0)] \quad (7)$$

Em todas as placas analisadas, o quadrado do coeficiente de correlação da calibração foi sempre igual ou superior a 0,98.

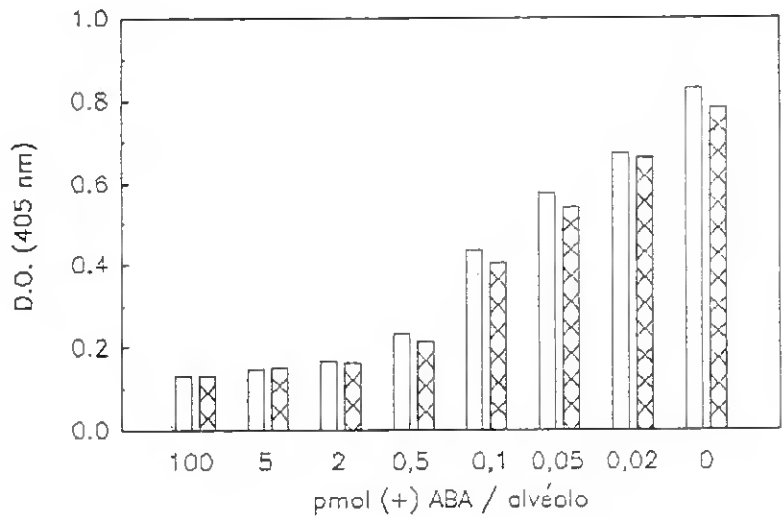


Fig. 4
Valores de densidade óptica (D.O.) a 405 nm, em função da quantidade de ácido abcísico (ABA) existente em cada alvéolo de uma placa. Para cada concentração de ácido abcísico são apresentados os valores obtidos em dois alvéolos de uma mesma placa.

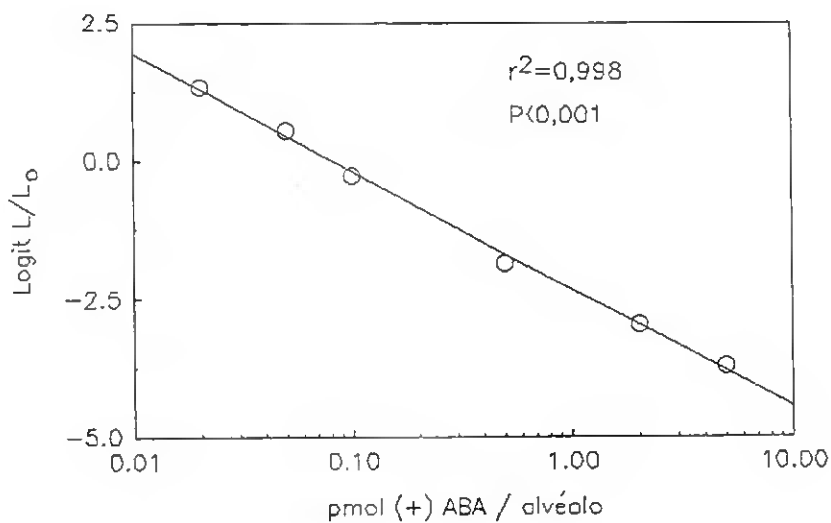


Fig. 5
Recta de calibração de uma placa ELISA, obtida a partir dos valores apresentados na figura 4.

10. Determinação das concentrações de glucose, frutose e sacarose

A quantificação da glucose, frutose e sacarose nos exsudados xilémicos foi feita por um método enzimático descrito por Jones *et al* (1977) e Stitt *et al* (1989). Por este método o teor em açúcares é determinado a partir da quantificação espectrofotométrica da reacção enzimática de redução do NADP^+ associada à conversão da glucose-6-fosfato em gluconato-6-P, após conversão enzimática sequencial dos restantes açúcares (frutose e sacarose) em glucose-6-fosfato, tal como esquematizado na figura 6.

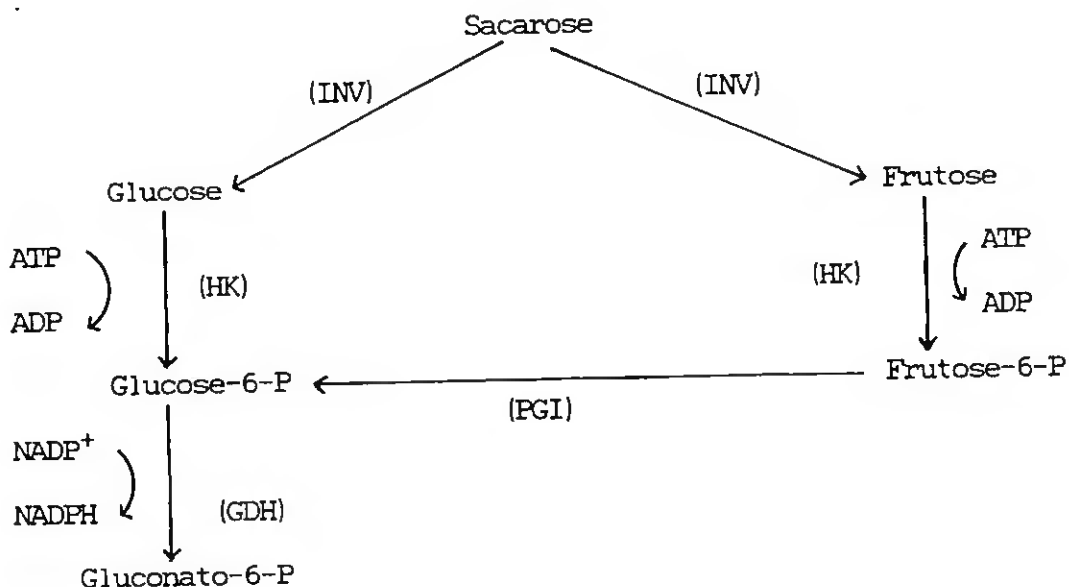


Fig.6 Esquema das reacções enzimáticas associadas à quantificação da concentração de açúcares. INV: invertase; HK: hexocinase; PGI: fosfoglucose-isomerase; GDH: desidrogenase da glucose-6-fosfato.

Utilizou-se um espectrofotómetro de duplo feixe e duplo comprimento de onda (Sigma ZFP22). Este permite determinar simultaneamente a absorvância da amostra em 2 comprimentos de onda (340 nm e 400 nm), sendo medida a diferença entre os dois. Um dos comprimentos de onda seleccionados (340 nm) corresponde ao pico de absorção do NADPH, sendo a absorvância deste último muito reduzida no outro comprimento de onda (400 nm). A interferência resultante da presença na amostra de compostos que absorvam nos 340 nm mas distintos do NADPH (e consequentemente com diferente espectro de absorção) é minimizada ao tomar-se como leitura a diferença de sinal nos 2 comprimentos de onda.

As amostras (1 a 2 μ l) foram diluídas directamente na cuvete do espectrofotómetro, a qual continha 600 μ l de uma solução com 100 mM imidazole HCl (pH 6,9), 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM NADP⁺, 1,1 mM ATP e 0,3 unidades de hexocinase (EC 2.7.1.1). A redução do NADP⁺ foi quantificada após a adição sequencial de 2 unidades de desidrogenase da glucose-6-fosfato (EC 1.1.1.49), 2 unidades de fosfoglucose-isomerase (EC 5.3.1.9) e 32 unidades de invertase (EC 3.2.1.26). Estas reacções permitem determinar a quantidade presente na amostra de, respectivamente, glucose, frutose e invertase. No caso das hexoses o número de moléculas presentes na amostra será igual ao número de moléculas de NADPH formado, enquanto que por cada molécula de sacarose hidrolisada se reduzem 2 NADP⁺.

11. Estimativa da concentração de ácido abcísico no xilema, tendo em conta a contaminação floémica dos exsudados.

Como foi referido no ponto 8.2. deste capítulo, é provável que o conteúdo de células floémicas, ou de parênquima, destruídas no acto de corte do pecíolo, contamine os exsudados xilémicos recolhidos a baixas sobrepressões (Hartung *et al.*, 1988; Meinzer & Moore, 1988). Sendo o pH do xilema geralmente inferior ao pH citoplasmático, é provável que a concentração de ácido abcísico no citoplasma seja superior à sua concentração apoplástica (Hartung & Slovik, 1991). Contudo, parece ser ao nível do floema que, em consequência da sua natureza alcalina, se encontram as concentrações mais elevadas de ABA (Hoad, 1978; Zeevaart & Boyer, 1984). Consequentemente, a concentração xilémica de ácido abcísico poderá ser sobrestimada quando aquele regulador de crescimento é quantificado em exsudados xilémicos que sofreram contaminação celular e, em particular, contaminação floémica.

Se a concentração de ácido abcísico ao nível celular ou floémico for muito superior à sua concentração xilémica, então será de esperar que a sua concentração nos exsudados de folhas pressurizadas se encontre positivamente correlacionada com a contaminação de origem floémica e/ou parenquimatosa dos mesmos. Como já foi referido anteriormente, a contaminação de origem floémica é aquela que poderá resultar numa maior sobrestimação da concentração de ácido abcísico. No presente trabalho, considerou-se que o xilema será desprovido de sacarose, a qual é o principal açúcar existente no floema. Assim, a presença de sacarose nas amostras de exsudados xilémicos foi considerada um indicador de que estas se encontravam contaminadas com floema. A concentração

xilémica de ABA foi estimada a partir da correlação entre as concentrações deste regulador de crescimento e de sacarose determinadas nos mesmos exsudados, tal como é exemplificado na figura 7. Concretamente, estimou-se a concentração de ácido abcísico no xilema com sendo o valor da intercepção nas ordenadas da relação ABA vs sacarose, ou seja, a concentração de ácido abcísico quando a concentração de sacarose é igual a zero.

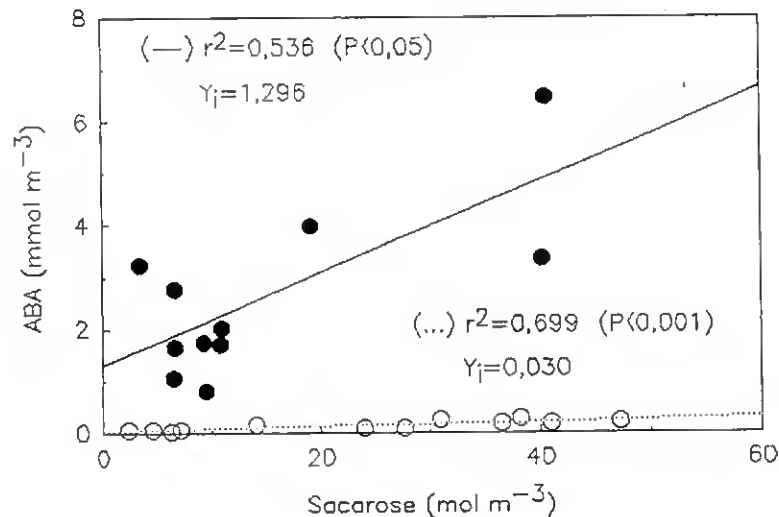


Fig. 7

Relação entre as concentrações de ácido abcísico (ABA) e de sacarose determinadas nos exsudados xilémicos recolhidos de folhas de plantas de Lupinus albus L. sujeitas a um período de supressão de rega (símbolos a cheio) ou regadas diariamente (símbolos abertos). São indicados os quadrados dos coeficientes de correlação (r^2) e respectivos níveis de significância, assim como o valor da intercepção nas ordenadas (Y_i), o qual foi considerado como uma estimativa da concentração de ácido abcísico no xilema não contaminado.

O processo adoptado para estimar a concentração xilémica de ácido abcísico pode conduzir à subestimação da concentração daquele regulador de crescimento, caso não se verifique o pressuposto de que a concentração de sacarose é negligível ao nível do xilema. Concentrações de sacarose iguais ou superiores a 5 mM foram detectadas no apoplasto foliar de cana do açúcar (Meinzer & Moore, 1988) e no xilema de raízes de milho (Canny & McCully, 1988). Por outro lado, Minchin & McNaughton (1987) obtiveram dados experimentais que demonstram a possibilidade dos hidratos de carbono serem transportados no xilema de Lupinus angustifolius. Contudo, segundo Pate (1975), a concentração de açúcares no xilema de plantas herbáceas é muito pequena, ou mesmo nula. No caso concreto de Lupinus albus, uma das espécies estudadas no presente trabalho, Layzell et al (1981) não detectaram a presença de sacarose no xilema. Por outro lado, em

plantas lenhosas caducifólias, só foram detectadas quantidades significativas de açúcares no xilema de plantas desprovidas de folhas, sendo ínfima a concentração xilémica de açúcares após o rebentamento dos gomos (Marangoni *et al.*, 1986; Anderson & Brodbeck, 1989). Assim, tanto no caso de Lupinus albus como de Vitis vinifera, os dados experimentais obtidos por Layzell *et al.* (1981) e Marangoni *et al.* (1986) fundamentam o pressuposto da ausência de sacarose no xilema, no qual se baseou a estimativa da concentração xilémica de ácido ascórbico.

12. Análise estatística dos resultados

A comparação entre as médias de 2 tratamentos foi feita pelo teste de Student. Nos casos em que as comparações envolviam mais de 2 tratamentos utilizaram-se os testes de Student-Newman-Keuls (SNK) ou Games e Howell, consoante a análise prévia da homogeneidade das variâncias (teste de F_{\max}) tivesse indicado que as variâncias eram homogêneas ou heterogêneas. A comparação de regressões foi feita por análise de covariância (Sokal & Rohlf, 1981).

IV. EFEITOS DA DESIDRATAÇÃO DAS RAÍZES SOBRE A ABERTURA ESTOMÁTICA, NA AUSÊNCIA DE DÉFICE HÍDRICO FOLIAR

1. Introdução - Sinais positivos versus sinais negativos ou cumulativos

Como foi referido no capítulo II, a desidratação das raízes pode provocar o decréscimo da condutância estomática, mesmo quando não ocorre défice hídrico foliar. O estado hídrico das raízes poderá afectar directamente o controlo da abertura dos estomas através da transmissão de sinais químicos, de natureza hormonal, das raízes para as folhas. A "comunicação" à parte aérea da redução da disponibilidade de água no solo poderá efectuar-se através do envio pelas raízes de mensagens positivas, negativas e/ou cumulativas. Na primeira hipótese a limitação da abertura estomática resultaria do aumento do transporte de um, ou mais compostos inibidores da abertura dos estomas. O decréscimo da condutância estomática poderá também resultar de mensagens negativas, isto é, da diminuição do fornecimento pelas raízes de compostos promotores da abertura estomática. O encerramento estomático aquando da desidratação das raízes poderá também resultar de sinais cumulativos, ou seja, da acumulação na parte aérea de compostos inibidores da abertura estomática, os quais normalmente seriam transportados para as raízes.

O crescimento e actividade das raízes é menos sensível ao défice hídrico do que o crescimento foliar, tendo sido detectada a manutenção do crescimento das raízes quando estas são sujeitas a défice hídrico moderado mas suficientemente intenso para inibir o crescimento da parte aérea (Sharp & Davies, 1979; Sharp *et al.*, 1988; Creelman *et al.*, 1990). Assim, segundo Davies & Zhang (1991), as mensagens cumulativas só deverão assumir alguma importância em situações de défice hídrico severo, ou seja, quando se verifica uma forte inibição do crescimento e actividade das raízes e, conseqüentemente, uma diminuição do transporte floémico para as raízes.

Caso o encerramento dos estomas seja devido ao transporte de um inibidor produzido pelas raízes desidratadas, será de prever o restabelecimento de ampla abertura estomática quando as folhas são destacadas e incubadas em água. Num estudo levado a cabo em plantas de milho sujeitas a desidratação de metade do seu sistema radicular, Blackman & Davies (1985) verificaram que fragmentos

foliares, destacados a meio do dia, mantinham as diferenças de abertura estomática relativamente a fragmentos foliares destacados de plantas cujo sistema radicular se encontrava bem hidratado, quando eram incubados em água e o ar era desprovido de CO₂. Contudo, as referidas diferenças de abertura estomática não se verificavam quando se introduzia cinetina, ou zeatina, no meio de incubação. Blackman & Davies (1985) interpretaram estes resultados como sendo indicadores da existência de um sistema de comunicação entre raízes e parte aérea envolvendo mensagens negativas, no qual as citocininas desempenhariam um papel determinante.

A importância das mensagens negativas, provenientes das raízes, para a manutenção de amplas aberturas estomáticas é sugerida pelo facto de a remoção de parte do sistema radicular de girassol (Aston & Lawlor, 1979) e cana do açúcar (Meinzer & Grantz, 1990) resultar no decréscimo da condutância estomática, apesar do estado hídrico foliar não ser afectado. No mesmo sentido apontam os resultados de Meinzer et al (1991). Estes autores verificaram que o decréscimo da condutância estomática, que ocorre à medida que aumenta o tamanho de plantas de cana de açúcar bem regadas, estava associado à diminuição da taxa de transporte para as folhas de citocininas e iões potássio provenientes das raízes.

No entanto, Davies et al (1986) e Davies & Zhang (1991) questionaram a possibilidade de um sistema de controlo estomático pelo estado hídrico das raízes baseado no envio de mensagens negativas, nomeadamente nas variações do fornecimento das citocininas, ser suficientemente sensível para ter relevância em situações de défice hídrico moderado quando só uma pequena parte do sistema radicular é desidratado. Nessas circunstâncias a abertura estomática só poderá ser eficazmente controlada pela limitação do fornecimento de citocininas pelas raízes, se as folhas dependerem das raízes para a produção de citocininas. Ora, apesar de as raízes parecerem ser o principal local de síntese das citocininas (Chen et al, 1985), Salama & Wareing (1979) constataram que as folhas destacadas não são desprovidas de capacidade de produzir citocininas, desde que não sofram défice hídrico ou deficiência em nutrientes inorgânicos.

O trabalho de Neales et al (1989) também parece questionar o envolvimento das citocininas nas respostas de encerramento estomático em situações de défice hídrico moderado. Aqueles autores não detectaram qualquer alteração na concentração de citocininas nos exsudados de raízes de girassol parcialmente

desidratadas. Por outro lado, Henson et al (1989b) verificaram que as diferenças de abertura estomática, entre folhas de plantas regadas e de plantas sujeitas a déficit hídrico radicular, são anuladas quando as folhas são destacadas e o seu pecíolo imerso em água. Aliás, mesmo no trabalho de Blackman & Davies (1985) a persistência de efeitos estomáticos da desidratação em fragmentos foliares só se verificava quando o destacamento ocorria a partir do fim da manhã, não ocorrendo em fragmentos destacados 2 horas após o início do fotoperíodo. Estes resultados são contrários ao que seria de esperar se na origem da limitação da abertura estomática estivesse uma mensagem negativa ou cumulativa, sugerindo, pelo contrário, que a depressão da condutância estomática será provocada pela presença, no fluxo transpiratório de plantas intactas, de um inibidor da abertura dos estomas.

Também Munns & King (1988) concluíram que uma mensagem positiva estaria na origem do encerramento dos estomas de plantas de trigo sujeitas a desidratação do solo em vasos pressurizados. Segundo estes autores, o ácido abscísico não é o inibidor da abertura estomática produzido nas raízes desidratadas e transportado no fluxo transpiratório de plantas de trigo. Contudo, trabalhos realizados noutras espécies indicam que esse papel deverá ser desempenhado pelo ABA (Neales et al, 1989; Zhang & Davies, 1989a,b, 1990, 1991; Tardieu et al, 1991).

Independentemente do ácido abscísico ser ou não o inibidor responsável pelo fecho estomático associado à desidratação radicular, se a limitação da abertura dos estomas for devida a uma mensagem positiva, então quando as raízes secas são removidas a condutância estomática deverá voltar aos valores registados antes de se terem desidratado as raízes. Pelo contrário, se o controlo estomático depender de mensagens negativas ou cumulativas, a remoção de raízes secas não afectará a condutância, mas esta decrescerá se forem removidas raízes hidratadas.

No presente trabalho procurou-se avaliar a importância relativa das mensagens negativas, cumulativas e positivas para o encerramento dos estomas resultante da desidratação parcial do sistema radicular. Para tanto foram analisados os efeitos da remoção de raízes, desidratadas ou não, sobre a condutância estomática de Commelina communis.

2. Material vegetal e condições experimentais

A germinação das sementes de Commelina communis teve lugar

em viveiro, em tabuleiros de vermiculite. Ainda em viveiro, as plântulas de Commelina communis foram transplantadas para vasos, com 85 mm de diâmetro (uma planta por vaso), contendo composto "John Innes" nº 2. Quando as plantas apresentavam 3 a 4 folhas expandidas foram transferidas para uma câmara de crescimento. Nesse mesmo dia os vasos foram substituídos por outros de igual dimensão mas cujo fundo tinha sido removido e em seu lugar colocada uma rede com 0,4 cm de malha. Cada vaso foi colocado dentro de um recipiente opaco com um diâmetro ligeiramente inferior ao rebordo dos vasos, mas mais fundo que estes em cerca de 4 cm. Durante 2 semanas todos os vasos foram regados diariamente com água. Ao fim desse tempo observavam-se ápices radiculares a atravessar a rede que substituíra o fundo dos vasos. Para promover o desenvolvimento destas raízes, as plantas passaram a ser regadas com uma solução de nitrato de cálcio (2 mol m^{-3}) colocada no fundo do recipiente em que os vasos se encontravam suspensos. A solução era arejada pelo contínuo borbulhar de ar, de modo a evitar o desenvolvimento de condições de anaerobiose radicular. Ao fim de 3 semanas as raízes suspensas de metade dos vasos foram desidratadas.

Para desidratar as raízes, os vasos foram retirados dos suportes e suspensos de modo a fazer passar uma corrente de ar seco através das raízes suspensas. No primeiro ensaio realizado o processo de desidratação das raízes prolongou-se durante 50 minutos. No segundo ensaio este período foi reduzido para 20 minutos. Após as raízes suspensas terem sido desidratadas, os vasos foram recolocados nos respectivos suportes, desprovidos de solução nutritiva. Esta foi também retirada dos vasos das plantas testemunha, as quais não tinham sido sujeitas a qualquer tratamento de secagem das raízes. A rega das plantas passou a ser feita administrando água à superfície do solo. Procurou-se não regar em excesso, de modo a evitar que a água escorresse pelo fundo e re-hidratasse as raízes previamente secas. No segundo ensaio, cerca de 48 horas após se ter procedido à desidratação das raízes suspensas, estas foram removidas de metade das plantas, enquanto que no 6º dia de ensaio foram removidas as raízes das plantas testemunha.

A temperatura na câmara de crescimento oscilou entre 20 °C e 25 °C. A iluminação era fornecida por lâmpadas Thorn de halogéneo com vapor de mercúrio. O fotoperíodo foi de 16 horas luz/8 horas escuro. Durante o período de luz, a densidade de fluxo fotónico mínima ao nível do ápice caulinar era de $250 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (radiação fotossinteticamente activa).

As determinações da condutância foliar foram efectuadas, na página abaxial, por porometria de difusão (porómetro MK3 - Delta T Devices). Para evitar grandes variações de temperatura, o porómetro era colocado na câmara de crescimento pelo menos 15 minutos antes do início das medições.

As relações hídricas foram estudadas por higrometria de ponto de orvalho (cap. III.7). Para tanto utilizaram-se higrómetros, construídos nas oficinas da Universidade de Lancaster e descritos por Sharp (1981). As relações hídricas radiculares foram determinadas ao nível do ápice, sendo colocados, em cada higrómetro, 3 secções de raiz com cerca de 3 cm de comprimento. As raízes seleccionadas tinham um diâmetro igual ou superior a 0,1 cm. O potencial hídrico foliar foi determinado em discos com 0,6 cm de diâmetro, destacados de zonas de lâmina foliar desprovidas de nervuras principais, de modo a minimizar a diluição dos solutos celulares pela água apoplástica. O potencial de pressão foi calculado como a diferença entre o potencial hídrico e o potencial osmótico, tal como descrito no capítulo III.

As determinações da condutância e relações hídricas foliares foram efectuadas em folhas recém-expandidas (geralmente a 4ª folha, a contar do ápice, com mais de 3 cm de comprimento).

3. Resultados

No primeiro ensaio realizado as raízes suspensas foram sujeitas a desidratação forçada durante 50 minutos. Este tratamento não resultou em qualquer decréscimo da condutância estomática, tanto durante o dia em que se procedeu à desidratação parcial do sistema radicular (fig. 8), como no dia seguinte: 24 horas após a secagem das raízes a condutância da página abaxial era de $156 \pm 32 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $152 \pm 24 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, nas plantas sujeitas a desidratação parcial das raízes e naquelas cujo sistema radicular se encontrava totalmente hidratado.

A não detecção de resposta estomática à desidratação radicular não resultou de esta ter sido ineficaz. Apesar de não se terem registado alterações ao nível das relações hídricas foliares nas 24 horas que se seguiram ao tratamento de desidratação radicular (quadro I), no fim do período de secagem o potencial hídrico e o potencial de pressão das raízes decresceram significativamente (fig. 9).

Quadro I

Potencial hídrico (Ψ), potencial osmótico (Ψ_{Π}) e potencial de pressão (Ψ_p) de folhas recém-expandidas de plantas de *Connelina communis* L. com todo o sistema radicular bem hidratado (Hidrat.) ou com uma fracção de raízes sujeitas a desidratação forçada durante 50 minutos (Desidr.). Os valores apresentados são médias \pm desvio padrão de 5-6 réplicas.

Tempo após secagem de raízes	Ψ (MPa)		Ψ_{Π} (MPa)		Ψ_p (MPa)	
	Hidrat.	Desidr.	Hidrat.	Desidr.	Hidrat.	Desidr.
0 horas	-0,59 \pm 0,10	-0,49 \pm 0,05	-0,85 \pm 0,11	-0,72 \pm 0,07	0,26 \pm 0,04	0,23 \pm 0,03
5 horas	-0,47 \pm 0,07	-0,42 \pm 0,03	-0,82 \pm 0,10	-0,76 \pm 0,04	0,35 \pm 0,09	0,34 \pm 0,05
10 horas	-0,41 \pm 0,05	-0,38 \pm 0,06	-0,81 \pm 0,07	-0,79 \pm 0,06	0,41 \pm 0,09	0,40 \pm 0,06
24 horas	-0,49 \pm 0,10	-0,41 \pm 0,02	-0,80 \pm 0,08	-0,69 \pm 0,05	0,30 \pm 0,08	0,29 \pm 0,05

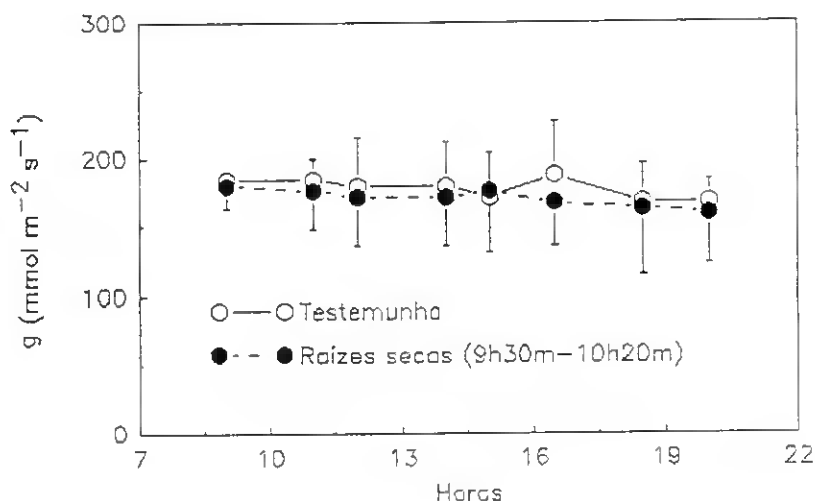


Fig. 8

Condutância para a difusão do vapor de água da página abaxial (g) de folhas recém-expandidas de plantas de *Connelina communis* L. com todo o sistema radicular hidratado (testemunha) ou sujeitas a 50 minutos de desidratação forçada de parte das raízes. Cada ponto corresponde à média de 8 determinações, sendo indicado o desvio padrão.

Ao longo do dia registou-se uma recuperação parcial das relações hídricas das raízes previamente secas (fig. 9), possivelmente devido a ocorrer a sua re-hidratação a partir das raízes das mesmas plantas que permaneciam hidratadas devido a estarem localizadas em solo húmido. Apesar disso, no dia seguinte, mais precisamente 24 horas após se ter procedido ao tratamento de secagem das raízes suspensas, estas apresentavam ainda um potencial hídrico (-0,68 \pm 0,15 MPa, n=6)

significativamente inferior ao das raízes das plantas testemunha ($-0,24 \pm 0,05$ MPa, $n=5$). O decréscimo do potencial hídrico das raízes secas foi compensado pela diminuição do potencial osmótico ($-0,91 \pm 0,16$ MPa nas raízes secas e $-0,59 \pm 0,10$ MPa nas raízes hidratadas), pelo que não se registaram diferenças estatisticamente significativas quanto ao potencial de pressão: $0,22 \pm 0,10$ MPa nas raízes previamente secas e $0,35 \pm 0,08$ MPa naquelas que não tinham sido sujeitas a qualquer período de desidratação.

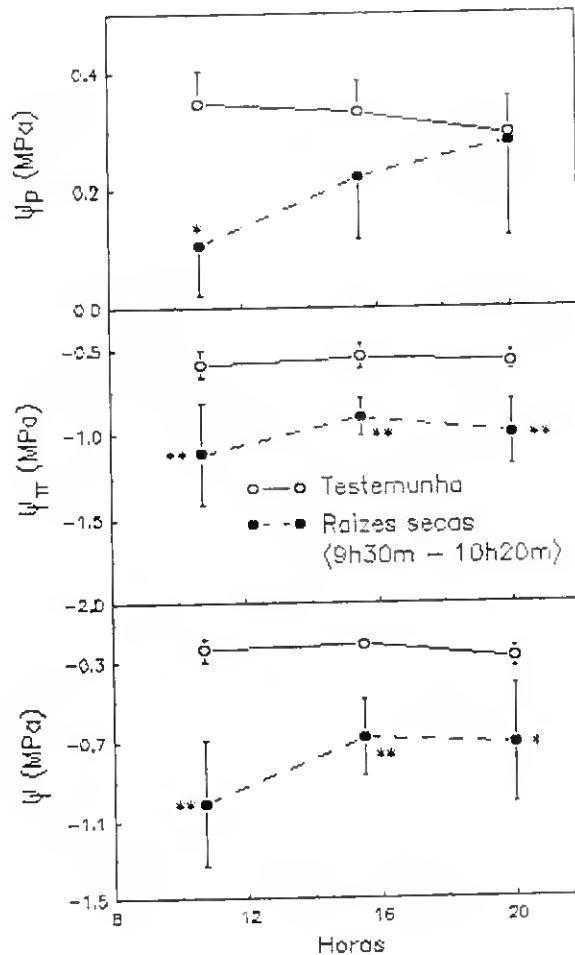


Fig. 9
Relações hídricas da zona apical de raízes de *Connelina communis* L. hidratadas (testemunha) ou sujeitas a 50 minutos de desidratação forçada. Cada ponto representa a média de 5-6 réplicas, sendo indicado o desvio padrão. As médias das determinações efectuadas em raízes secas significativamente diferentes (teste Student) das médias das raízes hidratadas, no mesmo período, são assinaladas com * ($P < 0,05$) ou ** ($P < 0,01$).

Note-se que, neste primeiro ensaio, 24 horas após se terem desidratado as raízes suspensas, a maior parte das raízes mais finas tinha morrido e eram visíveis zonas de constricção que isolavam os ápices das raízes mais grossas do resto do sistema

radicular. Pelo contrário, ao longo dos 6 dias pelos quais o segundo ensaio se prolongou não foram observados indícios de que a desidratação forçada das raízes suspensas tivesse conduzido à morte extensiva das mesmas.

No 2º ensaio, apesar da diminuição do período de desidratação, o tratamento afectou negativamente o potencial hídrico das raízes, persistindo este efeito nas 48 horas seguintes (quadro II). Tal como no ensaio anterior, o decréscimo de Ψ foi compensado por ajustamento osmótico, pelo que não se registaram diferenças de potencial de pressão entre os ápices radiculares das raízes hidratadas e daquelas que tinham sido desidratadas.

Quadro II

Potencial hídrico (Ψ), potencial osmótico (Ψ_{Π}) e potencial de pressão (Ψ_p) da zona apical de raízes de *Connelina communis* L. hidratadas (Hidrat.) ou sujeitas a um período de desidratação forçada de 20 minutos (Desidr.). Os valores apresentados representam médias \pm desvio padrão de 5 réplicas. As médias determinadas em raízes secas significativamente diferentes (teste de Student) da média determinada em raízes hidratadas, no mesmo período, são assinaladas com * ($P < 0,05$).

Tempo após secagem de raízes	Ψ (MPa)		Ψ_{Π} (MPa)		Ψ_p (MPa)	
	Hidrat.	Desidr.	Hidrat.	Desidr.	Hidrat.	Desidr.
4 horas	-0,41 \pm 0,05	-0,66 \pm 0,18*	-0,72 \pm 0,11	-0,94 \pm 0,24	0,31 \pm 0,07	0,32 \pm 0,14
25 horas	-0,25 \pm 0,04	-0,54 \pm 0,20*	-0,49 \pm 0,19	-0,84 \pm 0,19*	0,24 \pm 0,17	0,31 \pm 0,07
32 horas	-0,16 \pm 0,05	-0,58 \pm 0,30*	-0,50 \pm 0,16	-0,86 \pm 0,25	0,34 \pm 0,18	0,28 \pm 0,11
48 horas	-0,29 \pm 0,09	-0,50 \pm 0,14*	-0,66 \pm 0,24	-0,84 \pm 0,15	0,37 \pm 0,20	0,34 \pm 0,13

Quadro III

Potencial hídrico (Ψ), potencial osmótico (Ψ_{Π}) e potencial de pressão (Ψ_p) de folhas recém-expandidas de plantas de *Connelina communis* L. com todo o sistema radicular hidratado (Hidrat.) ou após uma fracção das raízes ter sido sujeita a um período de desidratação forçada com a duração de 20 minutos (Desidr.). Os valores apresentados são médias \pm desvio padrão de 4 réplicas.

Tempo após secagem de raízes	Ψ (MPa)		Ψ_{Π} (MPa)		Ψ_p (MPa)	
	Hidrat.	Desidr.	Hidrat.	Desidr.	Hidrat.	Desidr.
4 horas	-0,53 \pm 0,17	-0,52 \pm 0,17	-0,94 \pm 0,19	-0,93 \pm 0,11	0,41 \pm 0,09	0,41 \pm 0,08
25 horas	-0,44 \pm 0,21	-0,42 \pm 0,04	-0,79 \pm 0,29	-0,77 \pm 0,08	0,37 \pm 0,19	0,35 \pm 0,08
48 horas	-0,43 \pm 0,20	-0,45 \pm 0,11	-0,90 \pm 0,13	-0,92 \pm 0,20	0,47 \pm 0,08	0,47 \pm 0,21

Como se pode verificar na figura 10, a desidratação de parte do sistema radicular resultou no decréscimo da condutância foliar. As diferenças de condutância, entre plantas testemunha e aquelas cujas raízes tinham sido sujeitas a desidratação, persistiam mesmo 5 dias após a imposição do tratamento e não estavam associadas a quaisquer diferenças ao nível das relações hídricas foliares (quadro III).

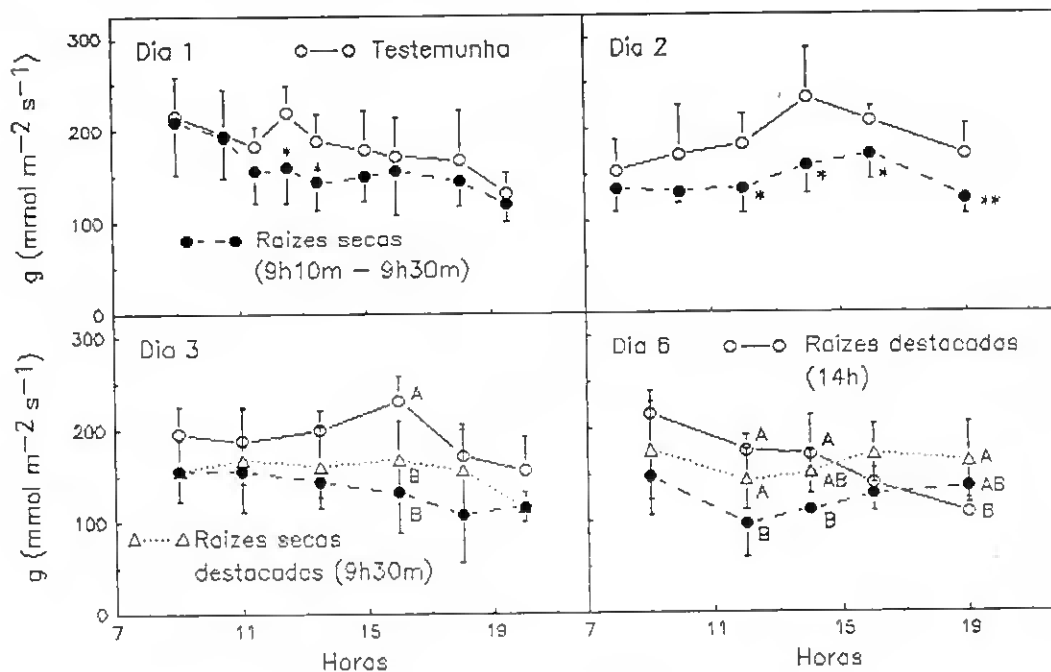


Fig. 10
Condutância para a difusão do vapor de água da página abaxial (g) de folhas recém-expandidas de plantas de *Connelina communis* L. com todo o sistema radicular hidratado (testemunha), sujeitas a 20 minutos de desidratação forçada de parte das raízes (raízes secas) ou após destacamento de parte das raízes. Cada ponto corresponde à média de 4 determinações, excepto no caso das plantas com raízes secas nos dois primeiros dias, em que $n=8$. As barras verticais representam o desvio padrão. As médias das determinações efectuadas, nos dois primeiros dias, nas plantas sujeitas a desidratação radicular significativamente diferentes (teste de Student) da média dos valores determinados, no mesmo período, nas plantas testemunha, são assinaladas com * ($P<0,05$) ou ** ($P<0,01$). Nos dias 3 e 6, as médias dos tratamentos significativamente diferentes entre si (teste SNK, $P<0,05$) são assinaladas com maiúsculas diferentes.

48 horas depois de se terem desidratado as raízes suspensas, estas foram destacadas de metade das plantas. A remoção das raízes desidratadas resultou numa recuperação parcial da abertura estomática. Como se pode verificar na figura 10, as plantas cujas raízes secas foram removidas tinham uma condutância foliar intermédia à das plantas testemunha e das plantas cujas raízes desidratadas não tinham sido destacadas. Estes valores relativos de condutância mantiveram-se no 6º dia de ensaio, ou seja, 72 horas após a excisão das raízes secas. Nesse mesmo dia procedeu-se ao destacamento das raízes suspensas das plantas testemunha.

Tal tratamento não afectou as relações hídricas foliares: antes das raízes serem removidas o potencial hídrico foliar era de $-0,52 \pm 0,08$ MPa (n=5), enquanto que 2 horas após a remoção das raízes $\Psi = -0,55 \pm 0,10$ MPa (n=4). O destacamento das raízes hidratadas resultou contudo num acentuado decréscimo da condutância foliar para valores inferiores aos registados nas plantas cujas raízes suspensas se encontravam desidratadas (fig. 10). No entanto, este efeito fortemente negativo do destacamento das raízes hidratadas sobre a abertura estomática foi transitório: 24 horas após se proceder ao destacamento das raízes hidratadas, as plantas apresentavam uma condutância abaxial de 152 ± 24 mmol m⁻² s⁻¹. Este valor, apesar de inferior à condutância que aquelas plantas apresentavam antes do destacamento das raízes suspensas (fig. 10), era igual à condutância das plantas cujas raízes secas tinham sido removidas (156 ± 24 mmol m⁻² s⁻¹) e superior à das plantas que mantinham as raízes desidratadas (116 ± 16 mmol m⁻² s⁻¹).

4. Discussão

A importância das mensagens negativas ou cumulativas parece ser sugerida pelo facto de a condutância estomática decrescer quando são removidas parte das raízes hidratadas (fig. 10), sem que tal esteja associado a quaisquer efeitos negativos do destacamento das raízes ao nível das relações hídricas foliares. Resultados semelhantes foram obtidos por Aston & Lawlor (1979) e Meinzer & Grantz (1990), respectivamente, em plantas de girassol e cana do açúcar. No presente trabalho, imediatamente após o destacamento das raízes hidratadas, a condutância foliar decresceu mesmo para valores inferiores aos das plantas com raízes desidratadas. Este efeito foi contudo transitório: 24 horas após o destacamento das raízes hidratadas a condutância foliar tinha valores superiores aos das plantas com raízes secas e semelhantes aos das plantas cujas raízes desidratadas tinham sido previamente destacadas. O acentuado encerramento estomático logo após o destacamento das raízes hidratadas poderá ter resultado de a ferida provocada pelo destacamento das raízes ter induzido a produção de um inibidor da abertura estomática, o qual só nas raízes hidratadas será facilmente transportado para a parte aérea (Heber et al., 1986). Mesmo após passar este efeito transitório, a condutância mantinha-se inferior à que as plantas apresentavam antes de terem sido removidas as raízes hidratadas (fig. 10), o que sugere o envolvimento de mensagens negativas

e/ou cumulativas na limitação da abertura estomática.

Contudo, a comparação dos dois ensaios em que se procedeu ao destacamento de raízes desidratadas parece questionar a hipótese da condutância estomática ser limitada pelo transporte de promotores da abertura dos estomas produzidos pelas raízes (mensagens negativas), ou pela acumulação foliar de inibidores da abertura estomática em virtude da diminuição da sua exportação floémica para as raízes (mensagens cumulativas). No primeiro ensaio, a morte e isolamento de parte do sistema radicular de Commelina communis não se reflectiu negativamente na condutância estomática (fig. 8), contrariamente ao verificado no segundo ensaio, no qual as raízes se mantiveram viáveis apesar da desidratação imposta. Estes resultados parecem sugerir que as mensagens negativas e cumulativas desempenharão um papel pouco relevante na regulação da abertura estomática pelo estado hídrico das raízes. Contudo, deverá ter-se presente o facto de não ter sido quantificada a proporção do sistema radicular que foi destacada, bem como aquela que foi sujeita a desidratação. Assim, não é possível excluir a hipótese de, no primeiro ensaio, a ausência de resposta estomática à desidratação das raízes ter resultado de a fracção de raízes desidratadas ser muito pequena e, conseqüentemente, pouco contribuir para a composição do fluxo transpiratório, independentemente da abertura dos estomas ser controlada por sinais negativos ou positivos.

No presente trabalho, o decréscimo do potencial hídrico das raízes estudadas foi compensado pela diminuição do potencial osmótico, pelo que a turgescência das raízes desidratadas se manteve constante (quadro II). Apesar de, a partir dos dados recolhidos nestes ensaios, não ser possível tirar qualquer conclusão quanto à natureza do inibidor estomático eventualmente produzido pelas raízes desidratadas, deverá referir-se que a não detecção de qualquer decréscimo da turgescência radicular não exclui necessariamente a hipótese de ter ocorrido aumento de produção de ácido abscísico ao nível da globalidade do sistema radicular de Commelina communis. Apesar de Pierce & Raschke (1980) terem concluído que a produção de ABA pelos tecidos desidratados representa uma resposta ao decréscimo do potencial de pressão, trabalhos posteriores indicaram que tanto a síntese de ácido abscísico (Ackerson & Radin, 1983), como a sua libertação no apoplasto (Hartung et al., 1983) não constituem uma resposta à diminuição do potencial de pressão, mas sim à redução do teor em água simplástica, o qual não foi quantificado no presente trabalho. Por outro lado, tal como foi referido nas condições

experimentais, as raízes em que foram analisadas as relações hídricas tinham pelo menos 0,1 cm de diâmetro. Num estudo realizado em Zea mays, Zhang & Davies (1989a) também verificaram que o ajustamento osmótico ao nível das raízes principais era capaz de compensar o decréscimo de potencial hídrico, daí resultando a manutenção da turgescência nessas raízes. Contudo, nas raízes finas das plantas de milho o decréscimo do potencial osmótico era insuficiente para evitar a diminuição do potencial de pressão, tendo Zhang & Davies (1989a) detectado, nessas condições, um significativo aumento da concentração de ácido abscísico no conjunto do sistema radicular. Contudo, não é possível concluir se o mesmo se terá verificado em Commelina communis, visto que no presente trabalho não foram analisadas nem as relações hídricas das raízes finas, nem a concentração radicular de ABA.

A comparação dos valores de Ψ nas raízes desidratadas (quadro II) e nas folhas das mesmas plantas (quadro III), poderá levantar dúvidas quanto à capacidade das raízes secas influenciarem a composição do fluxo transpiratório, visto que, encontrando-se suspensas no ar, não contribuem para a absorção de água e apresentam potenciais hídricos inferiores aos das folhas.

Zhang & Davies (1987b) demonstraram que o ácido abscísico existente nas raízes de Commelina communis pode ser transportado para as folhas, através do fluxo transpiratório, mesmo quando as raízes se encontram suspensas no ar e, conseqüentemente, não absorvem água. No trabalho anteriormente referido a acumulação de ácido abscísico nas raízes ocorreu por imersão das mesmas em soluções concentradas daquele regulador de crescimento, pelo que o potencial hídrico era relativamente elevado, contrariamente ao verificado nas raízes desidratadas (quadro II e fig. 9). Daí que as conclusões de Zhang & Davies (1987b) não possam ser extrapoladas para o presente trabalho. Contudo, Neales et al (1989) detectaram um significativo aumento da concentração de ABA no fluxo transpiratório de plantas de girassol após parte do sistema radicular, suspenso no ar, ter sido desidratado. No referido trabalho, o potencial hídrico das raízes secas também decresceu para valores inferiores aos do Ψ foliar e as diferenças de potencial hídrico entre as raízes secas e as folhas (cerca de 0,4 MPa) eram mesmo superiores às registadas no presente trabalho: 0,05 a 0,14 MPa (comparar quadros II e III).

Zhang & Davies (1987b) consideraram ser plausível que raízes desidratadas contribuam para o fluxo transpiratório, apesar do seu potencial hídrico durante o dia ser inferior ao resto da

planta. Segundo aqueles autores, durante a noite as raízes previamente secas poderão ser re-hidratadas a partir do resto da planta, estabelecendo-se um equilíbrio de potenciais hídricos. Esta hipótese é sustentada por dados experimentais que indicam que, em plantas com um sistema radicular profundo que explore camadas de solo com diferentes teores em água, a absorção de água a partir das raízes mais profundas permite, durante a noite, re-hidratar as raízes localizadas nas camadas superficiais mais secas (Richards & Caldwell, 1987). Assim, segundo Zhang & Davies (1987b), de manhã poderá estabelecer-se um gradiente de potencial favorável ao fluxo de água a partir das raízes previamente desidratadas, visto que o decréscimo de Ψ com o início da transpiração ocorre primeiro nas folhas. Contudo, esta situação deverá ser transitória, pois, contrariamente às raízes localizadas em solo húmido, as raízes localizadas em solo seco, ou suspensas no ar, não poderão repor imediatamente a água perdida, pelo que o seu potencial hídrico tenderá para valores mais negativos.

Se o encerramento estomático após desidratação das raízes resultasse exclusivamente da transmissão de mensagens positivas a partir das raízes secas, o destacamento destas deveria resultar na recuperação total de ampla abertura estomática. Tal facto não se verificou (fig. 10). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Gowing *et al* (1990) em *Malus domestica*. Estes autores, após terem provocado a desidratação de parte do sistema radicular, compararam os efeitos da re-hidratação e da remoção das raízes secas sobre a taxa de transpiração, tendo verificado que a reabertura estomática só era significativa quando as raízes eram re-hidratadas.

5. Conclusões

Estes resultados reforçam a hipótese de a abertura estomática ser controlada pelo estado hídrico das raízes, sendo sensível, nomeadamente, à desidratação parcial do sistema radicular, na ausência de défice hídrico foliar. O facto de a condutância foliar só ter recuperado parcialmente quando foram destacadas as raízes desidratadas indica que o encerramento estomático, associado à desidratação parcial do sistema radicular, não pode ser explicado recorrendo exclusivamente à intervenção de mensagens positivas. A referida persistência de limitações na abertura dos estomas após serem removidas as raízes secas, bem como o decréscimo da condutância estomática observado

após a remoção das raízes hidratadas, sugerem que também as mensagens negativas e/ou cumulativas participam no sistema de comunicação entre as raízes e a parte aérea que regula a abertura estomática.

V. EFEITOS DA IMPOSIÇÃO E ALÍVIO DE DÉFICES HÍDRICOS SEVEROS SOBRE A ABERTURA ESTOMÁTICA

1. Introdução - Efeitos a posteriori dos défices hídricos sobre a abertura dos estomas

Quando ocorre défice hídrico foliar, o encerramento estomático parece estar associado a alterações significativas do balanço hormonal. Contudo, como já foi referido no capítulo II, nas fases iniciais de desenvolvimento do défice hídrico nem sempre têm sido detectadas alterações dos níveis de reguladores endógenos de crescimento que permitam explicar as observadas variações da condutância estomática. Também no período de recuperação, após o alívio dos défices hídricos, foram detectadas discrepâncias entre as variações da concentração foliar de ácido abscísico e a condutância estomática.

A re-hidratação de plantas previamente submetidas a deficiência hídrica, nem sempre é acompanhada pela imediata reabertura dos estomas. Verifica-se frequentemente um atraso na recuperação da condutância estomática relativamente ao restabelecimento da hidratação dos tecidos foliares. Num estudo levado a cabo em laranjeiras, Fereres et al (1979) verificaram que, um mês após o alívio de défices hídricos muito severos (no decurso dos quais o potencial hídrico foliar, medido antes do nascer do Sol, atingiu valores inferiores a $-4,5$ MPa), a condutância estomática não tinha ainda recuperado totalmente dos efeitos da *secura* do solo. Fereres et al (1979) detectaram efeitos a posteriori dos défices hídricos sobre a abertura estomática mesmo em folhas jovens que se tinham desenvolvido após o restabelecimento da rega.

A persistência de baixas condutâncias estomáticas, mesmo em folhas que não sofreram directamente a experiência de défices hídricos, poderá resultar da alteração do balanço hormonal induzida pelos défices hídricos, caso o alívio destes não seja acompanhado pelo imediato restabelecimento do balanço hormonal pré-existente. Efectivamente, algumas das hipóteses avançadas para explicar os efeitos a posteriori dos défices hídricos sobre a abertura estomática atribuem um papel determinante aos reguladores endógenos de crescimento, nomeadamente ao ácido abscísico. Doerffling et al (1977), por exemplo, ao compararem os efeitos do défice hídrico sobre a abertura dos estomas de várias

espécies, verificaram que o atraso na reabertura dos estomas, aquando da re-hidratação, era tanto mais acentuado quanto maiores as quantidades de ácido abscísico acumuladas durante a imposição prévia de défices hídricos. Com base nestes resultados, aqueles autores concluíram que deverá existir uma relação causal entre a acumulação foliar de ABA e os efeitos a posteriori dos défices hídricos sobre a condutância estomática. No mesmo sentido apontam alguns dos resultados que Beardsell & Cohen (1975) obtiveram em folhas destacadas de Zea mays sujeitas a desidratação por períodos de tempo variáveis e subsequentemente re-hidratadas: o atraso na reabertura estomática só era detectável quando a desidratação prévia tinha sido suficientemente prolongada para induzir o aumento da concentração foliar global de ácido abscísico.

Os resultados de Liu & Dickmann (1992) sugerem também a existência de uma relação causal entre a concentração foliar de ácido abscísico e os efeitos a posteriori do défice hídrico sobre a abertura dos estomas. Num estudo comparativo do comportamento estomático de 2 clones de choupo, aqueles autores verificaram que o atraso na reabertura dos estomas, após o alívio de défices hídricos, só ocorria num dos clones. Este caracterizava-se também pelo facto de a concentração foliar de ABA decrescer muito lentamente após a re-hidratação das plantas. Em contrapartida, nas folhas do outro clone, a concentração de ácido abscísico decrescia rapidamente após o alívio do défice hídrico e, neste caso, Liu & Dickmann (1992) não detectaram efeitos a posteriori do défice hídrico sobre a condutância estomática.

Contudo, já em 1973, Loveys & Kriedemann tinham verificado que, após o alívio de défices hídricos em Vitis vinifera, o decréscimo da concentração foliar de ácido abscísico era mais rápido do que a reabertura dos estomas. Trabalhos posteriores revelaram que, durante o período de alívio de défices hídricos, a abertura estomática e o teor foliar em ácido abscísico também não se encontram correlacionados noutras espécies, nomeadamente, em Zea mays (Beardsell & Cohen, 1975), Gossypium hirsutum (Ackerson, 1980) e Panicum maximum (Ludlow et al, 1980). Por outro lado, durante a re-hidratação foliar de Xanthium strumarium, Cornish & Zeevaart (1984) verificaram que a concentração de ABA decrescia mais lentamente nas folhas em expansão do que nas folhas adultas. Apesar disso, os efeitos a posteriori do défice hídrico sobre a abertura estomática manifestavam-se igualmente nos dois tipos de folhas. Estes resultados sugerem que o atraso na reabertura dos estomas, após o alívio de défices hídricos, não resultará da

persistência de níveis residuais de ácido abscísico ao nível da folha inteira.

A aparente necessidade de acumulação foliar de ácido abscísico no decurso da imposição dos défices hídricos, para que ocorra o atraso na reabertura estomática aquando da re-hidratação (Beardsell & Cohen, 1975; Doerffling *et al*, 1977), poderá ser explicada, mesmo quando não persistem níveis residuais de ABA, se o agente responsável pelo atraso da recuperação estomática for, não o ácido abscísico, mas um seu produto de degradação que se acumule durante o processo de re-hidratação. Esta última condição é preenchida pelo ácido faseico, cuja concentração foliar aumenta concomitantemente com a redução do teor em ácido abscísico, logo após o início do processo de re-hidratação, decrescendo em seguida lentamente (Zeevaart, 1983; Cornish & Zeevaart, 1984). O envolvimento do ácido faseico nos efeitos *a posteriori* dos défices hídricos sobre a abertura estomática foi sugerido por Kriedemann *et al* (1975). Contudo, o trabalho de Sharkey & Raschke (1980) indica que o ácido faseico é um inibidor da abertura estomática pouco eficaz: apesar de ser capaz de reduzir a abertura dos estomas quando aplicado a folhas destacadas de Amaranthus powelli, Hordeum vulgare, Zea mays, Xanthium strumarium e Commelina communis, a resposta estomática é menos intensa do que a resultante da aplicação de iguais concentrações de ácido abscísico. Para além disso, o ácido faseico não afecta a abertura dos estomas de Vicia faba (Kriedemann *et al*, 1975, Sharkey & Raschke, 1980). Parece assim pouco provável que o ácido faseico seja o principal responsável pelos efeitos *a posteriori* dos défices hídricos sobre a abertura estomática. Contudo, não pode ser excluída a hipótese de este produto do metabolismo do ácido abscísico contribuir, pelo menos em algumas espécies, para o atraso da recuperação da condutância estomática durante o alívio de défices hídricos.

Note-se que, nos trabalhos até agora mencionados, nos quais se quantificou o ácido abscísico durante o alívio de défices hídricos, tais determinações foram feitas na globalidade dos tecidos foliares. No entanto, como já foi referido anteriormente (cap. II.2), o ácido abscísico actua directamente ao nível das células guarda em cujo plasmalema se localizam receptores deste regulador endógeno de crescimento (Hartung, 1983; Hornberg & Weiler, 1984). Consequentemente, o conteúdo foliar global em ácido abscísico terá pouco significado do ponto de vista da fisiologia estomática, caso este regulador endógeno de crescimento não se encontre homogeneamente distribuído pelos

diferentes tecidos foliares.

Raschke (1987) avançou várias hipóteses para explicar os efeitos a posteriori dos défices hídricos sobre a abertura estomática. Uma dessas hipóteses considera a possibilidade de o decréscimo da concentração de ácido abscísico ser mais lento na epiderme do que no mesófilo. Singh et al (1979) detectaram, em epidermes destacadas de Commelina communis e Tulipa gesneriana, actividade de catabolismo do ácido abscísico. Posteriormente, Grantz et al (1985) verificaram a manutenção de tal actividade em células guarda isoladas de Commelina communis, apesar de detectarem, no caso de Vicia faba, diferenças quanto às vias metabólicas através das quais as células guarda e as células do mesófilo eliminam o ABA exógeno. Os dois trabalhos acima mencionados demonstraram a ocorrência de actividade de catabolismo do ácido abscísico no tecido epidérmico e nas células guarda em particular, mas não quantificaram essa actividade em folhas previamente sujeitas a desidratação. Assim, com base naqueles trabalhos não é possível avaliar as reais potencialidades da epiderme eliminar o ácido abscísico endógeno durante o alívio de défices hídricos.

Harris & Outlaw (1991) determinaram a concentração de ABA nos diversos tecidos foliares de Vicia faba e verificaram que, após o alívio de défices hídricos, a taxa de decréscimo da concentração de ácido abscísico não diferia entre a epiderme e o mesófilo. Contudo, Harris & Outlaw (1991) não efectuaram qualquer determinação da condutância estomática, pelo que não é possível avaliar a ocorrência de efeitos a posteriori da secura sobre a abertura dos estomas. Estes dados não parecem assim suficientes para excluir a hipótese de Raschke (1987), nomeadamente no caso da imposição de défices hídricos severos, pelo que tal hipótese será testada no presente trabalho.

Contrariamente ao verificado no mesófilo e nas células epidérmicas, os resultados de Harris & Outlaw (1991) indicam que, durante o processo de re-hidratação foliar, poderão persistir níveis residuais de ácido abscísico ao nível das células guarda. Contudo, tal como foi referido anteriormente (cap. II.2.1.), é discutível a relevância da concentração de ácido abscísico nas células guarda, tendo sido mesmo sugerido que a acumulação de ABA naquelas células constituirá uma forma de sequestração da hormona, de modo a afastá-la dos seus locais de acção (Itai et al, 1978).

Tal como já foi referido anteriormente (cap. II.2), o conhecimento da concentração de ácido abscísico no apoplasto

foliar é particularmente importante do ponto de vista da fisiologia estomática. Cornish & Zeevaart (1985a) verificaram que, após o alívio de défices hídricos em folhas de Xanthium strumarium, o teor em ácido abcísico no apoplasto foliar se mantinha elevado, mesmo após a concentração daquele regulador de crescimento na globalidade dos tecidos foliares ter voltado aos valores registados antes da imposição do défice hídrico. O facto de a taxa de declínio da concentração de ácido abcísico ser mais lenta no apoplasto, do que nos restantes tecidos da folha, poderá contribuir para o atraso da reabertura dos estomas. Contudo, a taxa de transporte do ABA até às células guarda depende, não só da sua concentração xilémica, como da taxa de transpiração. Não tendo Cornish & Zeevaart (1985a) determinado taxas de transpiração, não é possível concluir se o atraso no declínio da concentração de ácido abcísico no fluxo transpiratório, durante o alívio de défices hídricos, se traduzirá, ou não, na ocorrência de elevadas taxas de transporte do ácido abcísico até às células guarda. Para além disso, aqueles autores só detectaram níveis residuais de ácido abcísico na fase inicial de recuperação do défice hídrico, ou seja em folhas cuja condutância era 3 ou mais vezes menor do que a condutância das folhas que não tinham sido sujeitas a défice hídrico.

A persistência de elevadas concentrações de ácido abcísico no apoplasto foliar, após a concentração na globalidade da folha ter voltado aos valores pré-stress, poderá resultar da não imediata reversibilidade das alterações que o défice hídrico desencadeia no processo de compartimentação intracelular do ABA ao nível das folhas (Loveys, 1977; Radin & Hendrix, 1988). Contudo, não pode ser excluída a hipótese de as raízes também contribuírem para a persistência de níveis residuais de ácido abcísico no apoplasto foliar. Num estudo levado a cabo em Xanthium strumarium, Cornish & Zeevaart (1985b) verificaram que, contrariamente ao que ocorre aquando da re-hidratação foliar, a re-hidratação de raízes destacadas não é acompanhada pela rápida diminuição do teor em ácido abcísico. Aquelles autores concluíram que a capacidade de metabolizar o ácido abcísico é menor nas raízes do que nas folhas. Contudo, não foi avaliada a eventual contribuição das raízes para o atraso no decréscimo da concentração de ABA no fluxo transpiratório após o alívio de défices hídricos.

Se a persistência de níveis residuais de ácido abcísico no fluxo transpiratório fosse a única causa do atraso da reabertura dos estomas, seria de esperar a total recuperação de ampla

abertura estomática quando as folhas são destacadas e o seu pecíolo imerso em água. Henson & Turner (1991) verificaram, no primeiro dia de recuperação de déficit hídrico em plantas de Lupinus luteus, que as diferenças de condutância estomática, entre plantas regadas diariamente e aquelas que tinham sido previamente sujeitas a déficit hídrico, anulavam-se quando o pecíolo de folhas destacadas era imerso em água. Os resultados de Henson & Turner (1991) sugerem que o atraso na reabertura estomática não estará associado a limitações ao nível da abertura potencial dos estomas, mas sim à presença de um agente inibidor no fluxo transpiratório de plantas intactas. Por outro lado, no segundo dia de alívio do déficit hídrico em Eucalyptus pauciflora, Kirschbaum (1988) verificou que a diminuição da concentração intercelular de CO₂ era capaz de reverter os efeitos a posteriori do déficit hídrico sobre a abertura dos estomas. Dado que a sensibilização estomática para o CO₂ é geralmente atribuída ao ácido abscísico (Raschke, 1975; Dubbe et al., 1978), estes dados sugerem o envolvimento deste regulador de crescimento na limitação da condutância estomática aquando do alívio de défices hídricos.

Contudo, alguns dados experimentais não parecem ser compatíveis com a hipótese de os efeitos a posteriori dos défices hídricos sobre a condutância estomática resultarem da presença, no fluxo transpiratório, de concentrações relativamente elevadas de ácido abscísico, ou de qualquer outro inibidor da abertura dos estomas. Concretamente, verificou-se que a inibição da abertura dos estomas pode subsistir após a incubação em água de fragmentos foliares (Fischer et al., 1970), ou epidermes (Fischer, 1970) destacadas de folhas previamente sujeitas a déficit hídrico. Estes resultados parecem indicar que os efeitos a posteriori dos défices hídricos sobre a abertura dos estomas estarão associados a limitações ao nível da abertura potencial dos estomas.

Trabalhos realizados na última década revelaram que a expressão de alguns genes é alterada em resposta à desidratação foliar e à aplicação exógena de ácido abscísico (Skriver & Mundy, 1990; Bray, 1991; Grossi et al., 1992), encontrando-se a síntese de algumas proteínas correlacionada com a concentração endógena de ácido abscísico (Bray, 1990, 1991). Segundo Bray (1991), a síntese de algumas proteínas só é promovida pelos défices hídricos quando destes resulta um aumento substancial da concentração de ácido abscísico. Recorde-se que, a acumulação de ABA também parece ser um condição necessária para a manifestação dos efeitos a posteriori dos défices hídricos sobre a abertura

dos estomas (Beardsell & Cohen, 1975; Doerffling et al, 1977). Segundo Hughes et al (1992), uma das proteínas, cuja síntese é promovida pelo ácido abscísico e pelo défice hídrico, é uma enzima envolvida na biogénese membranar. Trabalhos anteriores já tinham revelado que tanto o défice hídrico (Hubac et al, 1989; Gantet et al, 1990), como a aplicação exógena de ácido abscísico (Stillwell & Hester, 1984; Gantet et al, 1990; Leshem et al, 1990) podem afectar a composição e estrutura das membranas, nomeadamente ao nível da epiderme (Gantet et al, 1990). Não é plausível que alterações da estrutura membranar sejam revertidas instantaneamente pela remoção do agente que as desencadeou, por hipótese o ácido abscísico. Para além disso, os resultados de Bray (1990) indicam que, tal como se verifica ao nível da condutância estomática (Fischer, 1970; Fischer et al, 1970; Doerffling et al, 1977), os efeitos dos défices hídricos ao nível da síntese proteica também se manifestam a posteriori: aquele autor verificou, em folhas re-hidratadas de tomateiro, que a taxa de síntese de algumas proteínas se mantinha acima do valor registado antes da imposição do défice hídrico, mesmo após a concentração de ABA ter retornado aos valores pré-stress. Estes resultados demonstram que as alterações da expressão genética induzidas pelo ácido abscísico e/ou défices hídricos poderão não ser imediatamente reversíveis. Contudo, a relevância deste facto para explicar o atraso na reabertura dos estomas só poderá ser avaliada após se identificar a função dessas proteínas.

O facto de os efeitos a posteriori dos défices hídricos sobre a abertura dos estomas serem detectáveis após a incubação em água de discos foliares (Fischer et al, 1970) ou de epidermes destacadas (Fischer, 1970), pode também indicar que a abertura estomática, no período de alívio de défices hídricos severos, se encontra limitada por sinais negativos, ou seja, que o atraso na reabertura estomática está associado à escassez de algum composto promotor da abertura dos estomas. Como já foi referido no capítulo II (ponto 3), a concentração de citocininas e auxinas pode decrescer em situações de défice hídrico. Caso as referidas alterações do teor em auxinas e citocininas não sejam imediatamente revertidas pelo alívio do défice hídrico, tal facto poderia contribuir para explicar o atraso na reabertura dos estomas, visto que aqueles compostos têm um efeito positivo sobre a abertura estomática, diminuindo, nomeadamente, a sua sensibilidade para o ácido abscísico. Contudo, Aharoni et al (1977) verificaram que, durante a re-hidratação de folhas destacadas de alface, a actividade do tipo citocinina recuperava

ao fim de 42 horas, podendo mesmo, nesse período de tempo, ultrapassar os valores registados em folhas que não tinham sofrido défices hídricos. Por outro lado, Fisher (1970) não detectou qualquer promoção da recuperação da abertura estomática durante o alívio de défices hídricos quando folhas destacadas de tabaco eram incubadas em soluções, quer de IAA, quer de uma citocinina sintética - a cinetina. Estes dados não parecem apoiar a hipótese das citocininas e/ou auxinas constituírem factores limitantes da reabertura estomática aquando do alívio de défices hídricos. Contudo, como já foi referido anteriormente (cap. II.3), a resposta dos estomas à aplicação destes reguladores de crescimento é particularmente susceptível às condições experimentais (Wardle & Short, 1981; Pemadasa, 1982a; Eamus & Wilson, 1984). No caso das citocininas, deverá ainda ser tido em conta o facto de as diferentes citocininas poderem diferir quanto à sua eficácia em promover a abertura estomática (Das et al, 1976; Bradford, 1983). Assim, parece prematuro regeitar desde já o envolvimento das citocininas e auxinas nos efeitos a posteriori dos défices hídricos sobre a abertura estomática.

Em várias espécies verificou-se que a condutância estomática se encontra positivamente correlacionada com a condutância hidráulica aparente (Aston & Lawlor, 1979; Saliendra & Meinzer, 1989; Meinzer & Grantz, 1990). Estes resultados levaram Meinzer & Grantz (1990) a sugerir que a condutância estomática será controlada por compostos promotores da abertura dos estomas, produzidos pelas raízes e transportados no fluxo transpiratório, eventualmente as citocininas e/ou iões potássio. Esta hipótese veio posteriormente a ser sustentada experimentalmente pelo trabalho de Meinzer et al (1991). Estes autores verificaram que as variações da condutância estomática, associadas à ontogenia de plantas de cana do açúcar, estavam relacionadas com a taxa de transporte xilémico de ribósidos de zeatina e iões potássio.

Gollan et al (1986) concluíram que a reabertura dos estomas de trigo após o alívio de défices hídricos terá duas componentes. Numa primeira fase, associada à recuperação da turgescência foliar, a condutância estomática aumentava rapidamente. Seguiu-se uma fase de recuperação mais lenta, a qual parecia estar dependente do sistema radicular: só esta última era detectável em plantas sujeitas a secagem do solo num vaso pressurizado, nas quais não ocorrem alterações na turgescência foliar. Por outro lado, Semaan et al (1982) detectaram um aumento da resistência hidráulica em plantas de girassol e mostarda que recuperavam de défices hídricos moderados. Este aumento da resistência

hidráulica era mais acentuado no caso do girassol, no qual também o atraso na reabertura dos estomas era mais marcado. O referido aumento da resistência hidráulica pode estar associado à ocorrência de embolias no xilema das plantas sujeitas a défices hídricos (Crombie et al, 1985), embolias estas que podem não ser imediatamente revertidas após a re-hidratação (Salleo & LoGullo, 1989). Contudo, alterações ao nível do sistema radicular poderão também contribuir para o referido aumento da resistência hidráulica. A imposição de défices hídricos severos pode resultar em alterações ao nível da estrutura da raiz e à conseqüente diminuição da sua condutância hidráulica (Cruz et al, 1992), bem como no desenvolvimento de lesões e mesmo na morte de parte do sistema radicular (Semaan et al, 1982; Robertson et al, 1990). Segundo Passioura (1988), é pouco provável que, após desidratação intensa, a actividade das raízes recupere imediatamente aquando da re-hidratação. Tal facto, a verificar-se, poderá contribuir para os efeitos a posteriori dos défices hídricos sobre a condutância estomática, caso esta seja controlada por compostos promotores da abertura dos estomas, produzidos nas raízes.

Como foi referido no capítulo II (ponto 2.3.), a sensibilidade das células guarda para o ácido abcísico também é afectada por factores não hormonais dependentes da actividade das raízes. É o caso de alguns nutrientes inorgânicos: fósforo (Radin, 1984), azoto (Radin et al, 1982; Schurr et al, 1992), cálcio (Schurr et al, 1992) e potássio (Wardle & Short, 1981; Snaith & Mansfield, 1982b). É difícil avaliar a relevância prática de eventuais alterações da concentração iónica no xilema para a explicação dos efeitos a posteriori dos défices hídricos sobre a abertura estomática, dada a escassez de dados experimentais quanto à concentração daqueles iões no apoplasto foliar após o alívio dos défices hídricos. Contudo, um trabalho recente indica que os efeitos negativos dos défices hídricos sobre a nutrição azotada poderão persistir após a re-hidratação do solo. Quatro dias após o alívio de défice hídrico severo em Artemisia tridentata, BassiriRad & Caldwell (1992) verificaram que a quantidade de nitratos, absorvidos pelas raízes e transportados para a parte aérea, era inferior à determinada em plantas que não tinham sido sujeitas a défice hídrico. Quanto ao pH no apoplasto, outro factor de que depende a sensibilidade estomática para o ácido abcísico (Paterson et al, 1988), apesar de Hartung & Slovik (1991) terem verificado que a alcalinização do apoplasto de feijoeiro é revertida na primeira meia hora após o restabelecimento de rega, não existem dados experimentais

quanto à evolução do pH apoplástico após o alívio de défices hídricos noutras espécies.

Os dados experimentais disponíveis, apesar de não sustentarem a hipótese de os efeitos a posteriori dos défices hídricos resultarem da manutenção de níveis residuais de ácido abscísico ao nível da globalidade dos tecidos foliares, não excluem o envolvimento hormonal no atraso da reabertura estomática então verificada. Este atraso poderá resultar, quer de desigual taxa de decréscimo da concentração de ácido abscísico nos diferentes tecidos foliares, quer de alterações na sua compartimentação intracelular, nomeadamente da manutenção de concentrações de ABA relativamente elevadas na epiderme e/ou apoplasto foliar. Finalmente, deverão ser consideradas eventuais alterações da sensibilidade estomática para o ácido abscísico, nomeadamente as que poderão resultar de modificações do pH apoplástico e/ou da actividade das raízes, via diminuição do teor em citocininas e iões inorgânicos.

No presente trabalho procurou-se avaliar o envolvimento do ácido abscísico na regulação da abertura estomática durante a imposição e alívio de défices hídricos severos. Para tanto, determinou-se a concentração daquele regulador de crescimento na epiderme abaxial de Commelina communis L. e no xilema de plantas de Lupinus albus L. e Helianthus annuus L., durante a imposição e o alívio de défices hídricos severos.

2. Efeitos da imposição e alívio de défices hídricos severos na condutância foliar e na concentração de ABA na epiderme abaxial de Commelina communis L.

2.1. Material vegetal e condições experimentais

Os ensaios com Commelina communis decorreram no Departamento de Ciências Biológicas da Universidade de Lancaster em Inglaterra, entre Abril e Junho de 1988. Após a germinação, que ocorreu em tabuleiros de vermiculite, as plântulas foram transplantadas para vasos com 85 mm de diâmetro (uma planta por vaso), contendo mistura "John Innes" nº2. Nas 3 primeiras semanas, as plantas cresceram numa estufa com luz natural, sendo depois transferidas para uma câmara de crescimento com um fotoperíodo de 16 horas. Durante o período de luz, a densidade de fluxo fotónico mínima, ao nível das plantas, era de 100 μmol quanta $\text{PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lâmpadas Thorn de halogéneo com vapor de mercúrio). A temperatura na câmara oscilou entre 20 °C e 25 °C.

Inicialmente todos os vasos foram regados diariamente, no princípio do período de escuro. A imposição do déficit hídrico, por supressão da rega em metade dos vasos, teve início uma semana após as plantas terem sido transferidas para a câmara de crescimento. Ao fim de 6 dias de tratamento todos os vasos voltaram a ser regados diariamente.

Foram efectuadas determinações diárias da condutância e das relações hídricas de folhas recém-expandidas (geralmente a 4ª folha, a contar do ápice, com mais de 3 cm de comprimento).

A condutância foliar foi medida, na página abaxial, por porometria de difusão (porómetro MK3 - Delta T Devices), 4 horas após o início do fotoperíodo. Para evitar grandes desequilíbrios de temperatura, o porómetro era colocado na câmara de crescimento pelo menos 15 minutos antes do início das medições.

As relações hídricas foliares foram estudadas por higrometria de ponto de orvalho, tendo sido utilizados higrómetros foliares, construídos nas oficinas da Universidade de Lancaster (cap. III.7). O potencial hídrico foi determinado em discos foliares com 0,6 cm de diâmetro, destacados de zonas de lâmina foliar desprovidas de nervuras principais. Os discos foliares foram destacados cerca de 4 horas após o início do fotoperíodo, ou seja, imediatamente antes de se proceder às determinações da condutância foliar. O potencial de pressão foi calculado como a diferença entre o potencial hídrico e o potencial osmótico determinado nos mesmos discos (cap. III.7.2.)

No segundo ensaio foi determinada a concentração de ácido abscísico, na epiderme abaxial e no resto da folha, no último dia de imposição do déficit hídrico e nos dois primeiros dias de alívio do mesmo. Para quantificar o ácido abscísico utilizou-se a técnica de cromatografia gasosa proposta por Quarrie (1978) e descrita no capítulo III (9.1.). Para obter uma amostra de epiderme abaxial suficientemente grande para possibilitar a quantificação do ácido abscísico, foi necessário destacar a epiderme da totalidade das folhas de uma planta (cap. III.8.1.). O destacamento de epidermes suficientes para perfazer uma amostra demorou entre 40 e 45 minutos, começando a recolha das amostras 8 horas após o início do fotoperíodo e prolongando-se por cerca de 5 horas.

2.2. Resultados

Nas figuras 11 e 12 são apresentados, respectivamente, os valores da condutância da página abaxial e das relações hídricas

de folhas de Commelina communis, determinados em dois ensaios independentes em que metade das plantas foram sujeitas a um ciclo de imposição e alívio de déficit hídrico. Em ambos os ensaios, apesar de nos dois dias imediatamente após a suspensão da rega não ter sido detectado qualquer decréscimo nem no potencial hídrico nem no potencial de pressão (fig. 12), a condutância foliar das plantas não regadas decresceu significativamente logo no primeiro dia de imposição do déficit hídrico no solo (fig. 11).

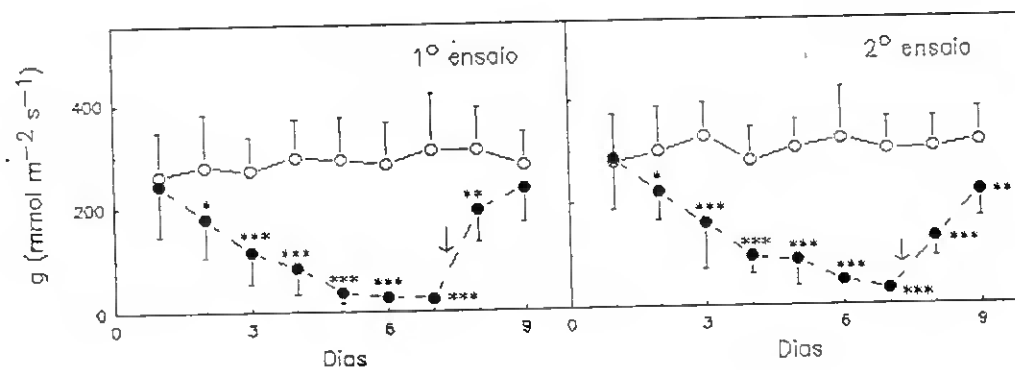


Fig. 11
Condutância para a difusão do vapor de água da página abaxial (g) determinada, 4 horas após o início do fotoperíodo, em folhas recém-expandidas de plantas de Commelina communis L. regadas diariamente (símbolos abertos) ou sujeitas a um período de déficit hídrico no solo (símbolos fechados). A rega destas últimas foi suspensa no dia 1, sendo restabelecida ao fim da tarde do dia 7 (seta). Cada ponto representa a média de 12 (1º ensaio) ou 10 determinações (2º ensaio) e as barras verticais indicam o desvio padrão. As médias das plantas sujeitas a déficit hídrico significativamente diferentes (teste de Student) da média da testemunha para o mesmo período são assinaladas com * [P<0,05], ** [P<0,01] ou *** [P<0,001].

Quadro IV

Concentração de ácido abscísico (ABA), na epiderme abaxial e no resto da folha, determinada em plantas de Commelina communis L. regadas diariamente (testemunha) ou sujeitas a imposição e alívio de déficit hídrico (tratamento). Os valores indicados são médias \pm desvio padrão de 3-4 réplicas. As médias do tratamento significativamente diferentes (teste de Student) da média da testemunha, determinada no mesmo dia, são assinaladas com * [P<0,05] ou ** [P<0,01].

Dia	ABA (ng g ⁻¹ massa foliar)			
	Epiderme abaxial		Resto da folha	
	Testemunha	Tratamento	Testemunha	Tratamento
6º sem rega	11,0 \pm 2,0	80,0 \pm 24,3**	25,0 \pm 8,7	212,5 \pm 25,0**
1º recuperação	15,1 \pm 3,6	18,8 \pm 5,9	18,7 \pm 11,8	18,4 \pm 4,0
2º recuperação	12,3 \pm 0,7	11,8 \pm 5,4	n.d.	n.d.

[n.d. - não determinado]

No fim do período de imposição de déficit hídrico, os estomas abaxiais estavam praticamente fechados. Em virtude do decréscimo da condutância estomática as diferenças de Ψ , entre as plantas regadas e as plantas não regadas, não ultrapassaram 0,2 MPa mesmo no fim do ciclo de secagem do solo (fig. 12). A diminuição do potencial hídrico nas plantas não regadas não foi compensada pela redução do potencial osmótico, pelo que se verificou um decréscimo proporcional do potencial de pressão (fig. 12).

No quadro IV são apresentados os resultados da quantificação do ácido abscísico efectuada no segundo ensaio. Apesar de, naquele ensaio, o decréscimo na turgescência foliar ter sido só de cerca de 0,1 MPa (fig. 12), a imposição de déficit hídrico no solo resultou na acumulação de ABA nas plantas não regadas, tanto na epiderme abaxial como no resto da folha.

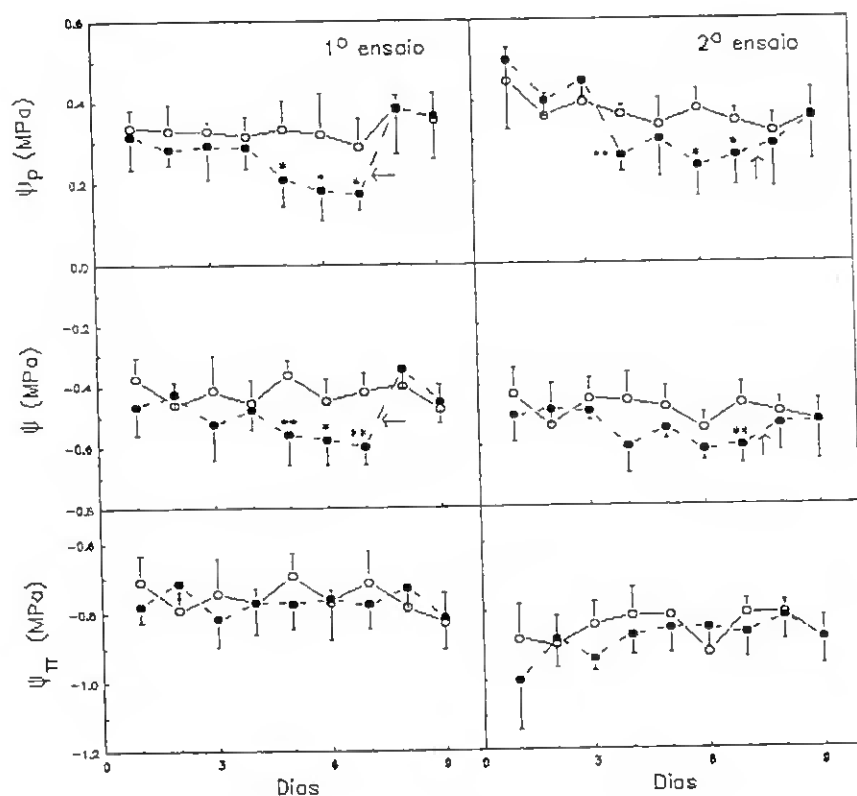


Fig. 12

Potencial hídrico (Ψ), potencial osmótico (Ψ_{π}) e potencial de pressão (Ψ_p) determinados em folhas recém-expandidas de plantas de *Commelina communis* L. regadas diariamente (testemunha - símbolos abertos), ou sujeitas a um período de déficit hídrico no solo (tratamento - símbolos fechados). A rega destas últimas foi suspensa no dia 1, sendo restabelecida ao fim da tarde do dia 7 (seta). Cada ponto representa a média de 6 (1º ensaio) ou 4 determinações (2º ensaio) e as barras verticais indicam o desvio padrão. As médias do tratamento significativamente diferentes (teste de Student) das médias determinadas, no mesmo dia, nas plantas testemunha são assinaladas com * ($P < 0,05$) ou ** ($P < 0,01$).

No primeiro dia após o alívio do déficit hídrico no solo não foram detectadas quaisquer diferenças entre o tratamento e as plantas testemunha, tanto no que diz respeito às relações hídricas foliares (fig. 12) como à concentração de ácido abscísico na epiderme abaxial e no resto da folha (quadro IV). Contudo, persistiam as diferenças de condutância foliar, sendo esta significativamente menor nas plantas previamente sujeitas a déficit hídrico do que nas plantas testemunha (fig. 11). No segundo ensaio, a condutância foliar das plantas previamente sujeitas a déficit hídrico era inferior à das plantas testemunha mesmo no segundo dia após reposição da rega.

2.3. Discussão

Em ambos os ensaios realizados o encerramento dos estomas de Commelina communis precedeu o desenvolvimento de déficit hídrico foliar (fig. 11 e 12). O encerramento estomático ocorreu assim, aparentemente, em resposta directa à alteração do estado hídrico do solo, tal como já se tinha verificado noutros trabalhos realizados em Commelina communis (Zhang *et al*, 1987), assim como noutras espécies (Bates & Hall, 1981; Blackman & Davies, 1985; Gollan *et al*, 1986; Saliendra & Meinzer, 1989).

Comparativamente a resultados publicados quanto ao teor em ácido abscísico na epiderme abaxial de Commelina communis, na ausência de déficit hídrico foliar, os valores determinados no presente trabalho são semelhantes aos obtidos por Singh *et al* (1979): 8 ng g⁻¹ massa foliar. Também Zhang *et al* (1987) determinaram anteriormente o teor em ácido abscísico na epiderme de Commelina communis. Contudo, neste último trabalho o teor epidérmico em ácido abscísico é expresso por unidade de massa foliar seca, pelo que não é possível comparar com os presentes resultados, dado que a proporção de massa seca do tecido epidérmico não foi determinada em nenhum dos dois trabalhos.

No que diz respeito aos efeitos do déficit hídrico, Singh *et al* (1979) detectaram a duplicação dos níveis de ácido abscísico na epiderme abaxial de Commelina communis, 90 minutos após a massa foliar de folhas destacadas ter sofrido uma redução de 10 % em consequência das perdas de água por transpiração. Da mesma ordem de grandeza foi o aumento na concentração epidérmica de ácido abscísico registado por Zhang *et al* (1987). No trabalho anteriormente referido, as plantas foram sujeitas, durante 8 dias, a secagem parcial do solo daí tendo resultado um decréscimo da condutância foliar da ordem dos 50%, sem que tivesse ocorrido

défice hídrico foliar. No presente ensaio, as plantas foram sujeitas a um stress mais severo, donde resultou o completo encerramento dos estomas (fig. 11) e o desenvolvimento de défice hídrico foliar moderado (fig. 12). Assim, não é de estranhar que o aumento da concentração epidérmica de ABA tenha sido superior: cerca de 8 vezes o valor registado nas plantas testemunha (quadro IV).

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que os efeitos a posteriori do défice hídrico sobre a condutância estomática de Commelina communis não resultaram da persistência de níveis relativamente elevados de ácido abscísico, quer no mesófilo, quer na epiderme abaxial (quadro IV). Estes resultados vão de encontro aos obtidos em Vicia faba (Harris & Outlaw, 1991) e indicam que, contrariamente ao que tinha sido sugerido por Raschke (1987), os efeitos a posteriori dos défices hídricos sobre a abertura dos estomas não resultam de o decréscimo da concentração de ácido abscísico ser mais lento na epiderme do que no resto da folha.

A quantificação do ácido abscísico na globalidade do tecido epidérmico não permite detectar variações da concentração daquele regulador de crescimento, caso estas ocorram somente ao nível das células guarda, visto que estas células representam uma pequena fracção da epiderme. Brinckmann et al (1990) constataram que o ABA não se encontra distribuído homogeneamente na epiderme de plantas regadas de Commelina communis: a concentração daquele regulador de crescimento diminui das células guarda para as células epidérmicas, sendo intermédia nas células subsidiárias. Por outro lado, quando folhas de Vicia faba são re-hidratadas, o decréscimo da concentração de ácido abscísico é mais lento nas células guarda do que no resto do tecido epidérmico (Harris & Outlaw, 1991). Mesmo que tal também se verifique em Commelina communis, não poderia ter sido detectado no presente trabalho, visto que o ácido abscísico foi quantificado na globalidade do tecido epidérmico. Contudo, segundo Hartung & Slovik (1991), a limitação da abertura estomática não pode ser explicada se a acumulação de ABA na epiderme se restringir às células guarda. Segundo aqueles autores, mesmo que as células guarda libertem o ácido abscísico no apoplasto, a hormona não se acumulará aí, em virtude de existir uma continuidade entre o apoplasto das células guarda e das células epidérmicas e o plasmalema destas últimas ter uma elevada condutância para o ácido abscísico.

O observado atraso na reabertura dos estomas de Commelina communis também não resultou da persistência de défice hídrico

foliar após o restabelecimento da rega, visto que tanto o potencial hídrico como o potencial de pressão não diferiam entre as plantas testemunha e aquelas que tinham sido previamente sujeitas a déficit hídrico (fig. 12).

O potencial hídrico foliar depende do potencial da água no solo, da condutância hidráulica do continuum solo-planta e da taxa de transpiração. Esta última é determinada, por um lado, pela condutância foliar para a difusão do vapor de água e, por outro lado, pelo déficit de pressão de vapor do ar e pela temperatura foliar. Como se pode verificar na figura 11, a condutância foliar determinada nos 2 primeiros dias de alívio dos défices hídricos era significativamente inferior à registada nas plantas testemunha. Assim, estas últimas deveriam apresentar maiores taxas de transpiração, visto que o déficit de pressão de vapor na câmara de crescimento era relativamente uniforme e as determinações feitas com o porómetro de difusão não indicaram a ocorrência de diferenças de temperatura foliar entre os dois grupos de plantas. Por outro lado, durante o alívio de défices hídricos, não são de prever diferenças significativas quanto ao potencial hídrico do solo, visto que todos os vasos foram regados diariamente até à capacidade de campo. Contudo, as referidas diferenças nas taxas de transpiração não se reflectiram na ocorrência de potenciais hídricos mais elevados nas plantas com reduzida condutância foliar (fig. 12). Tal facto sugere a existência de uma depressão da condutância para o movimento da água entre o solo e a folha, durante o alívio dos défices hídricos.

O decréscimo da condutância hidráulica poderá, por hipótese, ocorrer tanto ao nível do solo como da planta. Como já foi referido na parte introdutória deste capítulo, a limitação da condutância hidráulica, em plantas que recuperam dos efeitos de défices hídricos, poderá estar associada à ocorrência de cavitações no xilema, caso estas não sejam revertidas após o restabelecimento da rega. Apesar de Crombie et al (1985) terem detectado a ocorrência de cavitação no xilema em plantas de Ricinus communis e Lycopersicon esculentum com $\Psi = -0,5$ MPa, na maior parte das plantas a cavitação do xilema só parece ocorrer quando se atingem potenciais hídricos iguais ou inferiores a $-1,0$ MPa (West & Gaff, 1976; Crombie et al, 1985; Tyree et al, 1986; Salleo & Lo Gullo, 1989). No presente trabalho, o potencial hídrico foliar das plantas não regadas era igual ou superior a $-0,7$ MPa (fig. 12), pelo que é pouco provável que tenha ocorrido cavitação extensiva do xilema. Para além disso, Salleo & Lo Gullo

(1989) verificaram, em videiras sujeitas a déficit hídrico moderado (a meio do dia: $\Psi = -1,5$ MPa), que as cavitações que ocorrem durante o dia podem ser revertidas durante a noite. O mesmo se verifica em plantas de milho, mesmo quando o seu potencial hídrico foliar decresce durante o dia para $-1,5$ MPa (Tyree et al., 1986). Assim, no presente ensaio, caso tenha ocorrido cavitação em alguns vasos do xilema durante o período de suspensão da rega, é provável que, na noite após o restabelecimento da rega, a coluna de água nesses vasos tenha sido reconstituída.

No presente trabalho não foram efectuadas quaisquer determinações do estado hídrico do solo, bem como ao nível do sistema radicular. Contudo, quando se suprime a rega em substratos ricos em turfa, como o utilizado para o crescimento de Commelina communis, é visível a sua contracção. Caso a redução do volume do substrato não seja totalmente revertida pela reposição da rega, daí poderá resultar uma redução da condutância hidráulica e do teor em água do solo. Por outro lado, não pode ser excluída a hipótese do déficit hídrico no solo ter provocado danos irreversíveis ao nível da actividade das raízes, nomeadamente a redução da sua permeabilidade para a água e/ou diminuição do tamanho do sistema radicular por morte de raízes finas. Caso isso tenha ocorrido, é admissível que a condutância hidráulica do sistema radicular não recupere imediatamente após o restabelecimento da rega, pois tal recuperação dependerá da substituição das raízes danificadas ou mortas (Passioura, 1988).

Os resultados obtidos nos ensaios realizados com Commelina communis indicam que, apesar de limitações ao nível da condutância hidráulica persistirem, aparentemente, após o restabelecimento da rega, os efeitos a posteriori da secura do solo não resultaram da persistência de déficit hídrico foliar, nem da manutenção de concentrações elevadas de ABA ao nível da epiderme após o alívio dos défices hídricos.

3. Efeitos da imposição e alívio de défices hídricos severos na condutância foliar e na concentração de ABA no xilema de Helianthus annuus L.

3.1. Material vegetal e condições experimentais

Foram realizados dois ensaios de imposição de déficit hídrico severo a plantas envasadas de Helianthus annuus. Estes ensaios

tiveram lugar em Gambelas, tendo as plantas crescido ao ar livre. A sementeira foi feita, em Junho (ensaio de 1991) ou Abril (ensaio de 1992), numa mistura de turfa, calcário e areia, contendo 60% de substância orgânica e pH corrigido a 6,0 (Triohum - Potground "H"). As plântulas foram transplantadas para vasos quando se começaram a observar as primeiras folhas não-cotiledonares. No ensaio de 1991 utilizaram-se vasos de 5 litros (3 plantas por vaso), contendo a mesma mistura em que foi feita a sementeira. No ensaio de 1992 as plântulas foram transferidas para vasos de 3 litros (uma planta por vaso) contendo uma mistura comercial para vasos composta por turfa adubada e solo de Monchique.

O ensaio de imposição de défice hídrico, por suspensão da rega em metade dos vasos, teve início quando as plantas apresentavam 8 a 9 folhas com mais de 5 cm de comprimento, o que se verificou 2 semanas (ensaio de 1991) ou um mês (ensaio de 1992) após o transplante das plântulas.

Todas as determinações foram feitas em folhas recém-expandidas (6ª a 7ª folha a contar da base). Efectuaram-se determinações da condutância foliar e das relações hídricas em dois dias com deficiência hídrica e nos dois dias imediatamente após o alívio da mesma.

Em ambos os ensaios, o potencial hídrico foliar foi determinado, pela técnica da câmara de pressão, antes do nascer do Sol. No dia imediatamente a seguir ao restabelecimento da rega, após a medição do potencial hídrico, parte da lâmina foliar (sem nervura central) foi congelada em azoto líquido, para posterior determinação do potencial osmótico da solução celular (cap. III.7.2.), utilizando câmaras C-52 (Wescor, E.U.A.). No resto da folha determinou-se o teor relativo em água (cap. III.7.3.).

Após finalizar as determinações das relações hídricas foliares, os vasos eram pesados para posterior cálculo do teor relativo em água no solo (cap. III.6).

As determinações da condutância foliar para a difusão do vapor de água iniciaram-se 3 horas após o nascer do Sol.

No ensaio de 1991 a condutância foliar foi determinada a partir da medição da taxa de trocas gasosas utilizando a minicuvete de ambiente controlado (H. Walz). Esta estava localizada no interior do laboratório, pelo que era fraca a radiação incidente nas folhas que não se encontravam no interior da cuvete. As medições foram efectuadas em condições quasi-constantas de temperatura foliar ($25,5 \pm 0,9$ °C), défice de

pressão de vapor entre a folha e o ar ($18,4 \pm 2,3$ mbar) e densidade de fluxo fotónico incidente ($1550 \mu\text{mol}$ quanta PAR $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Como estas eram diferentes das condições naturais a que as folhas estavam anteriormente sujeitas, cada folha tinha de permanecer cerca de 30 minutos na cuvete para que se atingissem taxas de transpiração e fotossíntese estabilizadas. Assim, no ensaio de 1991 as medições das trocas gasosas foliares prolongaram-se por toda a manhã (cerca de 4 horas). Após cada determinação de trocas gasosas mediu-se o potencial hídrico na mesma folha. Contudo, no último dia de imposição do défice hídrico não foram efectuadas determinações de potencial hídrico, pois não foi possível manter a estanquicidade da câmara para pressões superiores a 1,9 MPa (inferior à pressão de equilíbrio daquelas folhas). No 1º e no 2º dia de recuperação do défice hídrico, após a determinação do potencial hídrico foram recolhidas duas amostras da solução apoplástica foliar, aumentando por duas vezes a pressão na câmara, em intervalos de 0,20 a 0,25 MPa.

No ensaio de 1992 a condutância foliar foi determinada em condições naturais, nas duas superfícies foliares, por porometria de difusão (porómetro MK3 - Delta T Devices). Neste caso, o conjunto das medições, em plantas regadas e sujeitas a défice hídrico, concluía-se em menos de meia hora. Após finalizar as determinações da condutância, o potencial hídrico foliar foi medido com a câmara de pressão. No 3º e no 6º dia de imposição do défice hídrico recolheram-se exsudados xilémicos das mesmas folhas em que se mediu o potencial hídrico: após determinar a pressão de equilíbrio, a pressão na câmara era aumentada 0,1 MPa, a superfície de corte do pecíolo era lavada com um esguicho de água destilada e o exsudado então produzido era desprezado; seguidamente, procedia-se a um aumento da pressão de cerca de 0,2 MPa sendo então recolhido o exsudado, procedimento este que se repetia uma outra vez. No dia a seguir ao restabelecimento da rega, das folhas em que se determinou o potencial hídrico, colheram-se amostras da lâmina foliar, para posterior determinação do potencial osmótico no suco celular; o teor relativo em água foi determinado no resto da folha.

A quantificação do ácido abscísico nos exsudados xilémicos foi feita por técnica imunoenzimática - ELISA. Nos exsudados colhidos no último ensaio determinou-se também a concentração de açúcares.

No ensaio realizado em 1992, no dia imediatamente a seguir ao restabelecimento da rega, foram analisados os efeitos da

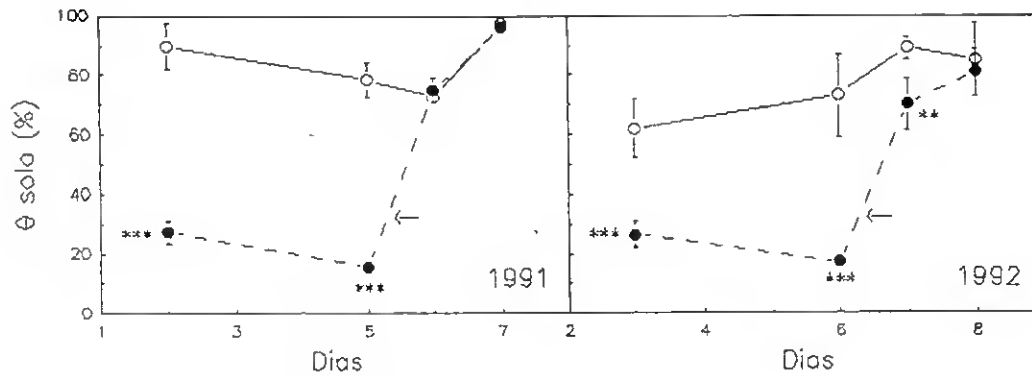


Fig. 13

Variacão do teor relativo em água (θ solo) determinado, nos ensaios com *Helianthus annuus* L., em vasos regados diariamente (símbolos abertos) e em vasos cuja rega foi suspensa na véspera do dia 1 (símbolos a cheio) sendo retomada na tarde do dia 5 ou 6 (seta). São apresentados os valores médios \pm desvio padrão de 4 determinaoes, excepto no caso dos vasos regados em 1991 (n=3) e dos vasos sujeitos a secura em 1992 (n=5). A comparao das médias de cada dia foi feita pelo teste de Student. São assinaladas as médias do tratamento significativamente diferentes da média dos vasos regados diariamente: ** (P<0,01), *** (P<0,001).

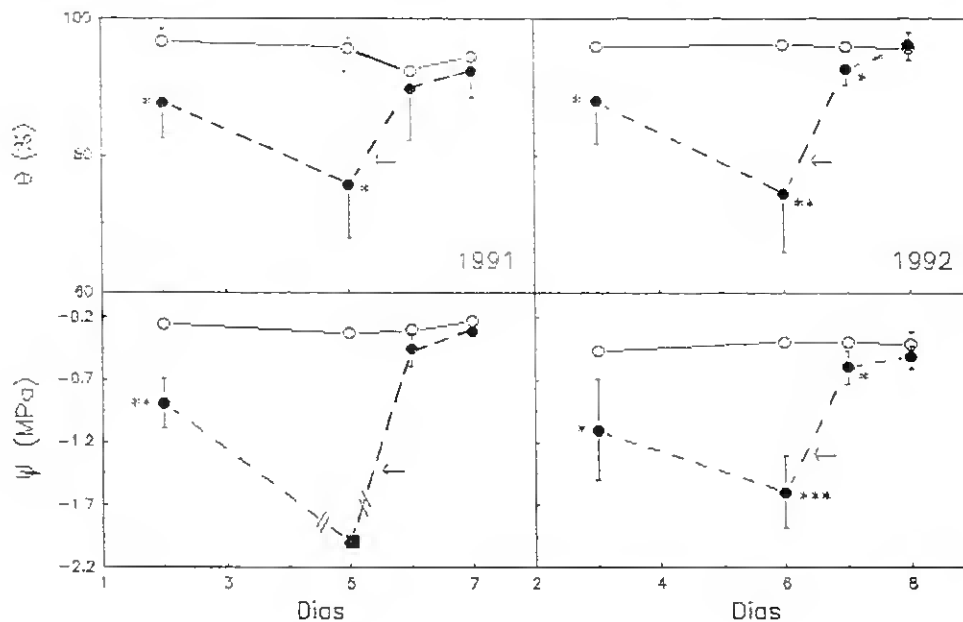


Fig. 14

Variacão do teor relativo em água (θ) e potencial hídrico (ψ) determinados, antes do nascer do Sol, em folhas recém-expandidas de plantas de *Helianthus annuus* L. regadas diariamente (símbolos abertos), ou cuja rega foi suspensa na véspera do dia 1 (círculos a cheio) sendo retomada na tarde do dia 5 ou 6 (seta). No dia 5 do ensaio de 1991, o valor de ψ das plantas não regadas (quadrado a cheio) não representa um valor exacto: nesse dia ψ era inferior a -1,9 MPa (ver 3.1.). São apresentados os valores médios \pm desvio padrão de 4 determinaoes, excepto no caso das plantas regadas em 1991 (n=3) e das plantas sujeitas a secura em 1992 (n=5). As médias do tratamento significativamente diferentes (teste de Student) da média determinada, no mesmo dia, nas plantas regadas diariamente são assinaladas com * (P<0,05), ** (P<0,01) ou *** (P<0,001).

aplicação exógena de ácido abscísico e cinetina a folhas recém-expandidas destacadas de plantas regadas diariamente e de plantas previamente sujeitas a déficit hídrico. As folhas foram destacadas 1 hora após o nascer do Sol e, seguidamente, permaneceram 3 horas no escuro. 2 horas após a transferência das folhas para um local iluminado, a condutância foliar foi determinada por porometria de difusão.

3.2. Resultados

A secagem do solo foi rápida em ambos os ensaios: 2 a 3 dias após a suspensão da rega o teor relativo em água no solo decresceu para cerca de 25%, sendo inferior a 20% no fim do período de secagem do solo (fig. 13). A severidade da secura no solo resultou no desenvolvimento de déficit hídrico foliar: após 2-3 dias sem rega a diferença de potencial hídrico foliar entre plantas regadas e plantas não regadas era superior a 0,5 MPa, tanto antes do nascer do Sol (fig. 14) como durante a manhã (fig. 15). No fim do período de secagem do solo essa diferença aumentou para 1,2 MPa no ensaio de 1992, ultrapassando 1,5 MPa no ensaio realizado no ano anterior. Apesar do potencial hídrico foliar no fim do período de secagem do solo ter sido inferior no ensaio de 1991 (fig. 14 e 15), o valor mínimo de teor relativo em água foliar, determinado antes do nascer do Sol, foi semelhante nos dois ensaios (fig. 14).

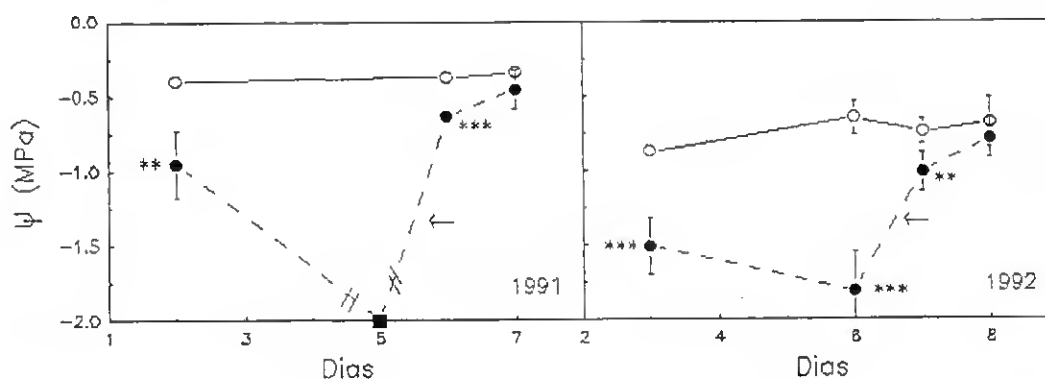


Fig. 15

Varição do potencial hídrico (Ψ) determinado, de manhã, em folhas recém-expandidas de plantas de *Helianthus annuus* L. regadas diariamente (símbolos abertos), ou cuja rega foi suspensa na véspera do dia 1 (círculos a cheio) sendo retomada na tarde do dia 5 ou 6 (seta). No dia 5 do ensaio de 1991, o valor de Ψ das plantas não regadas (quadrado a cheio) não representa um valor exacto: nesse dia Ψ era inferior a -1,9 MPa (ver 3.1.). São apresentados os valores médios \pm desvio padrão de 4 determinações, excepto no caso das plantas regadas em 1991 (n=3) e das plantas sujeitas a secura em 1992 (n=5). A comparação das médias de cada dia foi feita pelo teste de Student. São assinaladas as médias do tratamento significativamente diferentes ($P < 0,05$) da média determinada, no mesmo dia, nas plantas regadas diariamente: ** ($P < 0,01$) e *** ($P < 0,001$).

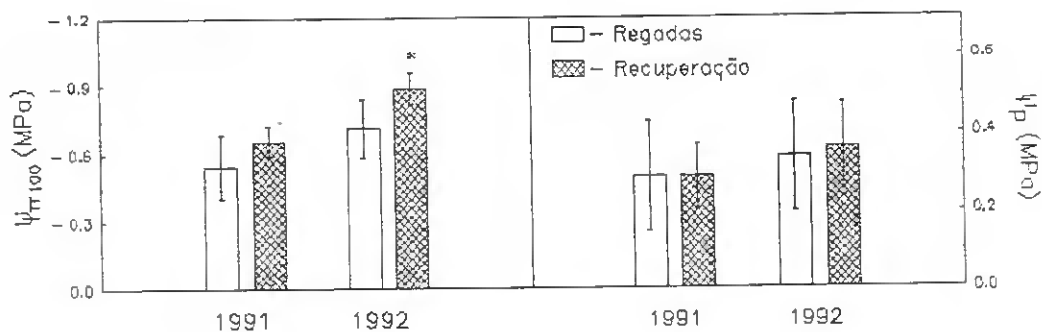


Fig. 16

Potencial osmótico no estado de máxima hidratação ($\Psi_{\pi 100}$) e potencial de pressão (Ψ_p), determinados, antes do nascer do Sol, em folhas recém-expandidas de plantas de *Helianthus annuus* L. regadas diariamente ou no 1º dia de recuperação dos efeitos da secura do solo. São apresentados valores médios \pm desvio padrão de 4 determinações, excepto no caso das plantas regadas em 1991 (n=3) e das plantas previamente sujeitas a déficit hídrico em 1992 (n=5). São assinaladas com um asterisco as médias do tratamento significativamente diferentes ($P < 0,05$ - teste de Student) da média determinada, no mesmo ano, em folhas de plantas regadas diariamente.

No ensaio de 1991, no dia imediatamente a seguir ao restabelecimento da rega já não se registaram diferenças estatisticamente significativas, entre plantas previamente sujeitas a déficit hídrico e plantas regadas diariamente, tanto no que diz respeito ao potencial hídrico como ao teor relativo em água foliar determinados antes do nascer do Sol (fig. 14). Contudo, no 1º dia de alívio do déficit hídrico do 2º ensaio aqueles parâmetros de relações hídricas eram significativamente inferiores nas plantas re-hidratadas do que nas plantas testemunha (fig. 14). No entanto, o referido decréscimo do potencial hídrico não se reflectiu na diminuição do potencial de pressão, em virtude de as plantas que recuperavam dos efeitos do déficit hídrico apresentarem, em 1992, um potencial osmótico no estado de máxima hidratação significativamente menor que o das plantas regadas diariamente (fig. 16).

Quando se consideram os valores de potencial hídrico foliar determinados de manhã (fig. 15), verificou-se que a completa re-hidratação das plantas só foi atingida 2 dias após o restabelecimento da rega. Em ambos os ensaios, no 1º dia de alívio do déficit hídrico o potencial hídrico das plantas testemunha era superior ao das plantas que tinham sido sujeitas a um período de secagem do solo. A redução do potencial hídrico nestas últimas foi de cerca de 0,3 MPa (fig. 15), sendo inferior ao decréscimo no potencial osmótico no estado de máxima hidratação detectado no ensaio de 1992: $-0,65 \pm 0,12$ MPa nas plantas regadas diariamente e $-1,02 \pm 0,19$ MPa naquelas que

tinham sido previamente sujeitas a déficit hídrico. Assim, pelo menos no caso do ensaio realizado em 1992, o referido atraso na recuperação do potencial hídrico não se deve ter reflectido numa diminuição do potencial de pressão.

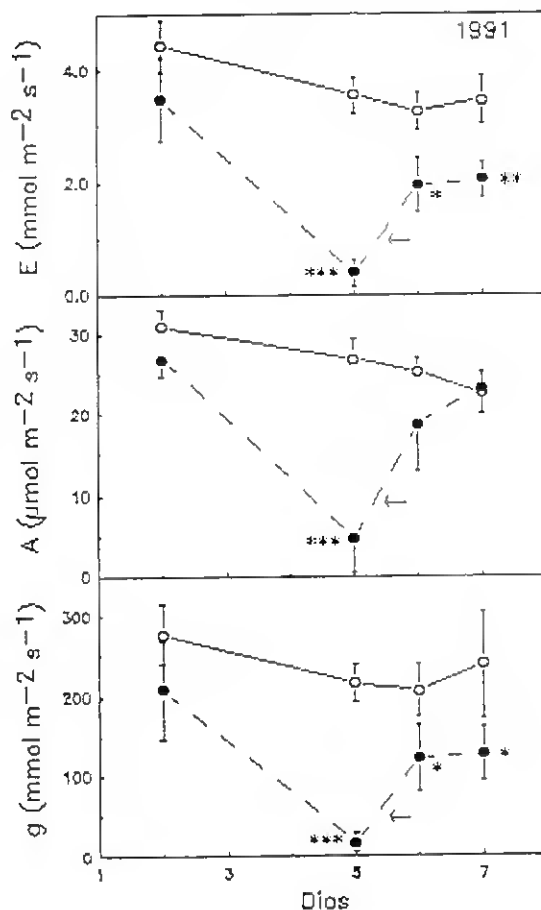


Fig. 17

Varição da taxa de transpiração (E), taxa de fotossíntese (A) e condutância foliar para a difusão do vapor de água (g) determinadas em 1991, em folhas recém-expandidas de plantas de *Helianthus annuus* L. regadas diariamente (símbolos abertos), ou cuja rega foi suspensa na véspera do dia 1 (símbolos a cheio) sendo retomada na tarde do dia 5 (seta). São apresentados os valores médios \pm desvio padrão de 3 (plantas regadas diariamente) ou 4 determinações (plantas sujeitas a déficit hídrico). A comparação das médias de cada dia foi feita pelo teste de Student. São assinaladas as médias do tratamento significativamente diferentes da média determinada, no mesmo dia, nas plantas regadas diariamente: * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) e *** ($P < 0,001$).

No 2º dia de imposição do déficit hídrico durante o ensaio realizado em 1991, apesar de ser já acentuado o decréscimo registado tanto no potencial hídrico (fig. 14 e 15) como no teor relativo em água do solo (fig. 13) e das folhas (fig. 14), não se observavam ainda diferenças estatisticamente significativas ao nível das trocas gasosas foliares, tanto no que diz respeito às taxas de fotossíntese e transpiração, como à condutância foliar (fig. 17). Contudo, 3 dias depois os estomas das plantas não

regadas encontravam-se praticamente fechados e a taxa fotossintética decresceu para cerca de 1/5 do valor registado nas plantas regadas (fig. 17). No 2º ensaio realizado, a depressão da condutância foliar foi também muito acentuada, sendo neste caso o encerramento estomático detectado logo no 3º dia de imposição do défice hídrico, tanto na página abaxial como na adaxial (fig. 18).

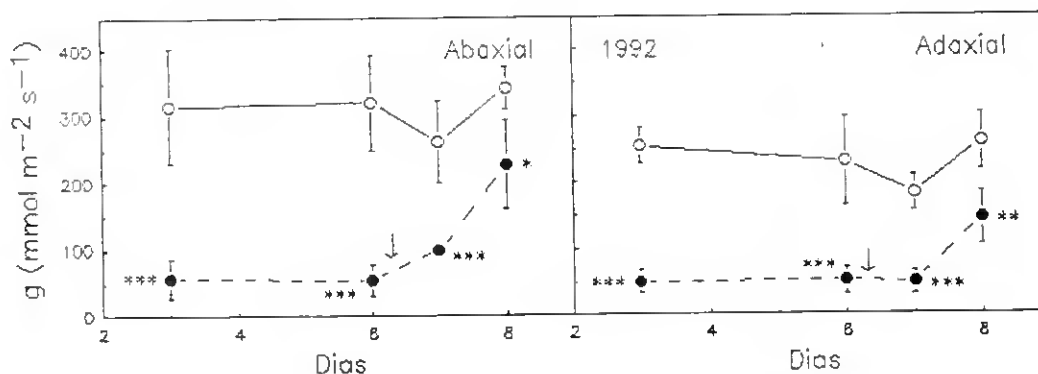


Fig. 18

Varição da condutância para a difusão do vapor de água [g] das duas superfícies de folhas recém-expandidas de plantas de *Helianthus annuus* L. regadas diariamente (símbolos abertos), ou cuja rega foi suspensa na véspera do dia 1 (símbolos a cheio) sendo retomada na tarde do dia 6 [seta]. São apresentados os valores médios \pm desvio padrão de 4 (plantas regadas diariamente) ou 5 determinações (plantas sujeitas a défice hídrico). A comparação das médias de cada dia foi feita pelo teste de Student. São assinaladas as médias do tratamento significativamente diferentes [P<0,05] da média das plantas regadas diariamente: ** (P<0,01) e *** (P<0,001).

Apesar de no 1º dia de alívio do défice hídrico a taxa de fotossíntese ser ainda ligeiramente inferior à das plantas regadas diariamente, a diferença não era estatisticamente significativa (fig. 17). Contudo, a recuperação da condutância foliar foi mais lenta. O atraso na reabertura estomática foi particularmente evidente no 2º ensaio, no decurso do qual não foi detectada qualquer recuperação da condutância da página adaxial no dia imediatamente após o restabelecimento da rega (fig. 18). Os efeitos a posteriori do défice hídrico sobre a abertura dos estomas persistiram, em ambos os ensaios, 2 dias após o restabelecimento da rega (fig. 17 e 18), apesar de nesse dia já ser completa a re-hidratação tanto do solo (fig. 13) como das folhas (fig. 14 e 15).

O atraso na reabertura estomática não estava associado à existência de concentrações elevadas de ácido abscísico nos exsudados xilémicos colhidos, no 1º ensaio, de folhas previamente sujeitas a défice hídrico (quadro V).

Quadro V

Concentração de ácido abscísico (em mmol m^{-3}) determinada nos exsudados xilêmicos de folhas recém-expandidas de *Helianthus annuus* L. colhidos, no ensaio de 1991, no 1º e no 2º dia imediatamente a seguir ao restabelecimento da rega e em plantas regadas diariamente (testemunha). São apresentados valores médios \pm desvio padrão de 4 determinações, excepto no caso das plantas testemunha em que n=6.

Amostra	Testemunha	1º dia recuperação	2º dia recuperação
1ª	0,10 \pm 0,04	0,07 \pm 0,01	0,07 \pm 0,04
2ª	0,07 \pm 0,02	0,05 \pm 0,01	0,08 \pm 0,04

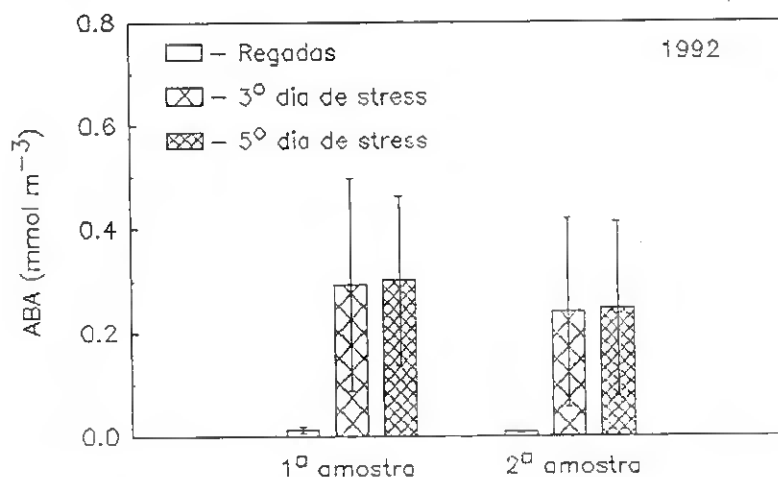


Fig. 19

Concentração de ácido abscísico (ABA) determinada nos exsudados foliares, colhidos em 1992, de plantas de *Helianthus annuus* L. regadas ou não. São apresentados valores médios de 3-5 determinações sendo indicado o desvio padrão.

A não persistência de níveis residuais de ácido abscísico no xilema das plantas que recuperavam dos efeitos do déficit hídrico não resultou de incapacidade de síntese daquele regulador de crescimento por parte de *Helianthus annuus*, visto que no ensaio realizado em 1992 os exsudados colhidos de plantas não regadas tinham concentrações de ácido abscísico mais elevadas do que as amostras colhidas de plantas regadas diariamente (fig. 19). Contudo, tais diferenças poderiam resultar de uma maior contaminação de origem floémica ou parenquimatosa, visto que a concentração de açúcares nos exsudados das plantas não regadas era geralmente superior à determinada nos exsudados foliares das plantas regadas (fig. 20).

Entre os açúcares que foram quantificados nos exsudados foliares, a frutose era o menos abundante e a glucose aquela que atingia concentrações mais elevadas (fig. 20). A concentração de ácido abscísico nas amostras colhidas, em ambos os dias, de folhas de plantas não regadas estava positivamente correlacionada não só

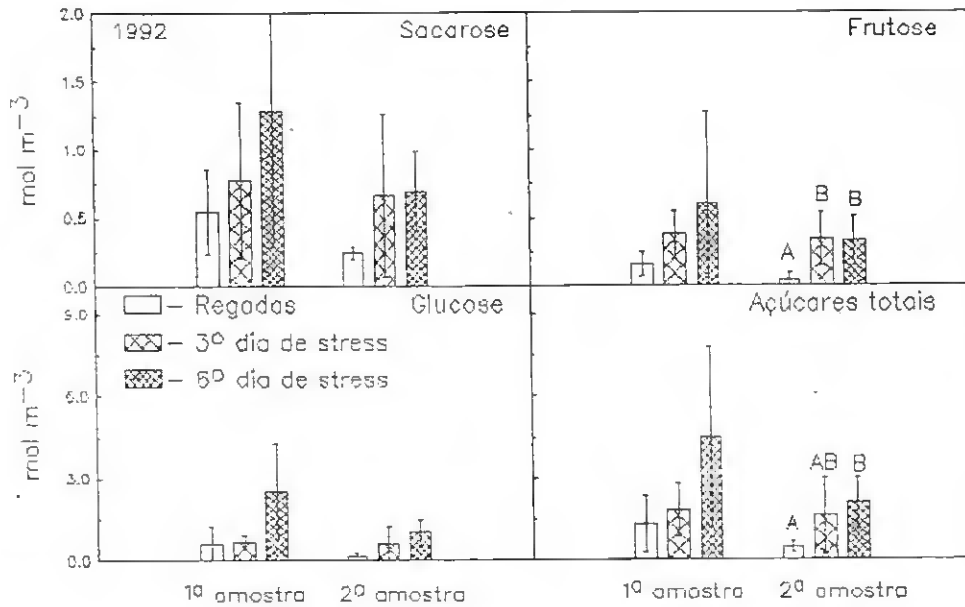


Fig. 20

Concentração de açúcares nos exsudados foliares de plantas de *Helianthus annuus* L. regadas ou não. São apresentados valores médios de 3-5 determinações sendo indicado o desvio padrão. As médias significativamente diferentes entre si (teste SNK ou Games & Howell - $P < 0,05$) são assinaladas com maiúsculas diferentes.

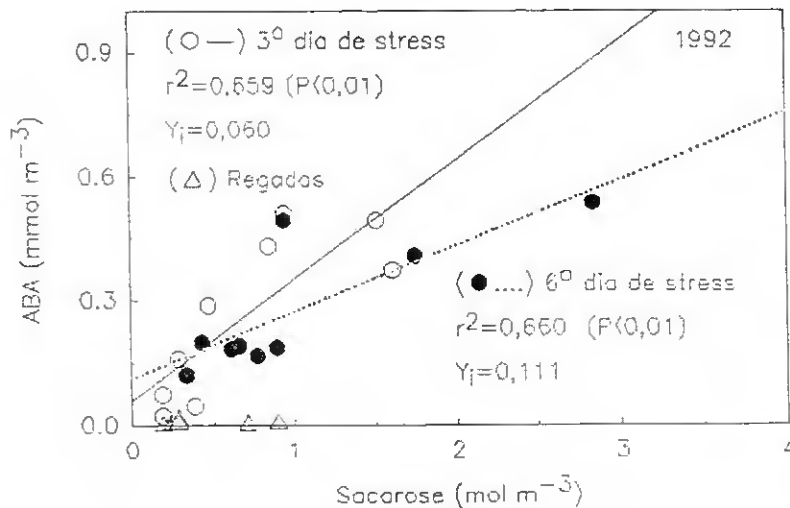


Fig. 21

Relação entre as concentrações de ácido abscísico (ABA) e sacarose determinadas nos exsudados foliares de plantas de *Helianthus annuus* L. regadas ou sujeitas a déficit hídrico. São indicados os valores do quadrado do coeficiente de correlação (r^2) e respectivo nível de significância, assim como o valor da intercepção nas ordenadas (Y_1), estimativa da concentração de ácido abscísico no xilema (cap. III.11).

com a concentração total de açúcares como com a concentração de frutose e sacarose, sendo o coeficiente de correlação superior neste último caso (quadro VI). Nos exsudados foliares das plantas regadas a variabilidade da concentração de ácido abscísico era pequena (fig. 19) e a concentração daquele regulador de crescimento não estava correlacionada com a concentração de nenhum dos açúcares analisados (quadro VI). Contudo, quando a concentração de ABA era representada em função da concentração de sacarose determinada nas mesmas amostras, verificava-se que, para igual concentração de sacarose, a concentração de ácido abscísico era superior nos exsudados colhidos de plantas não regadas do que nos exsudados foliares de plantas regadas (fig. 21). Para além disso, a estimativa da concentração de ácido abscísico no xilema das plantas não regadas, na ausência de contaminação floémica (Y_i na figura 21), era superior à concentração média de ABA determinada nos exsudados recolhidos de plantas regadas ($11 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-3}$). Estes dados indicam que a suspensão da rega resultou na acumulação de ácido abscísico ao nível do xilema de Helianthus annuus.

Quadro VI

Correlação entre a concentração de ácido abscísico (ABA) e a concentração de açúcares determinadas nos exsudados foliares de plantas de Helianthus annuus L. regadas diariamente ou após a suspensão da rega por 3 e 6 dias. São indicados os valores do quadrado do coeficiente de correlação (r^2) e respectivo nível de significância (P).

ABA vs	Regadas (n=6)		30 dia de stress (n=9)		60 dia de stress (n=9)	
	r^2	P	r^2	P	r^2	P
sacarose	0,015	(n.s.)	0,659	(<0,01)	0,661	(<0,01)
glucose	0,002	(n.s.)	0,327	(n.s.)	0,543	(<0,05)
frutose	0,022	(n.s.)	0,565	(<0,05)	0,517	(<0,05)
totais	0,003	(n.s.)	0,545	(<0,05)	0,610	(<0,05)

Os efeitos a posteriori do défice hídrico sobre a abertura estomática não foram revertidos pelo destacamento foliar e imersão do pecíolo em água: no dia imediatamente a seguir ao restabelecimento da rega no ensaio de 1992, a condutância foliar da página abaxial das plantas previamente sujeitas a défice hídrico correspondia a cerca de 40% do valor determinado nas folhas de plantas regadas diariamente, quer se considerassem as determinações de condutância efectuadas em folhas de plantas intactas (fig. 18) como em folhas destacadas e com o pecíolo imerso em água (fig. 22). No caso da página adaxial, as diferenças de condutância entre as folhas destacadas dos dois

tipos de plantas também eram significativas: a condutância das folhas das plantas que recuperavam dos efeitos da secura do solo correspondia a cerca de 50% da condutância das folhas das plantas regadas diariamente (fig. 22).

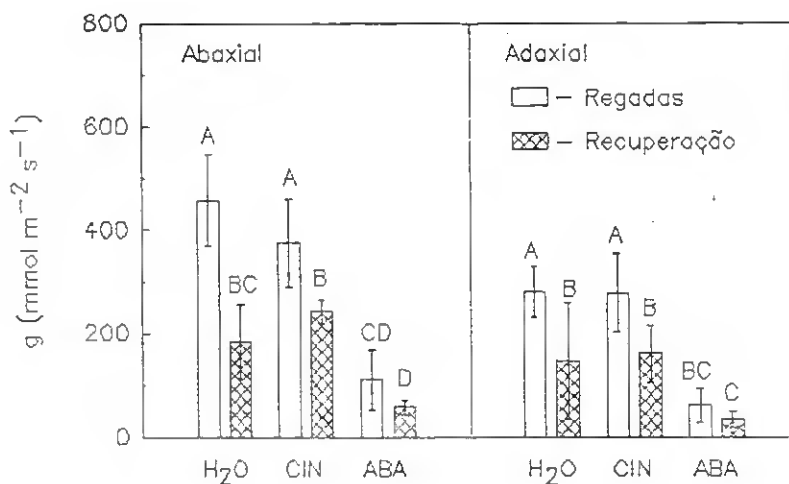


Fig. 22

Condutância foliar [g] abaxial e adaxial de folhas destacadas de plantas de *Helianthus annuus* L. regadas diariamente ou de plantas no 19 dia de recuperação dos efeitos do déficit hídrico no solo. O pecíolo das folhas encontrava-se imerso em água destilada (H₂O) ou em soluções contendo 1 mmol m⁻³ de cinetina (CIN) ou 0,5 mmol m⁻³ de ácido abscísico (ABA). As médias significativamente diferentes entre si (teste SNK - P<0,05) são assinaladas com maiúsculas diferentes.

A inibição da abertura estomática após o alívio do déficit hídrico não foi revertida pela introdução de cinetina no fluxo transpiratório de folhas destacadas (fig. 22). Por outro lado, a aplicação exógena de ácido abscísico (numa concentração de 0,5 mmol m⁻³) a folhas destacadas de plantas regadas resultou num decréscimo de 80% tanto na condutância abaxial como adaxial (fig. 22). Este decréscimo foi da mesma ordem de grandeza do registado em folhas não destacadas de plantas não regadas (fig. 18), as quais possuíam uma concentração xilémica daquele regulador de crescimento (fig. 21) que era inferior à aplicada exógenamente.

3.3. Discussão

Em ambos os ensaios realizados com plantas de *Helianthus annuus*, a imposição de secura no solo resultou numa resposta de acentuado encerramento estomático (fig. 17 e 18). No entanto, a diminuição da abertura dos estomas não evitou que ocorresse desenvolvimento de déficit hídrico foliar severo (fig. 14 e 15). Após o restabelecimento da rega, a re-hidratação das plantas foi

relativamente lenta: as diferenças, entre plantas regadas diariamente e aquelas que recuperavam dos efeitos da secura do solo, quanto ao potencial hídrico foliar determinado de manhã persistiram no dia imediatamente a seguir ao restabelecimento da rega (fig. 15).

Em virtude de terem uma maior condutância foliar, as plantas regadas diariamente tinham taxas de transpiração superiores às das plantas que foram previamente sujeitas a déficit hídrico (fig. 17). No ensaio de 1991, o estado hídrico do solo recuperou logo no primeiro dia após o restabelecimento da rega, enquanto que no ensaio realizado no último ano isso só ocorreu dois dias após o restabelecimento da rega (fig. 13). Após se ter verificado a re-hidratação do solo, seria de esperar que o potencial hídrico foliar fosse inferior nas plantas regadas (com maiores taxas de transpiração, fig. 17) do que naquelas que recuperavam dos efeitos da secura do solo, caso a condutância hidráulica destas últimas fosse igual à das plantas regadas diariamente. Contudo, o potencial hídrico das plantas testemunha era superior ao das plantas que recuperavam dos efeitos do déficit hídrico (fig. 15), o que indica que a desidratação do solo poderá ter provocado um decréscimo na condutância hidráulica das plantas, o qual não foi imediatamente revertido em resultado da re-hidratação do solo.

Estes resultados estão de acordo com trabalhos realizados anteriormente, nos quais se tinha constatado ser relativamente fraca a capacidade de re-hidratação de Helianthus annuus, após défices hídricos severos. Semann et al (1982), por exemplo, compararam o comportamento face à secura de Helianthus annuus e Sinapsis alba, tendo concluído ser a primeira espécie particularmente sensível ao déficit hídrico. Segundo aqueles autores, a re-hidratação de plantas de girassol após sofrerem défices hídricos severos era dificultada por uma acentuada diminuição da condutância hidráulica ao nível da planta. Num outro estudo, Sionit & Kramer (1976) compararam os efeitos da secura em soja e girassol, tendo verificado que as folhas desta última espécie não só emurcheciam mais rapidamente, como tinham uma menor capacidade de recuperar dos efeitos de défices hídricos severos. Segundo Semaan et al (1982), as diferenças entre espécies quanto à rapidez de re-hidratação deverão ter a ver com diferenças ao nível do comportamento do sistema radicular face à imposição da secura no solo. Num estudo mais recente, Robertson et al (1990) estudaram os efeitos da secura ao nível do sistema radicular de girassol. Aquelles autores verificaram que só 25% das raízes sobreviviam ao fim de 5 dias de imposição de déficit

hídrico, quando o potencial hídrico foliar decrescia para $-1,5$ MPa, valor esse que foi ultrapassado em ambos os ensaios realizados no presente trabalho (fig. 15).

Apesar do relativo atraso na re-hidratação foliar, tal facto não parece ser suficiente para explicar, por si só, os efeitos a posteriori do défice hídrico sobre a abertura dos estomas, visto que a depressão na condutância foliar persistia 2 dias após o restabelecimento da rega (fig. 17 e 18), quando já não se registavam quaisquer diferenças quanto às relações hídricas foliares (fig. 14 e 15).

A concentração de ácido abcísico determinada, no ensaio de 1992, nos exsudados foliares de plantas regadas ($11 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-3}$) encontra-se dentro da gama de valores determinados, noutros trabalhos, no xilema de plantas regadas de Helianthus annuus: 3 a $58 \mu\text{mol m}^{-3}$ (Hoad, 1975; Neales et al, 1989; Zhang & Davies, 1989b; Neales & McLeod, 1991; Schurr et al, 1992). A concentração de ABA nos exsudados colhidos no ensaio de 1991 era superior (quadro V). Contudo, neste ensaio não foi quantificada a concentração de açúcares nos exsudados foliares, pelo que não pode ser avaliada a sua contaminação floémica. Esta pode resultar numa significativa sobrestimação da concentração de ABA no xilema, como demonstram os resultados obtidos nas plantas não regadas, em 1992: no último dia de imposição do défice hídrico, por exemplo, a concentração média de ácido abcísico nos exsudados contaminados era de $0,28 \text{ mmol m}^{-3}$ (fig. 19); contudo, a concentração xilémica daquele regulador de crescimento decrescia para menos de metade ($0,11 \text{ mmol m}^{-3}$) quando se corrigia a sobrestimação devida à contaminação de origem floémica (fig. 21).

Apesar de, no ensaio de 1992, ter sido detectado um significativo aumento da concentração de ácido abcísico no xilema das plantas não regadas (fig. 21), quando se consideram os resultados obtidos em resposta à aplicação de ABA exógeno em folhas destacadas de plantas regadas (fig. 22), aquele aumento da concentração xilémica de ácido abcísico é aparentemente insuficiente para justificar o decréscimo observado na condutância foliar das plantas não regadas. Isto porque a concentração em que aquele regulador de crescimento foi aplicado exogenamente ($0,5 \text{ mmol m}^{-3}$) era cerca de 5 vezes superior à concentração endógena existente no xilema das plantas não regadas (fig. 21), mas o resultante decréscimo da condutância foliar foi da mesma ordem de grandeza do registado nas plantas não regadas, ou seja, cerca de 80% (comparar fig. 18 e 22). No entanto, tal conclusão seria precipitada, pois no ensaio de aplicação exógena

não foram comparados os efeitos estomáticos de diferentes concentrações de ácido abscísico. Considerando os resultados obtidos por Zhang & Davies (1989b), a concentração de ácido abscísico determinada, no presente trabalho, no xilema das plantas não regadas não é suficientemente elevada para justificar a saturação da resposta estomática de girassol. Contudo, Schurr et al (1992) verificaram que a sensibilidade estomática do girassol para o ABA é muito variável, dependendo quer do pH apoplástico, quer da concentração xilémica de íons inorgânicos. Assim, não se pode excluir a possibilidade de a concentração endógena, determinada no xilema das plantas não regadas, ser suficientemente elevada para saturar os receptores de ácido abscísico existentes no plasmalema das células guarda das plantas utilizadas no presente trabalho. Se assim for, não seria de esperar que a aplicação daquele regulador de crescimento em concentrações superiores produzisse efeitos estomáticos mais acentuados.

Quanto aos efeitos a posteriori do déficit hídrico severo sobre a condutância estomática de Helianthus annuus, estes não resultaram de um eventual atraso no decréscimo da concentração xilémica de ácido abscísico. No ensaio realizado em 1991, a concentração daquele regulador de crescimento era igual nos exsudados colhidos de plantas regadas diariamente e naqueles que provinham de plantas previamente sujeitas a déficit hídrico (quadro V). No ensaio realizado em 1992 não foi determinada a concentração xilémica de ácido abscísico após o alívio do déficit hídrico. No entanto, a inibição da abertura estomática persistiu quando as folhas de plantas que recuperavam dos efeitos do déficit eram destacadas e o seu pecíolo era imerso em água (fig. 22). Estes resultados indicam que os efeitos a posteriori do déficit hídrico sobre a condutância estomática de girassol não terão sido causados pela persistência de elevadas concentrações xilémicas de ácido abscísico, ou de qualquer outro inibidor da abertura estomática transportado no fluxo transpiratório.

Como já foi referido anteriormente, a condutância hidráulica do girassol parece decrescer após a experiência de défices hídricos severos, em resultado, nomeadamente, da elevada sensibilidade à desidratação por parte do seu sistema radicular (Sionit & Kramer, 1976; Semann et al, 1982; Robertson et al, 1990). As citocininas são sintetizadas nas raízes (Chen et al, 1986), podem promover a abertura estomática (Snaith & Mansfield, 1982a; Blackman & Davies, 1984b, 1985) e foi proposto o seu envolvimento para explicar a sintonia entre condutância

estomática e condutância hidráulica observada em algumas plantas (Meinzer *et al.*, 1991). Contudo, no presente trabalho, a aplicação exógena de cinetina a folhas destacadas não resultou no alívio dos efeitos a posteriori do déficit hídrico sobre a condutância estomática (fig. 22). Uma vez que estas folhas tinham baixas condutâncias foliares, mesmo quando o seu pecíolo estava imerso em água, poder-se-ia pôr a hipótese de a ausência de resposta à aplicação exógena de cinetina ter resultado da ineficácia do transporte deste composto até às células guarda. Contudo, quando o ácido abscísico foi aplicado a essas mesmas folhas detectou-se uma resposta de encerramento estomático (fig. 22), o que indica que as baixas taxas de transpiração não impediram o transporte daquele regulador de crescimento até às células guarda. Assim, é provável que o mesmo se tenha verificado no caso da cinetina, visto que este composto e o ácido abscísico foram aplicados por processo idêntico. Contudo, a ineficácia da aplicação exógena de cinetina reverter a inibição da abertura dos estomas não permite excluir a hipótese dos efeitos a posteriori dos défices hídricos sobre a condutância estomática estarem associados à carência de citocininas. No presente trabalho só foram testados os efeitos da aplicação exógena de uma das citocininas sintéticas - a cinetina. Ora, como já foi referido anteriormente (cap. II.3), as várias citocininas podem diferir quanto à sua actividade ao nível dos estomas (Das *et al.*, 1976; Bradford, 1983). Por outro lado, o tempo de aplicação da cinetina a folhas destacadas foi limitado a algumas horas, pelo que o ensaio de aplicação exógena só permitiria pôr em evidência efeitos a curto prazo desta citocinina. Assim, a persistência da limitação da abertura estomática, após a aplicação de cinetina a folhas destacadas, pode ser o resultado de os efeitos estomáticos da eventual carência de citocininas, em situações de déficit hídrico severo, só serem reversíveis a médio prazo.

Em resumo, os resultados obtidos no presente trabalho não permitem concluir se a observada acumulação xilémica de ácido abscísico foi suficiente para justificar o decréscimo detectado na condutância foliar das plantas de Helianthus annuus não regadas. Quanto aos efeitos a posteriori do déficit hídrico severo sobre a abertura dos estomas de girassol, eles não resultaram da persistência de elevadas concentrações xilémicas daquele regulador de crescimento. O observado atraso na reabertura estomática, após o alívio dos défices hídricos, estava associado a um aparente decréscimo da condutância hidráulica das plantas e

poderá resultar de alterações estruturais a nível celular, desencadeadas durante o período de desidratação (pela acumulação de mensagens positivas ou pela carência de mensagens negativas), as quais não serão reversíveis a curto prazo.

4. Efeitos da imposição e alívio de défices hídricos severos na condutância foliar e na concentração de ABA no xilema de Lupinus albus L.

4.1. Material vegetal e condições experimentais

Foram realizados dois ensaios de imposição e alívio de défice hídrico severo com plantas de Lupinus albus L.: no primeiro (realizado em 1991) o défice hídrico foi imposto após a floração, enquanto que o segundo ensaio (1992) foi realizado com plantas em desenvolvimento vegetativo. Ambos os ensaios foram realizados com plantas em vasos de 12 litros, cada um deles com 4 plantas.

A condutância foliar foi determinada, em ambas as superfícies dos folíolos centrais, por porometria de difusão (porómetro MK3 - Delta T).

O potencial hídrico foliar foi determinado com a câmara de pressão, a qual foi também utilizada para extrair os exsudados xilémicos das folhas. Após a recolha dos exsudados, um dos folíolos centrais foi congelado em azoto líquido, sendo posteriormente extraído o suco celular para determinação do potencial osmótico por higrometria (câmaras C-52, Wescor, E.U.A.). O teor relativo em água foi determinado no resto da folha.

A quantificação do ácido abcísico nos exsudados foliares foi feita pela técnica ELISA. Nas mesmas amostras determinou-se também a concentração de glucose, frutose e sacarose. A concentração de ABA no xilema foi estimada como sendo a intercepção nas ordenadas da recta que relaciona a concentração daquele regulador de crescimento e a concentração de sacarose determinada nas mesmas amostras (cap III.11).

Em ambos os ensaios, após a medição da condutância foliar e da colheita dos exsudados foliares, foi determinado o teor relativo em água do solo (cap. III.6).

4.1.1. Ensaio com plantas em desenvolvimento reprodutivo

A sementeira foi feita durante o Inverno, em vasos que

continham uma mistura de turfa e areia (1:3) e as plantas cresceram em condições naturais (ao ar livre) em Lisboa (I.S.A.).

A resposta estomática à introdução de ABA exógeno no fluxo transpiratório foi estudada em folhas destacadas de plantas que se encontravam na fase de desenvolvimento da 1ª inflorescência. A aplicação de ácido abscísico exógeno foi feita em folhas expandidas (10ª abaixo da inflorescência) destacadas de plantas regadas. Após o destacamento, as folhas foram transferidas para uma estufa de ambiente não controlado, na qual se efectuaram as determinações de condutância. Para além de medições regulares da condutância foliar, foi também calculada a taxa de transpiração das folhas entre cada determinação de condutância.

O défice hídrico foi imposto durante a Primavera, por supressão da rega a plantas que se encontravam na fase de 1ª frutificação e nas quais já se tinham desenvolvido ramificações em floração.

As determinações foram efectuadas em folhas de 2 idades: folhas recém-expandidas (1-3ª abaixo da 1ª frutificação) e adultas (6-9ª abaixo da 1ª frutificação).

As medições da condutância foliar foram efectuadas 3 horas após o nascer do Sol. Nas 3 horas seguintes determinou-se o potencial hídrico foliar com a câmara de pressão e colheram-se amostras da solução apoplástica das mesmas folhas. De cada folha colheram-se 2 amostras: a primeira aplicando uma sobrepressão de 0,25 MPa e a segunda aumentando a pressão na câmara 0,25 MPa acima da anterior.

No fim do ensaio foi analisado o efeito da aplicação exógena de ácido abscísico sobre a taxa de transpiração de folhas destacadas de plantas regadas em frutificação. Durante a aplicação do ABA exógeno as folhas foram mantidas sob abrigo.

4.1.2. Ensaio com plantas em desenvolvimento vegetativo

O ensaio foi realizado durante o Inverno, tendo as plantas crescido, em Gambelas, sob abrigo sem controlo ambiental. A sementeira foi feita em Dezembro, em vasos de 12 litros contendo uma mistura comercial para vasos (mistura de turfa e solo da Serra de Monchique). O défice hídrico foi imposto no início de Fevereiro, quando as plantas tinham, em média, 15 folhas com um folíolo central com mais de 2 cm de comprimento.

As medições foram efectuadas em folhas em expansão (jovens) e em folhas recém-expandidas (adultas), respectivamente, a 5ª e 10ª folha, a contar do ápice, com um comprimento do folíolo

central superior a 2 cm.

Antes do nascer do Sol determinou-se o potencial hídrico, o potencial osmótico e o teor relativo em água das folhas. A condutância foliar foi medida 3 horas após o nascer do Sol. Nas 4 horas que se seguiram às determinações da condutância efectuaram-se medições das relações hídricas foliares. No 9º dia de imposição do défice hídrico colheram-se amostras de solução xilémica tanto de folhas jovens como adultas. Destas últimas colheram-se também amostras de exsudados xilémicos no 1º dia após o restabelecimento da rega. De cada folha colheram-se duas amostras: depois de determinar o potencial hídrico, a pressão na câmara era aumentada 0,1 MPa, a extremidade do pecíolo lavada com um esguicho de água destilada e desprezado o exsudado então produzido; seguidamente, a pressão na câmara era aumentada em cerca de 0,25 MPa, sendo então recolhido o exsudado, procedimento este que se repetia uma outra vez. O teor relativo em água foliar foi determinado a meio da tarde, mais precisamente 8 horas após o nascer do Sol.

A resposta estomática à aplicação de ABA exógeno foi estudada em folhas destacadas de plantas regadas e de plantas sujeitas a stress hídrico moderado e severo (após 7 e 16 dias de suspensão da rega, respectivamente). No último dia de imposição do défice hídrico e no primeiro após o alívio do mesmo, foi analisada a capacidade da benziladenina promover a reabertura dos estomas quando introduzida no fluxo transpiratório de folhas destacadas.

4.2. Resultados

4.2.1. Ensaio com plantas em desenvolvimento reprodutivo

A resposta estomática ao ácido abscísico foi analisada em folhas expandidas, destacadas de plantas regadas em floração. O processo de destacamento das folhas não afectou a capacidade de abertura dos estomas: 3 horas após terem sido iluminadas, as folhas destacadas e com o pecíolo imerso em água tinham uma condutância foliar total (abaxial + adaxial) de $472 \pm 32 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (n=4), ou seja, muito semelhante à determinada, 3 horas após o nascer do Sol, em folhas, não destacadas, das mesmas plantas: $436 \pm 32 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, n=8. Como se pode verificar na figura 23, a resposta estomática à aplicação de ácido abscísico exógeno foi da mesma ordem de grandeza nas duas superfícies foliares. Na primeira determinação da condutância foliar (efectuada hora e

meia após a iluminação das folhas) não se detectou qualquer resposta estomática à aplicação de ácido abscísico numa concentração inferior a $0,5 \text{ mmol m}^{-3}$. Contudo, ao fim de 3 horas de iluminação era evidente um significativo decréscimo da condutância foliar em resposta à introdução no fluxo transpiratório de ABA exógeno numa concentração igual a $0,15 \text{ mmol (+) ABA m}^{-3}$ (fig. 23).

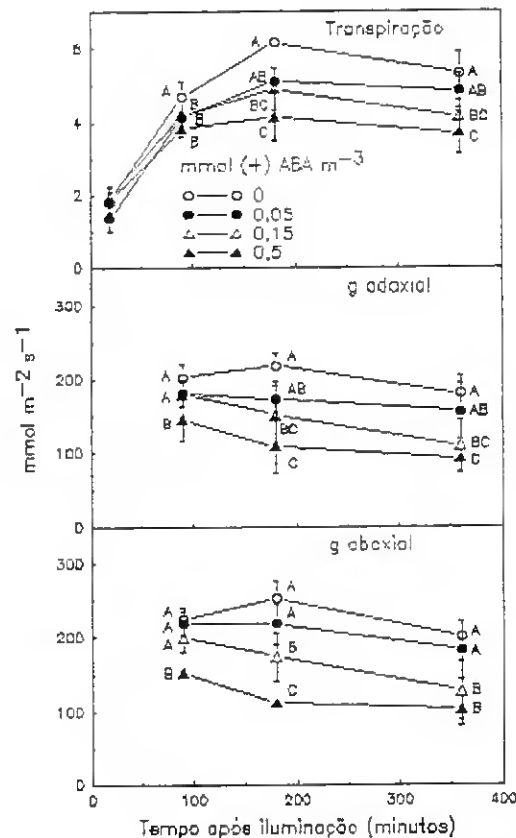


Fig. 23

Variacão da taxa de transpiração e da condutância para a difusão do vapor de água [g] da página abaxial e adaxial de folhas expandidas, destacadas de plantas regadas de *Lupinus albus* L. em floração, cujo pecíolo se encontrava inerso em água ou em soluções de ABA sintético. Cada ponto corresponde à média de 4 folhas, sendo indicado o desvio padrão. Para cada um dos períodos em que foram efectuadas determinações, as médias significativamente diferentes entre si (teste SNK, $P < 0,05$) são assinaladas com maiúsculas diferentes.

O ensaio de imposição de secura foi feito numa fase posterior de desenvolvimento das plantas, quando já se desenvolvia o 2º andar de inflorescências. As plantas tinham então uma área foliar total relativamente grande e o ensaio foi realizado num período com dias de céu limpo, bastante quentes e secos. Em consequência, a secagem do solo foi rápida e, ao fim de 5 dias de suspensão da rega, o teor relativo em água do solo era inferior a 40% (fig. 24). No dia imediatamente a seguir à

reposição da rega o teor relativo em água do solo nos vasos sujeitos a um período de secura ainda era inferior ao dos vasos regados diariamente (fig. 24).

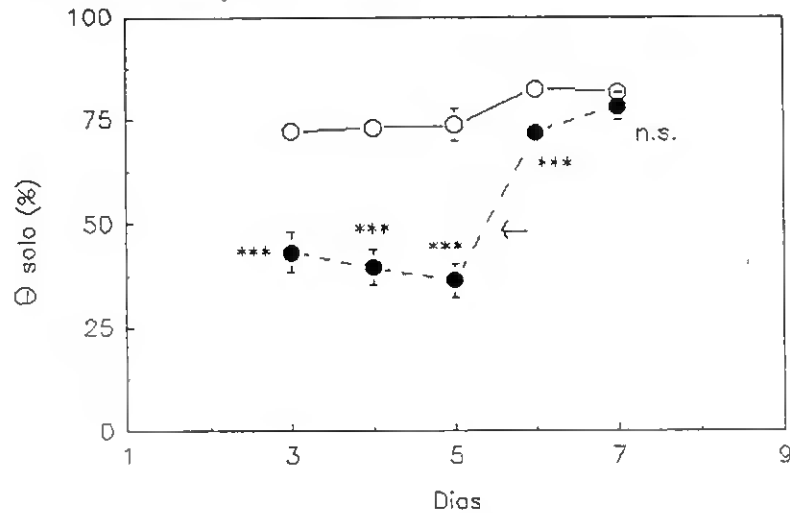


Fig. 24
Variação do teor relativo em água no solo (θ solo) de vasos regados diariamente (símbolos abertos, $n=4$) e de vasos cuja rega foi suspensa na véspera do dia 1 (símbolos a cheio, $n=5$) sendo retomada ao fim do dia 5 (seta). A comparação entre as médias de cada dia foi feita pelo teste de Student, sendo as médias do tratamento assinaladas com *** ou n.s., consoante $P < 0,001$ ou $P > 0,05$.

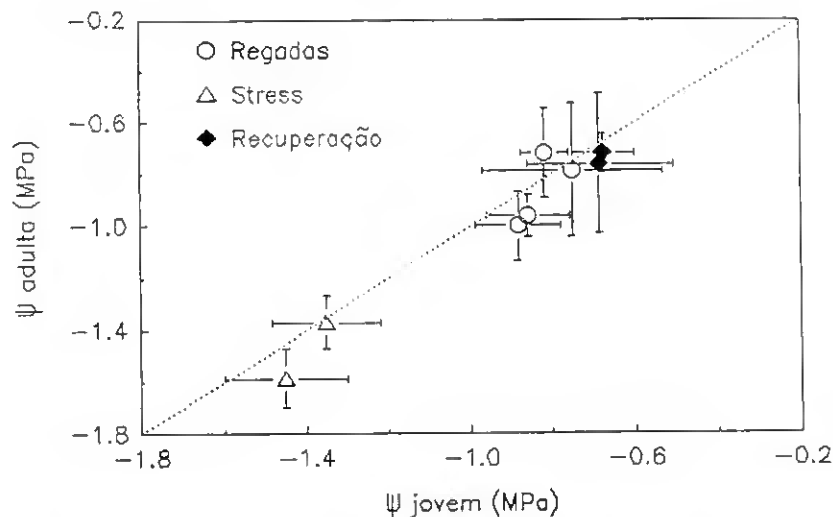


Fig. 25
Relação entre o potencial hídrico (Ψ) de folhas jovens recém-expandidas e de folhas adultas de plantas de *Lupinus albus* L. em frutificação. São apresentados valores médios diários ($n=3$) e respectivos desvios padrão.

Não se detectaram diferenças entre os dois tipos de folhas (jovens e adultas), tanto nas plantas regadas como nas sujeitas a déficit hídrico no solo, quanto ao potencial hídrico (fig. 25), ao potencial osmótico no estado de máxima hidratação (fig. 26) e à condutância foliar (fig. 27). Assim, doravante serão analisados

conjuntamente os resultados obtidos nos dois tipos de folhas.

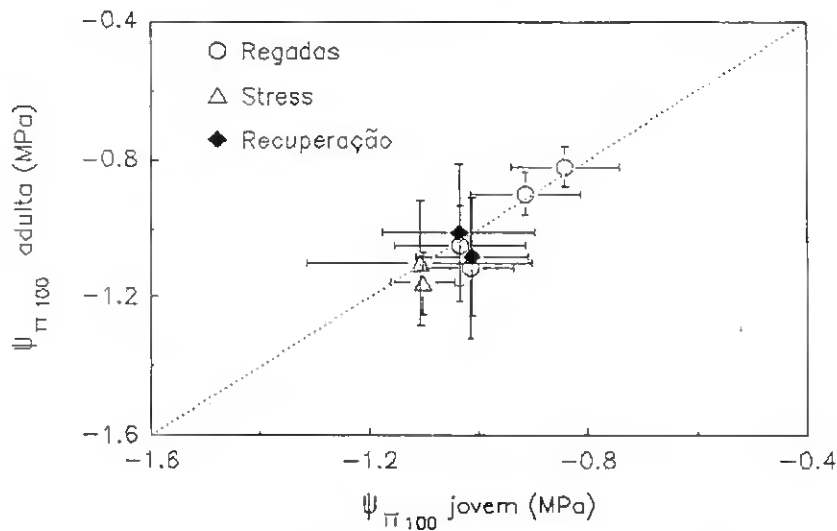


Fig. 26

Relação entre o potencial osmótico no estado de máxima hidratação ($\Psi_{\pi 100}$) de folhas jovens recém-expandidas e de folhas adultas de plantas de *Lupinus albus* L. em frutificação. São apresentados valores médios diários e respectivos desvios padrão (n=3).

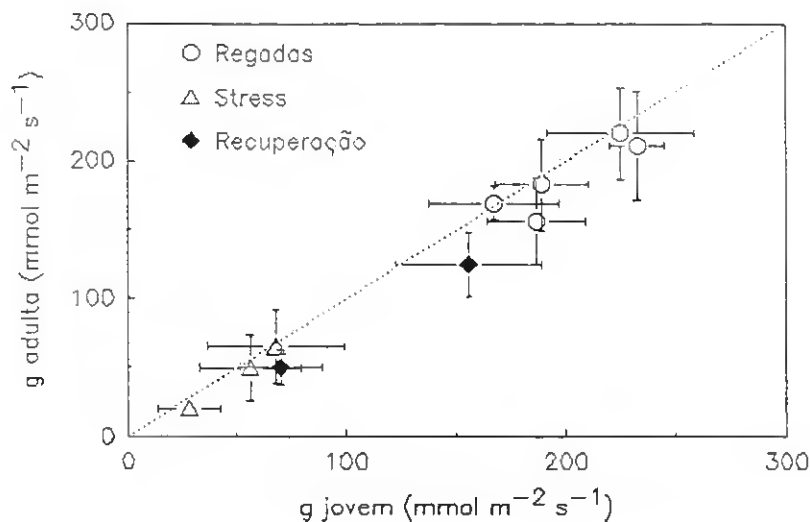


Fig. 27

Relação entre a condutância (abaxial + adaxial) de folhas jovens recém-expandidas e de folhas adultas de plantas de *Lupinus albus* L. em frutificação. Cada ponto representa a média de 4 ou 5 plantas, consoante se trata de plantas regadas ou de plantas sujeitas a déficit hídrico.

A diminuição do teor em água no solo resultou no desenvolvimento de déficit hídrico foliar: logo no 30º dia após a supressão da rega o potencial hídrico foliar das plantas não regadas era inferior, em cerca de 0,5 MPa, ao das plantas regadas (fig. 28). A análise do potencial osmótico no estado de máxima

hidratação (fig. 28) indicou a não ocorrência de ajustamento osmótico, pelo que o decréscimo no potencial hídrico deverá ter resultado em perda de turgescência foliar. Efectivamente, logo no segundo dia de imposição do défice hídrico, as plantas não regadas apresentavam sinais de emurchecimento.

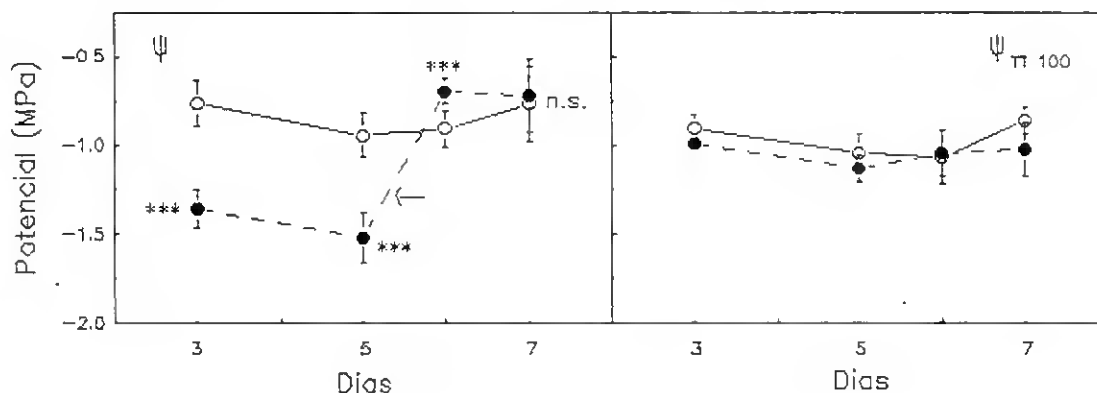


Fig. 28
 Variação do potencial osmótico no estado de máxima hidratação ($\Psi_{\pi 100}$) e do potencial hídrico foliar (Ψ) em plantas de *Lupinus albus* L., em frutificação, regadas diariamente (símbolos abertos) ou cuja rega foi suspensa na véspera do dia 1 (símbolos a cheio) e retomada ao fim do dia 5 (seta). Cada ponto representa a média de 6 folhas (recém-expandidas e adultas). São assinaladas as médias do tratamento significativamente diferentes (teste de Student) da média determinada, no mesmo dia, nas plantas testemunha: *** ($P < 0,001$).

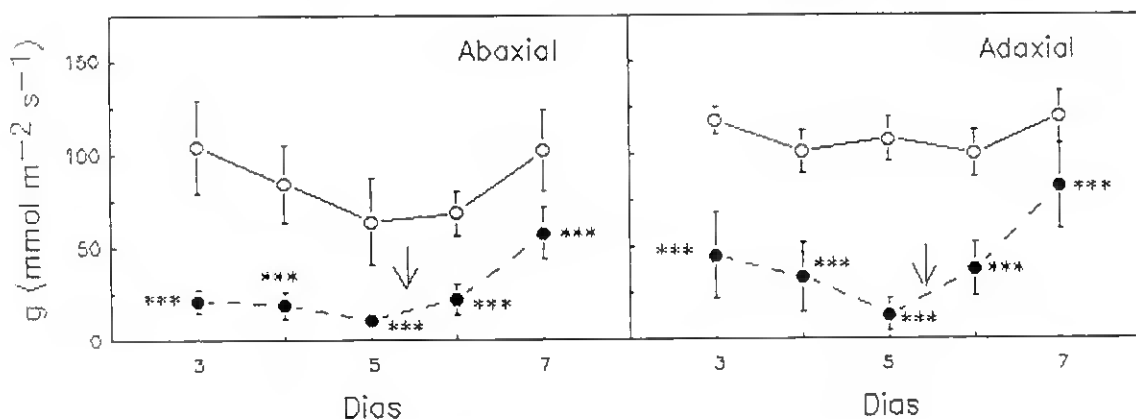


Fig. 29
 Variação da condutância (g) das duas superfícies foliares de plantas de *Lupinus albus* L., em frutificação, regadas diariamente (símbolos abertos, $n=8$) ou cuja rega foi suspensa na véspera do dia 1 (símbolos a cheio, $n=10$) e retomada ao fim do dia 5 (seta). São apresentados conjuntamente os resultados obtidos em folhas jovens e adultas. As médias do tratamento são assinaladas com *** o que indica que são significativamente diferentes (teste de Student, $P < 0,001$) da média das plantas testemunha.

O desenvolvimento de défice hídrico resultou no encerramento dos estomas nas duas superfícies foliares (fig. 29), tal como se tinha verificado em resposta à aplicação exógena de ABA (fig. 23). Ao fim de 3 dias de supressão da rega, o valor médio da

condutância foliar das plantas não regadas era cerca de um terço do valor médio determinado nas plantas regadas diariamente. No último dia de imposição do déficit hídrico os estomas estavam praticamente fechados, sendo a condutância inferior a $10 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, tanto na superfície abaxial como adaxial.

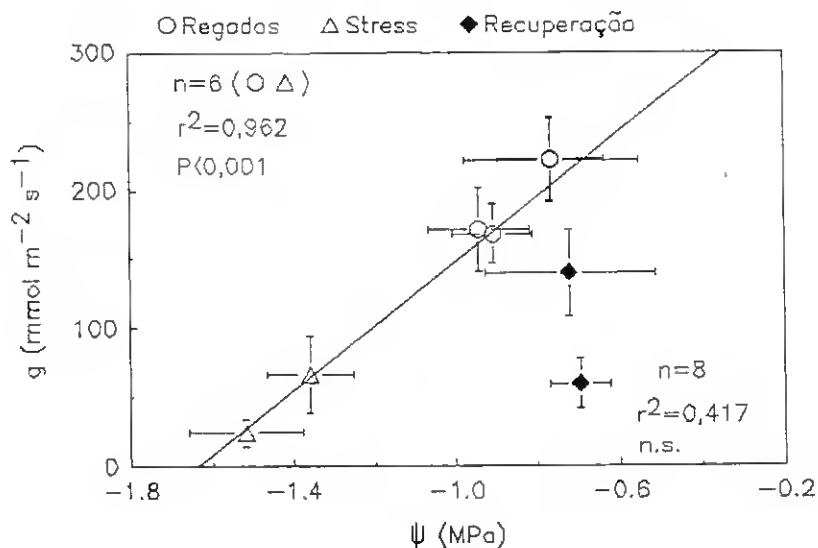


Fig. 30
Relação entre a condutância para a difusão do vapor de água (g) e o potencial hídrico (Ψ) de folhas (recém-expandidas e adultas) de plantas de *Lupinus albus* L. em frutificação.

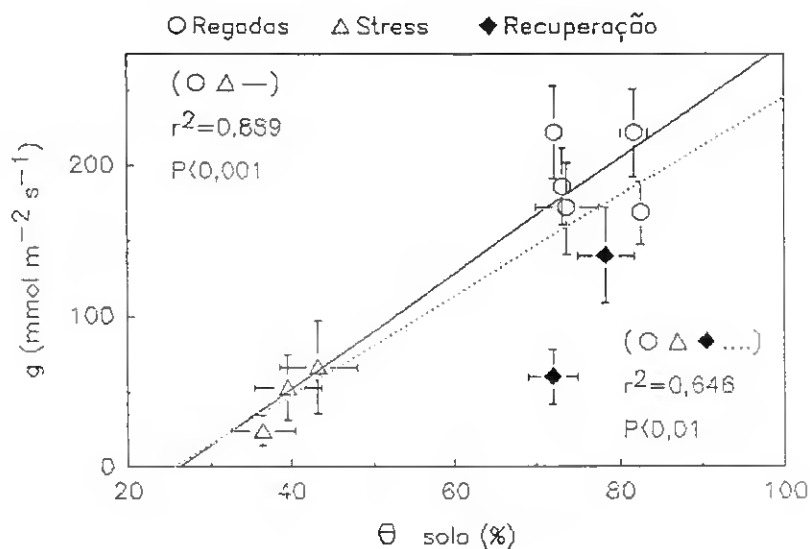


Fig. 31
Relação entre o teor relativo em água do solo (Θ solo) e a condutância para a difusão do vapor de água (g) de folhas (recém-expandidas e adultas) de plantas de *Lupinus albus* L. em frutificação.

Os efeitos estomáticos do déficit hídrico persistiram nos 2 dias a seguir ao restabelecimento da rega. Como se pode verificar na figura 29, no primeiro dia de alívio do déficit hídrico, a

reabertura dos estomas foi muito limitada. Apesar da condutância foliar ter aumentado do 1º para o 2º dia após o alívio do déficit hídrico, neste último as diferenças de condutância, entre as plantas testemunha e as plantas previamente sujeitas a déficit hídrico, eram ainda significativas.

Contrariamente à condutância foliar (fig. 29) e ao teor relativo em água no solo (fig. 24), as relações hídricas foliares recuperaram rapidamente dos efeitos da secura no solo: na manhã imediatamente após o restabelecimento da rega, o potencial hídrico foliar das plantas previamente sujeitas a secagem do solo era superior ao das plantas regadas diariamente (fig. 28).

As diferenças de condutância foliar entre as plantas testemunha e as plantas não regadas estavam correlacionadas com as variações do potencial hídrico foliar (fig. 30) e do teor relativo em água do solo (fig. 31). Contudo, a limitação da condutância foliar após re-hidratação do solo não estava associada à persistência de déficit hídrico foliar (fig. 28 e 30). Por outro lado, o coeficiente de correlação da condutância com o teor relativo em água do solo diminuía significativamente quando se consideravam as determinações efectuadas após o restabelecimento da rega: para um mesmo θ do solo, a condutância foliar das plantas que recuperavam dos efeitos do déficit hídrico era inferior à das plantas testemunha (fig. 31).

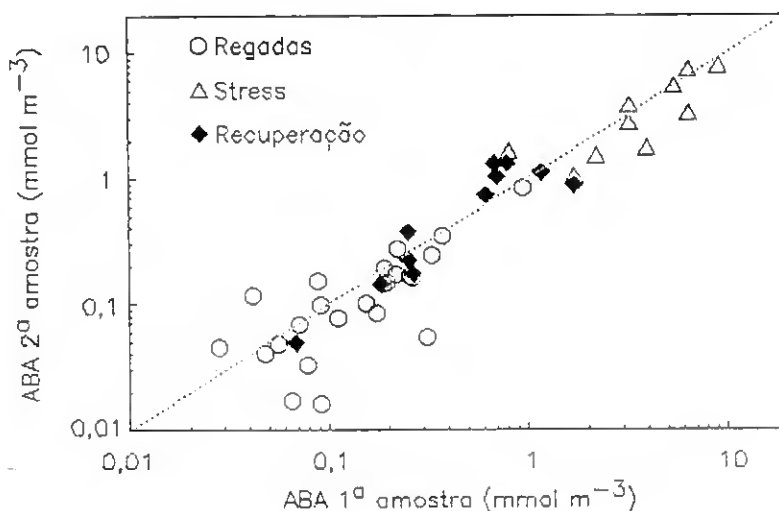


Fig. 32
Relação entre a concentração de ácido abscísico (ABA) nos dois exsudados colhidos de uma mesma folha de *Lupinus albus* L. em frutificação: o 1º exsudado foi recolhido aplicando uma sobrepressão de 0,25 MPa, tendo o 2º exsudado sido recolhido após aumentar a pressão na câmara 0,25 MPa acima da anterior.

Com vista a avaliar o papel desempenhado pelo ácido abscísico na resposta de encerramento dos estomas observada em plantas de

tremeceiro não regadas, a concentração daquele regulador endógeno de crescimento foi determinada nos exsudados xilêmicos de folhas pressurizadas na câmara de pressão. A concentração de ABA era muito semelhante nos dois exsudados colhidos de uma mesma folha, não sendo constante o sentido da variação (fig. 32). Tal como já se tinha verificado relativamente às relações hídricas foliares (fig. 25 e 26) e condutância foliar (fig. 27), a concentração de ácido abcísico nos exsudados xilêmicos era muito semelhante nas folhas jovens e nas folhas adultas (fig. 33). Assim, doravante os dados quanto à concentração de ácido abcísico nas amostras colhidas dos dois tipos de folhas serão analisados em conjunto.

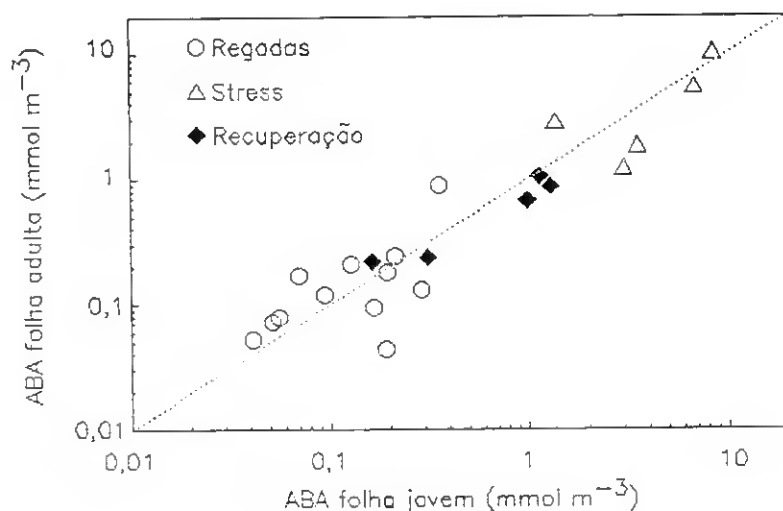


Fig. 33

Relação entre a concentração de ácido abcísico (ABA) nos exsudados de folhas recém-expandidas (jovem) e de folhas adultas das mesmas plantas de *Lupinus albus* L em frutificação. Cada ponto representa a concentração média determinada nos 2 exsudados colhidos de uma mesma folha.

A secagem do solo resultou num acentuado aumento da concentração de ácido abcísico nos exsudados foliares (fig. 34): a concentração daquele regulador de crescimento nos exsudados foliares de plantas não regadas era cerca de 20 vezes superior à concentração determinada nos exsudados das plantas regadas. Após o alívio do défice hídrico, a concentração de ABA decresceu para metade no primeiro dia. Contudo, dois dias após o restabelecimento da rega, a concentração de ácido abcísico era ainda 2 vezes superior à existente nos exsudados foliares das plantas testemunha, apesar da diferença não ser estatisticamente significativa.

Enquanto o teor relativo em água do solo se manteve acima dos 70%, a concentração de ácido abcísico nos exsudados foliares

não foi afectada pela desidratação do solo. Contudo, quando a deficiência hídrica no solo se acentuou, verificou-se um significativo aumento da concentração daquele regulador de crescimento (fig. 35). Cerca de 87 % das diferenças observadas na condutância foliar estavam associadas à variação da concentração de ácido abcísico nos exsudados foliares (fig. 36).

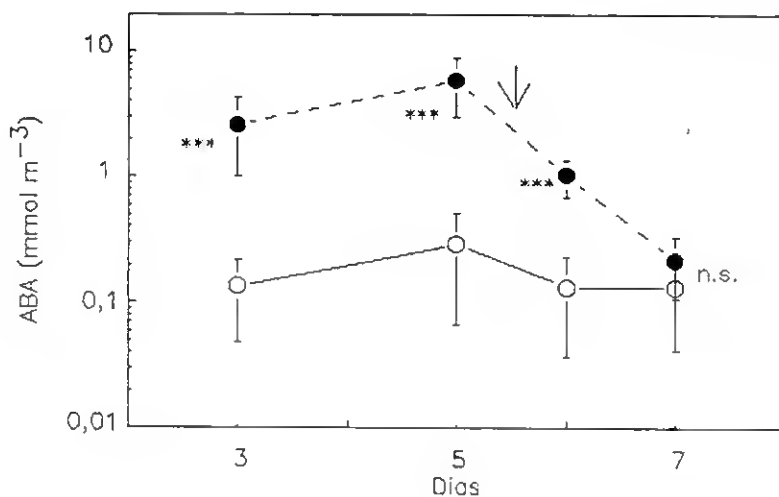


Fig. 34
Variação da concentração de ácido abcísico (ABA) nos exsudados foliares de plantas de *Lupinus albus* L., em frutificação, regadas diariamente (símbolos abertos) ou cuja rega foi suspensa na véspera do dia 1 (símbolos abertos) e retomada ao fim da tarde do dia 5 (seta). Cada ponto representa a média de 10-12 determinações efectuadas em 5-6 folhas (2 exsudados por folha). São apresentados conjuntamente os resultados obtidos em folhas recém-expandidas e adultas. A comparação entre as médias de cada dia foi feita pelo teste de Student, sendo as médias do tratamento assinaladas com *** ou n.s., consoante $P < 0,001$ ou $P > 0,05$.

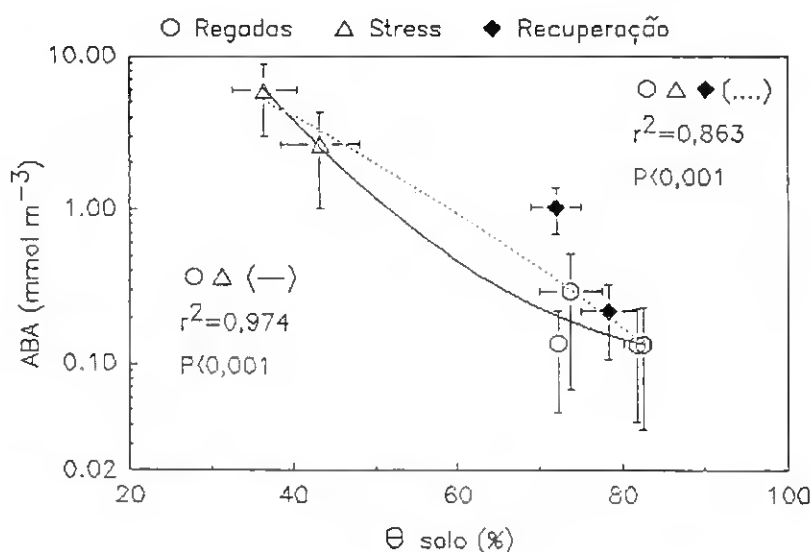


Fig. 35
Relação entre o teor relativo em água no solo (θ solo) e a concentração de ácido abcísico (ABA) nos exsudados foliares de plantas de *Lupinus albus* L. em frutificação.

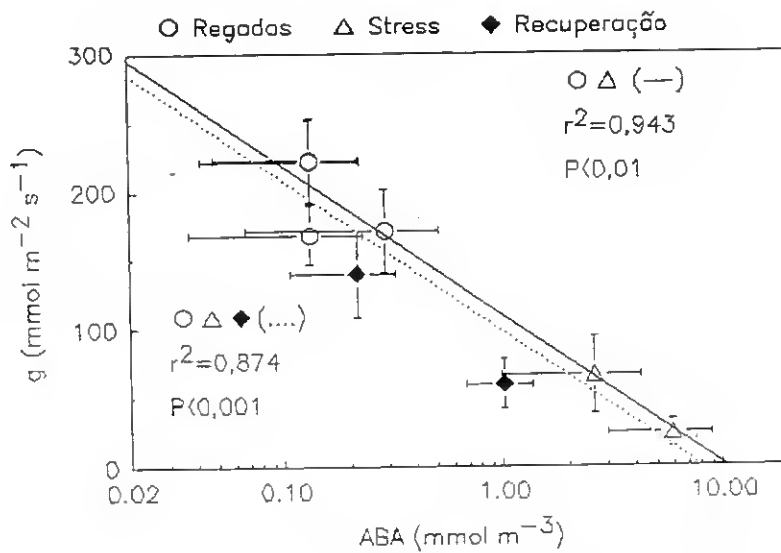


Fig. 36
Relação entre a condutância foliar (g) e a concentração de ácido abscísico (ABA) nos exsudados foliares de plantas de *Lupinus albus* L. em frutificação.

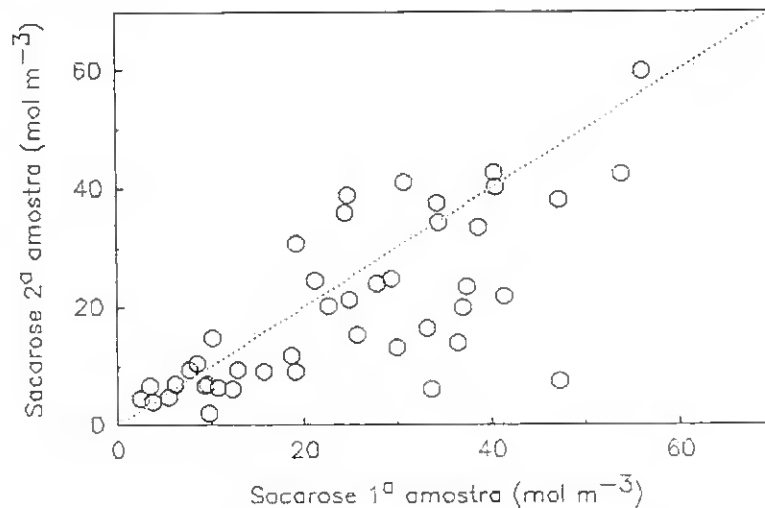


Fig. 37
Concentração de sacarose nos dois exsudados colhidos de folhas de *Lupinus albus* L. em frutificação: o 1º exsudado foi recolhido aplicando uma sobrepressão de 0,25 MPa, tendo o 2º exsudado sido recolhido, da mesma folha, após aumentar a pressão na câmara 0,25 MPa acima da anterior.

A concentração de ácido abscísico determinada nos exsudados foliares de plantas de trevoceiro regadas oscilou entre 0,07 e 0,29 mmol m^{-3} , sendo superior a 0,10 mmol m^{-3} em mais de 50% das amostras. Estas concentrações são superiores às determinadas nos exsudados foliares de girassol (quadro V e figura 19), bem como em exsudados radiculares de plantas regadas de *Xanthium strumarium* (Zeevaart & Boyer, 1984), girassol (Schurr *et al.*, 1992) e *Zea mays* (Zhang & Davies, 1990) nos quais a concentração

de ácido abscísico é igual ou inferior a $0,01 \text{ mmol m}^{-3}$.

A possibilidade de contaminação dos exsudados, por floema ou fragmentos celulares, foi testada analisando a concentração de sacarose, frutose e glucose nesses mesmos exsudados. A sacarose era o açúcar mais abundante (mais de 80% do total) e a sua concentração era superior a 20 mol m^{-3} em cerca de 50% das amostras. Como se pode verificar na figura 37, apesar de em algumas folhas a concentração de sacarose decrescer da 1ª para a 2ª amostra, a concentração deste açúcar manteve-se elevada nas segundas amostras recolhidas.

Quadro VII

Análise de covariância das concentrações de ácido abscísico e sacarose determinadas nos exsudados foliares de plantas de *Lupinus albus* L. em frutificação e regadas diariamente ou sujeitas a um período de défice hídrico. Para cada dia são indicados os valores de F referentes à regressão conjunta (F_c), os valores do declive (b) e da intercepção nas ordenadas (Y_i), assim como os valores de F referentes às comparações, entre tratamento e testemunha, tanto do declive como da intercepção nas ordenadas. Quando os valores de F representam uma relação, ou uma diferença, estatisticamente significativa são assinalados com * ($P < 0,05$) ou ** ($P < 0,01$).

Dias	F_c	b [mmol/mol]			Y_i [mmol ABA m^{-3}]		
		regadas	stress	F	regadas	stress	F
30 stress	6,4*	0,005	0,089	12,1**	0,03	1,30	-
50 stress	4,5*	0,009	0,142	6,5*	0,02	2,50	-
10 recuperação	8,0*	0,006	0,022	1,0	0,01	0,48	22,9**
20 recuperação	8,1*	0,005	0,003	0,2	0,04	0,17	6,3*

As concentrações de ácido abscísico e de sacarose nos exsudados foliares estavam positivamente correlacionadas e a análise de covariância indicou que a relação entre aquelas duas variáveis era significativamente diferente nas plantas regadas e nas plantas sujeitas a défice hídrico (quadro VII). Esse facto era também evidente quando a concentração de ácido abscísico era representada em função da concentração de sacarose determinada nos mesmos exsudados, tal como foi exemplificado na figura 7 para o caso das determinações efectuadas no 30 dia de imposição do défice hídrico.

Como se pode verificar no quadro VII, o declive da relação entre as concentrações de ácido abscísico e sacarose era significativamente maior nos exsudados das plantas não regadas do que nos exsudados das plantas testemunha, mas após o alívio do défice hídrico já não se detectaram diferenças quanto ao declive

da relação ABA versus sacarose. Independentemente de variar ou não o declive da relação entre a concentração de ABA e a concentração de sacarose nos exsudados foliares, o valor da intercepção nas ordenadas (estimativa da concentração de ácido abcísico no xilema, na ausência de contaminação de origem floémica - cap III.11) era menor nas plantas testemunha do que nas plantas não regadas assim como naquelas que recuperavam de um período de défice hídrico (quadro VII).

Contrariamente ao verificado relativamente à sacarose, a concentração de ácido abcísico nos exsudados foliares não estava correlacionada com a concentração de hexoses determinada nas mesmas amostras, excepto no 30º dia de desenvolvimento do défice hídrico: só nas amostras colhidas nesse dia a regressão entre as concentrações de ABA e hexoses era estatisticamente significativa ($F=9,2$; $P<0,01$) e o valor da intercepção nas ordenadas da relação determinada nas plantas não regadas ($Y_i=1,16$) era semelhante à intercepção nas ordenadas da relação entre as concentrações de ácido abcísico e sacarose (quadro VII).

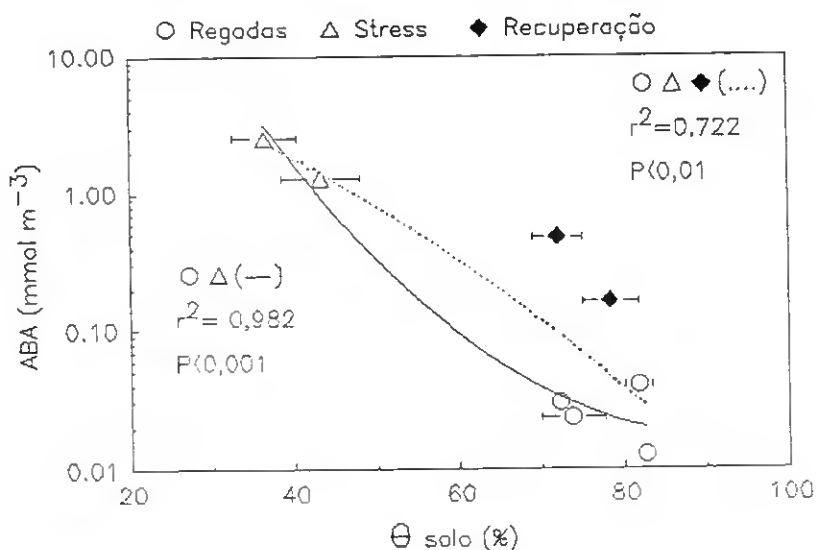


Fig. 38

Relação entre o teor relativo em água do solo (θ solo) e a concentração de ácido abcísico (ABA) no xilema de plantas de *Lupinus albus* L. em frutificação.

A relação entre a concentração xilémica de ácido abcísico (estimada a partir da relação ABA versus sacarose dos exsudados) e o teor relativo em água do solo é apresentada na figura 38. Só cerca de 70 % da variação da concentração de ácido abcísico estava correlacionada com o teor relativo em água do solo. Para além disso, a relação entre estas duas variáveis após o alívio do défice hídrico parecia diferir da verificada durante a imposição

da secura do solo.

Tal como já se tinha verificado relativamente à concentração de ABA determinada nos exsudados foliares (fig. 36), a condutância foliar estava estreitamente correlacionada com o logaritmo da concentração xilémica de ácido abcísico (fig. 39). As variações deste parâmetro permitiam explicar mais de 80% da variação da condutância foliar ($r^2=0,815$) e a relação entre a condutância e a concentração xilémica de ABA era semelhante durante a imposição e o alívio do défice hídrico.

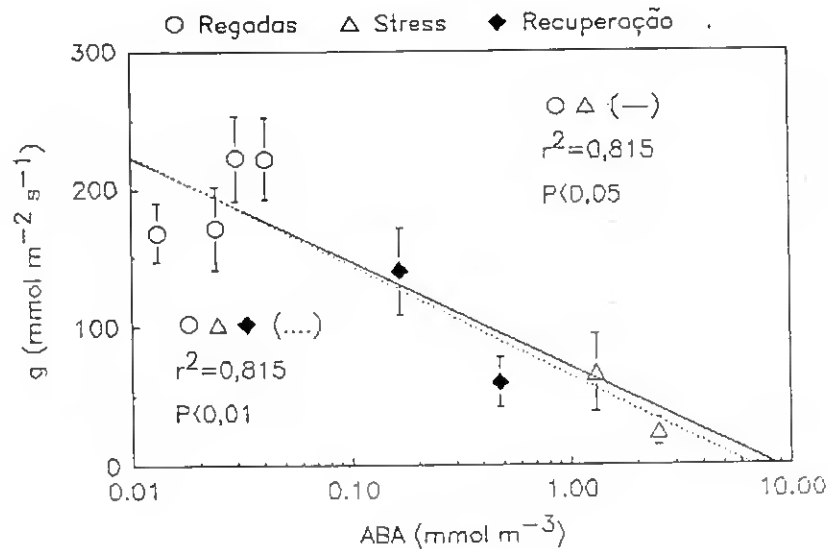


Fig. 39

Relação entre a condutância foliar (g) e a concentração de ácido abcísico (ABA) no xilema de plantas de *Lupinus albus* L. em frutificação.

Em folhas expandidas (10^a abaixo da frutificação) destacadas de plantas regadas, foi determinado o decréscimo da taxa de transpiração resultante da introdução, no fluxo transpiratório, de uma solução contendo 0,5 mmol (+) ABA m⁻³: 4 horas após as folhas serem iluminadas, a taxa de transpiração das folhas a que foi fornecido ABA exógeno correspondia a 75 ± 12% do valor médio determinado nas folhas cujo pecíolo estava imerso em água. Nas folhas em que foram analisados os efeitos do ácido abcísico exógeno sobre a condutância estomática, a aplicação de uma solução com igual concentração daquele composto resultou na diminuição da taxa de transpiração para 68 ± 11% do valor determinado nas folhas destacadas sem fonte exógena de ABA (fig. 23). O facto de a aplicação exógena de ácido abcísico ter induzido um decréscimo da taxa de transpiração da mesma ordem de grandeza nas folhas destacadas dos dois grupos de plantas indica que estas não deverão diferir significativamente quanto à sua

sensibilidade estomática para o ácido abscísico.

A comparação dos resultados do ensaio de aplicação exógena de ABA (fig. 23), com os resultados obtidos no ensaio de imposição de déficit hídrico em plantas intactas (fig. 39) é dificultada pelo facto de a condutância foliar máxima ser diferente nos dois grupos de plantas com que foram realizados os dois ensaios: no ensaio de imposição de déficit hídrico, 3 horas após o nascer do Sol, as plantas testemunha tinham uma condutância foliar (abaxial + adaxial) de $223 \pm 31 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; este valor era significativamente menor do que a condutância das folhas destacadas cujo pecíolo estava imerso em água (fig. 23), bem como das plantas regadas das quais as folhas foram destacadas ($436 \pm 32 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Estas diferenças poderão ter resultado do diferente estado de desenvolvimento das plantas, ou da variação das condições ambientais: recorde-se que as plantas às quais foi imposto o déficit hídrico eram mais velhas do que aquelas das quais se destacaram as folhas para o ensaio de aplicação exógena de ABA; para além disso, o ensaio de imposição de déficit hídrico foi realizado num período em que ocorreram dias bastante quentes e secos, facto que também poderá ter contribuído para a limitação da condutância estomática das plantas.

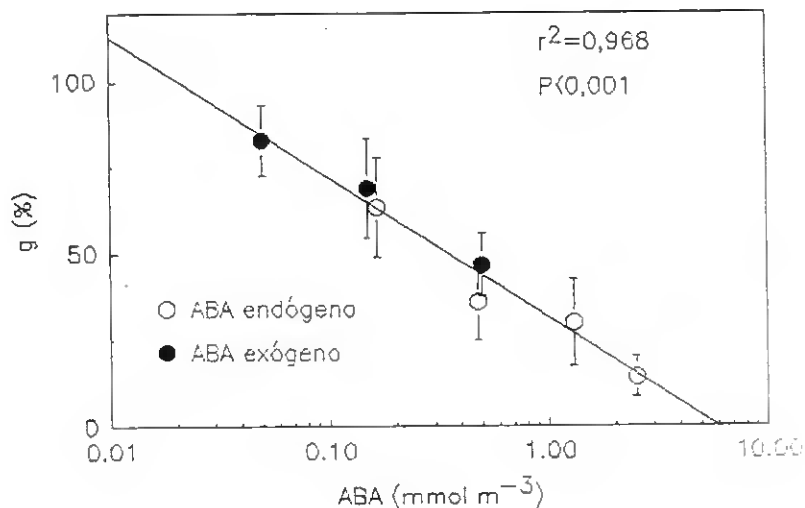


Fig. 40

Relação entre o decréscimo da condutância foliar (g) e a concentração de ácido abscísico (ABA) no fluxo transpiratório de plantas de *Lupinus albus* L. em frutificação. A condutância é expressa em percentagem da condutância foliar média determinada, no mesmo dia e à mesma hora, em folhas de plantas regadas (ABA endógeno), ou em folhas destacadas e com o pecíolo imerso em água (ABA exógeno).

Para possibilitar a comparação da resposta estomática à aplicação exógena de ácido abscísico com a relação entre a condutância e a concentração xilémica de ABA endógeno, a

condutância foliar das plantas sujeitas a défice hídrico foi expressa em percentagem do valor médio determinado, no mesmo dia, nas plantas testemunha; a condutância das folhas destacadas, nas quais se procedeu à aplicação de ABA exógeno, foi expressa em percentagem da condutância média das folhas destacadas cujo pecíolo estava imerso em água. Visto que a condutância foliar das plantas intactas tinha sido determinada 3 horas após o nascer do Sol, a comparação com os resultados do ensaio de aplicação exógena de ABA foi feita considerando os resultados determinados 3 horas após a iluminação das folhas destacadas (fig. 23). Como se pode constatar na figura 40, a correlação entre a condutância foliar e o logaritmo da concentração xilémica de ABA era altamente significativa e as determinações efectuadas em plantas intactas e em folhas destacadas ajustavam-se à mesma recta.

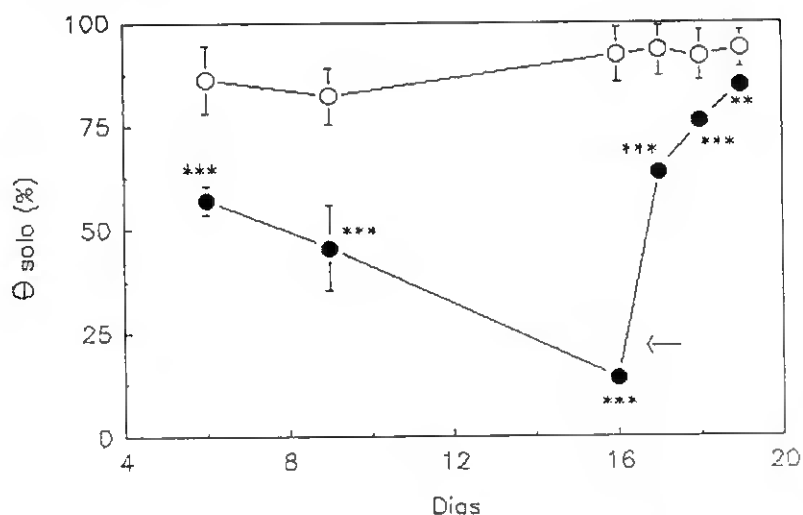


Fig. 41
Variação do teor relativo em água do solo (θ solo) no ensaio com plantas de *Lupinus albus* L. em desenvolvimento vegetativo. Os vasos foram regados diariamente (símbolos abertos, n=4), ou a sua rega foi suspensa na véspera do dia 1 (símbolos a cheio, n=5) e retomada ao fim do dia 16 (seta). A comparação entre as médias de cada dia foi feita pelo teste de Student. As médias do tratamento são assinaladas com *** ou **, consoante $P < 0,001$ ou $P < 0,01$.

4.2.2. Ensaio com plantas em desenvolvimento vegetativo

No decurso deste ensaio a secagem do solo (fig. 41) foi mais lenta do que no ensaio anterior (fig. 24): só ao fim de 9 dias sem rega o teor relativo em água do solo decresceu abaixo dos 50%. Contudo, a suspensão da rega foi mais prolongada (16 dias), pelo que no fim do período de imposição do défice hídrico a desidratação do solo era muito severa, decrescendo o teor relativo em água do solo para $14 \pm 3\%$ (fig. 41). Após o restabelecimento da rega, a re-hidratação do solo foi mais lenta

do que no ensaio anterior, não estando ainda completa no 20 dia de alívio do déficit hídrico (fig. 41).

No 9º dia de imposição do déficit hídrico, apesar de já ser substancial a secagem do solo (fig. 41), era ainda diminuto o decréscimo registado, antes do nascer do Sol, tanto no potencial hídrico como no teor relativo em água das folhas jovens e não eram estatisticamente significativas as diferenças detectadas entre as folhas adultas das plantas testemunha e das plantas não regadas (fig. 42). Contudo, uma semana depois, no último dia de imposição do déficit hídrico, o potencial hídrico determinado antes do nascer do Sol nas plantas não regadas era inferior ao das plantas regadas em cerca de 0,52 e 0,61 MPa, respectivamente, nas folhas jovens e nas folhas adultas. Também o teor relativo em água decresceu significativamente, atingindo $80,8 \pm 3,8 \%$ nas folhas jovens e $85,5 \pm 2,6 \%$ nas folhas adultas.

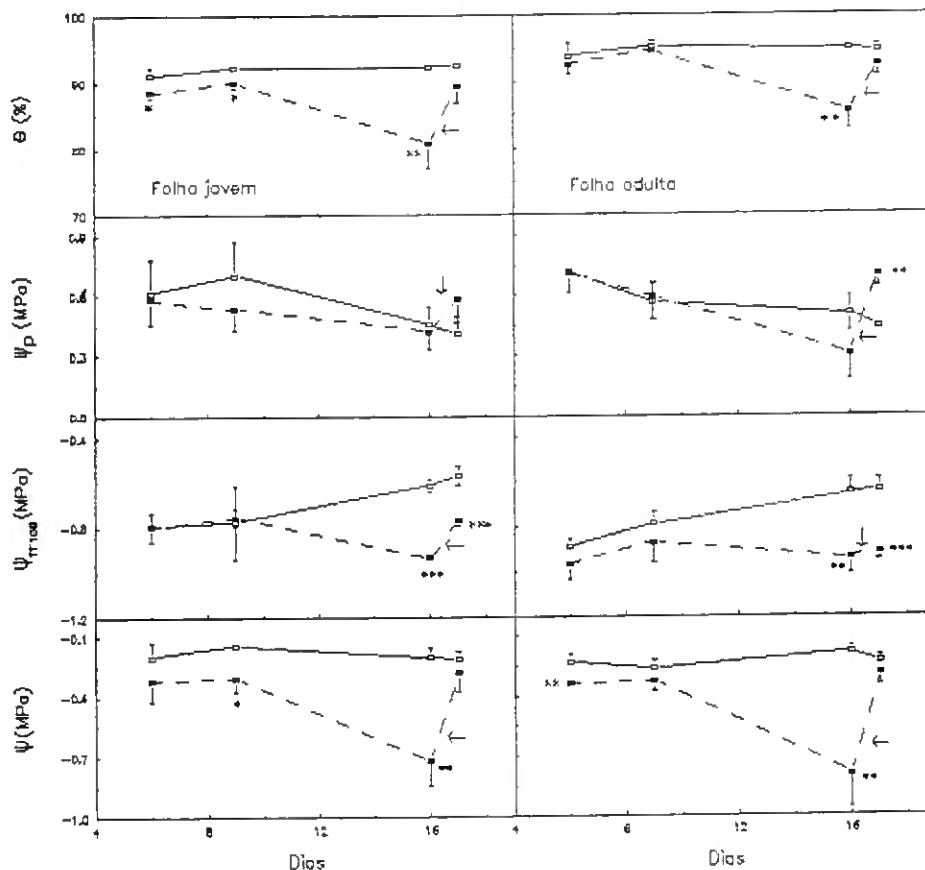


Fig. 42

Variação do teor relativo em água (θ), potencial de pressão (Ψ_p), potencial osmótico no estado de máxima hidratação ($\Psi_{\pi 100}$) e potencial hídrico (Ψ) determinados, antes do nascer do Sol, em folhas em expansão (jovens) e expandidas (adultas) de plantas de *Lupinus albus* L. em desenvolvimento vegetativo. As plantas foram regadas diariamente (símbolos abertos, n=3) ou a sua rega foi suspensa na véspera do dia 1 (símbolos a cheio, n=4) e retomada ao fim do dia 16 (seta). As médias do tratamento significativamente diferentes (teste de Student) da média das plantas testemunha, no mesmo dia, são assinaladas com * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) ou *** ($P < 0,001$).

O decréscimo do potencial hídrico foi parcialmente compensado pela redução, em cerca de 0,3 MPa, do potencial osmótico no estado de máxima hidratação, pelo que a diminuição do potencial de pressão foliar nas plantas não regadas foi menos acentuada do que a redução do potencial hídrico foliar (fig. 42). O decréscimo do potencial osmótico no estado de máxima hidratação nas plantas sujeitas a déficit hídrico estava associado não só à diminuição da razão entre a massa foliar túrgida e a massa foliar seca, como ao aumento do número de osmoles de solutos por unidade de massa foliar, aumento este que foi mais acentuado nas folhas adultas do que nas folhas jovens (fig. 43).

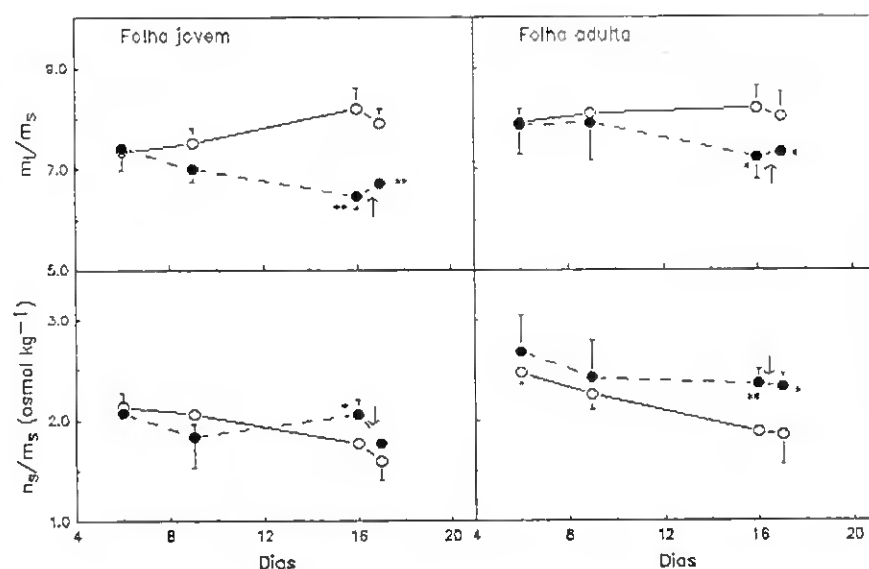


Fig. 43 Concentração de solutos por unidade de massa foliar seca (n_s/m_s) e razão entre a massa foliar túrgida e a massa foliar seca (m_t/m_s) determinadas, antes do nascer do Sol, em folhas em expansão (jovens) e expandidas (adultas) de plantas de *Lupinus albus* L. em desenvolvimento vegetativo. As plantas eram regadas diariamente (símbolos abertos, $n=3$) ou a sua rega foi suspensa na véspera do dia 1 (símbolos a cheio, $n=4$) e retomada ao fim do dia 16 [seta]. As médias do tratamento significativamente diferentes (teste de Student) da média das plantas testemunha, no mesmo dia, são assinaladas com * [$P<0,05$] ou ** [$P<0,01$].

No dia imediatamente a seguir ao restabelecimento da rega, apesar da re-hidratação do solo ter sido parcial (fig. 41), não se detectaram, antes do nascer do Sol, diferenças significativas, quer no potencial hídrico como no teor relativo em água foliar, entre as plantas regadas e aquelas que tinham sido previamente sujeitas a déficit hídrico (fig. 42). Em virtude de nas folhas destas últimas ter ocorrido ajustamento osmótico, o seu potencial de pressão era superior ao das folhas das plantas regadas diariamente (fig. 42).

O efeito da desidratação do solo sobre as relações hídricas

foliares, determinadas durante o dia, foi muito semelhante nos dois tipos de folhas estudadas (fig. 44). No 6º dia de secagem do solo não se detectaram quaisquer diferenças de Ψ entre plantas testemunha e plantas não regadas. O potencial hídrico destas últimas só decresceu durante o 9º dia de secagem do solo (fig. 44). Este decréscimo foi significativo mesmo nas folhas adultas, cujas relações hídricas determinadas antes do nascer do Sol não tinham ainda diferido das folhas das plantas regadas (fig. 42). No fim do período de secagem do solo, a diferença de Ψ , entre plantas regadas e não regadas, era de cerca de 0,8 MPa (fig. 44). Apesar desta diferença ser superior à registada no anterior ensaio de imposição de secura (fig. 28), o potencial hídrico mínimo atingido pelas folhas das plantas não regadas foi semelhante em ambos os ensaios. A maior amplitude das diferenças de Ψ resultou de, no último ensaio, as plantas regadas terem potenciais hídricos foliares superiores aos determinados no ensaio do ano anterior.

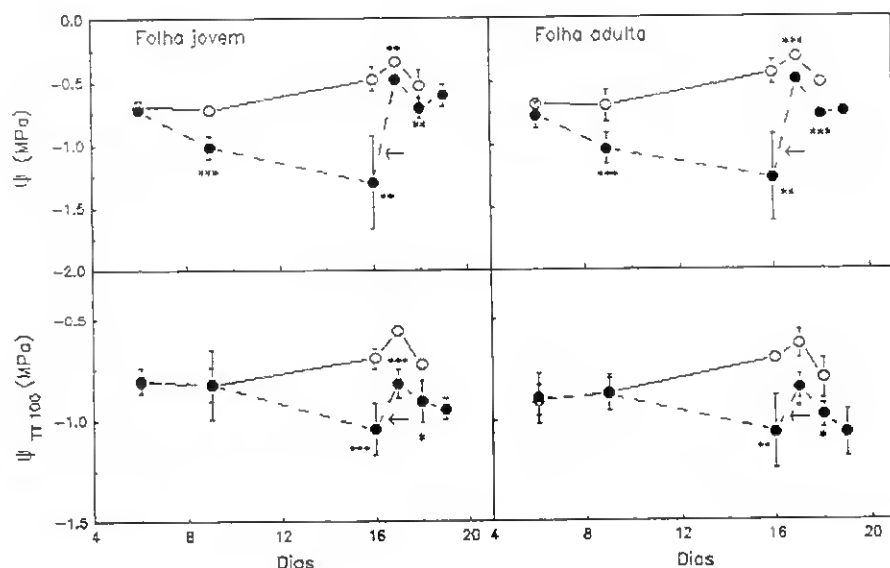


Fig. 44

Potencial osmótico no estado de máxima hidratação ($\Psi_{\pi 100}$) e potencial hídrico foliar (Ψ) determinados, durante o dia, em plantas de *Lupinus albus* L. em desenvolvimento vegetativo. As plantas foram regadas diariamente [símbolos abertos, n=4-6] ou a sua rega foi suspensa na véspera do dia 1 [símbolos a cheio, n=5-8] e retomada ao fim do dia 16 [seta]. A comparação entre as médias de cada dia foi feita pelo teste de Student e as médias do tratamento significativamente diferentes da média das plantas regadas são assinaladas com * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) ou *** ($P < 0,001$).

A determinação, durante o dia, do potencial osmótico no estado de máxima hidratação (fig. 44) confirmou a ocorrência de ajustamento osmótico nas folhas das plantas não regadas (cerca de 0,3 MPa). O referido decréscimo do potencial osmótico no estado

de máxima hidratação estava associado não só à diminuição da razão entre massa foliar túrgida e a massa foliar seca, como à acumulação efectiva de solutos (fig. 45), tal como já se tinha verificado antes do nascer do Sol (fig. 42 e 43).

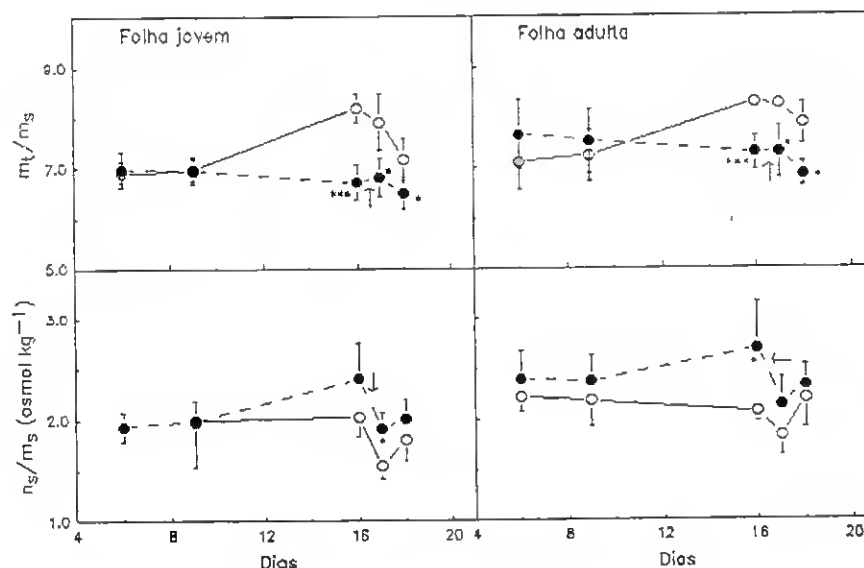


Fig. 45

Concentração de solutos por unidade de massa foliar seca (n_s/m_s) e razão entre a massa foliar túrgida e a massa foliar seca (m_t/m_s) determinadas, durante o dia, em folhas jovens e adultas de plantas de *Lupinus albus* L. em desenvolvimento vegetativo. As plantas foram regadas diariamente (símbolos abertos, $n=4-6$) ou a sua rega foi suspensa na véspera do dia 1 (símbolos a cheio, $n=5-8$) e retomada ao fim do dia 16 (seta). As médias do tratamento significativamente diferentes (teste de Student) da média das plantas regadas, determinada no mesmo dia, são assinaladas com * ($P<0,05$) ou *** ($P<0,001$).

No dia a seguir ao restabelecimento da rega, as plantas previamente sujeitas a défice hídrico não diferiam das plantas testemunha quanto ao potencial hídrico e teor relativo em água foliar determinados antes do nascer do Sol (fig. 42), bem como quanto ao teor relativo em água foliar determinado à tarde (fig. 46). Contudo, durante o dia, as plantas que recuperavam dos efeitos do défice hídrico tinham potenciais hídricos foliares inferiores aos das plantas regadas diariamente (fig. 44), contrariamente ao verificado no ensaio anterior (fig. 28). Quanto ao potencial osmótico no estado de máxima hidratação, apesar das diferenças entre os dois grupos de plantas se reduzirem após o alívio do défice hídrico, 2 dias após o restabelecimento da rega ainda persistiam as diferenças de ajustamento osmótico entre as plantas testemunha e aquelas que tinham sido previamente sujeitas a défice hídrico (fig. 44). Nesse mesmo dia ainda se detectaram diferenças de potencial hídrico foliar entre as plantas testemunha e as plantas que recuperavam dos efeitos da secura do

solo. Contudo, a diferença de Ψ entre os dois grupos de plantas era de somente 0,15 MPa, ou seja, era inferior à diferença de potencial osmótico no estado de máxima hidratação entre essas mesmas plantas: 0,21 MPa e 0,27 MPa, respectivamente, nas folhas adultas e nas folhas jovens (fig. 44). Assim, a redução do potencial osmótico deverá ter sido suficiente para compensar o decréscimo do potencial hídrico, pelo que deste não deverá ter resultado diminuição significativa do potencial de pressão.

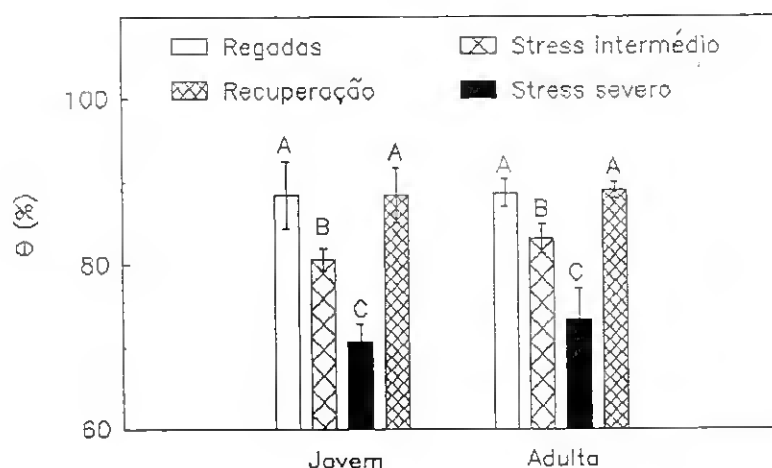


Fig. 46

Teor relativo em água (θ) determinado, 8 horas após o nascer do Sol, em folhas em expansão (jovens) e expandidas (adultas) de plantas de *Lupinus albus* L. em desenvolvimento vegetativo. As plantas foram regadas diariamente, sujeitas a stress hídrico intermédio (9 dias sem rega) ou severo (16 dias sem rega) e no 19 dia de alívio do défice hídrico após 16 dias sem rega (recuperação). Os valores apresentados representam médias de 4 determinações, excepto no caso das plantas regadas diariamente em que $n=8$. As médias significativamente diferentes entre si (teste SNK; $P<0,05$) são assinaladas com maiúsculas diferentes.

Contrariamente ao verificado no ensaio anterior (fig. 29), a secagem do solo afectou diferencialmente a condutância das duas superfícies foliares das plantas em desenvolvimento vegetativo: tanto durante a desidratação do solo como após o alívio do défice hídrico, a diminuição da abertura estomática foi mais acentuada na página abaxial do que na página adaxial (fig. 47).

No 60 dia de secagem do solo, apesar de ainda não se registarem diferenças de potencial hídrico durante o dia (fig. 44), a condutância abaxial das plantas não regadas era inferior à das plantas regadas, tanto nas folhas jovens como nas folhas adultas (fig. 47). Contudo, contrariamente ao que se tinha verificado no ensaio anterior (fig. 27), o comportamento estomático dos dois tipos de folhas diferiu em alguns dias (fig. 47): na manhã do 90 dia de imposição do défice hídrico, por exemplo, a condutância adaxial das plantas não regadas só era significativamente inferior à das plantas regadas no caso das

folhas mais jovens; por outro lado, a reabertura dos estomas, após a reposição da rega, foi mais lenta nas folhas jovens do que nas adultas, apesar dos dois tipos de folhas não diferirem quanto à rapidez de recuperação das relações hídricas (fig. 42, 44, 46).

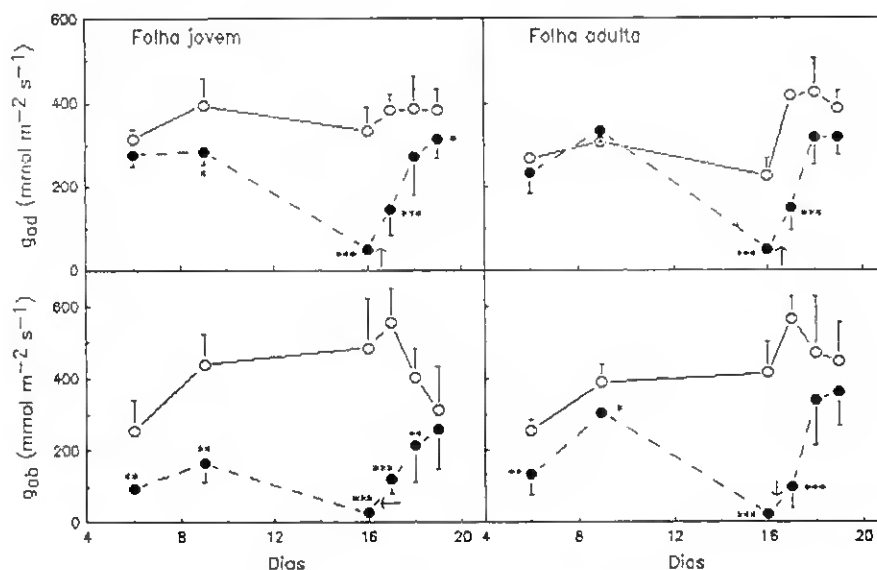


Fig. 47

Varição da condutância abaxial (g_{ab}) e adaxial (g_{ad}) em folhas em expansão (jovens) e expandidas (adultas) de plantas de *Lupinus albus* em desenvolvimento vegetativo. As plantas foram regadas diariamente (símbolos abertos) ou a sua rega foi suspensa na véspera do dia 1 (símbolos a cheio) e retomada ao fim do dia 16 (seta). Cada ponto corresponde à média de 4-5 determinações. As médias do tratamento significativamente diferentes (teste de Student) da média determinada, no mesmo dia, nas plantas testemunha são assinaladas com * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) ou *** ($P < 0,001$).

Quando se consideravam conjuntamente as determinações efectuadas em folhas jovens e adultas, cerca de 70% das diferenças de condutância foliar, entre as plantas testemunha e as plantas não regadas, estavam associadas à variação do potencial hídrico foliar, quer este fosse determinado antes do nascer do Sol (fig. 48) ou durante o dia (fig. 49). Contudo, quando se consideravam as determinações efectuadas nas plantas que recuperavam dos efeitos da deficiência hídrica, o coeficiente de correlação decrescia substancialmente. Este decréscimo era mais significativo no caso da relação entre a condutância foliar e o potencial hídrico determinado durante o dia: este parâmetro só permitia explicar cerca de 40% da variação da condutância, quer se considerasse a condutância total da folha (fig. 49) ou a condutância de cada uma das superfícies foliares (quadro VIII). Uma maior fracção da variação observada na condutância foliar encontrava-se correlacionada com as relações hídricas foliares determinadas antes do nascer do Sol: 50% e 60%,

respectivamente, no caso do teor relativo em água e do potencial hídrico foliar (fig. 48 e quadro VIII).

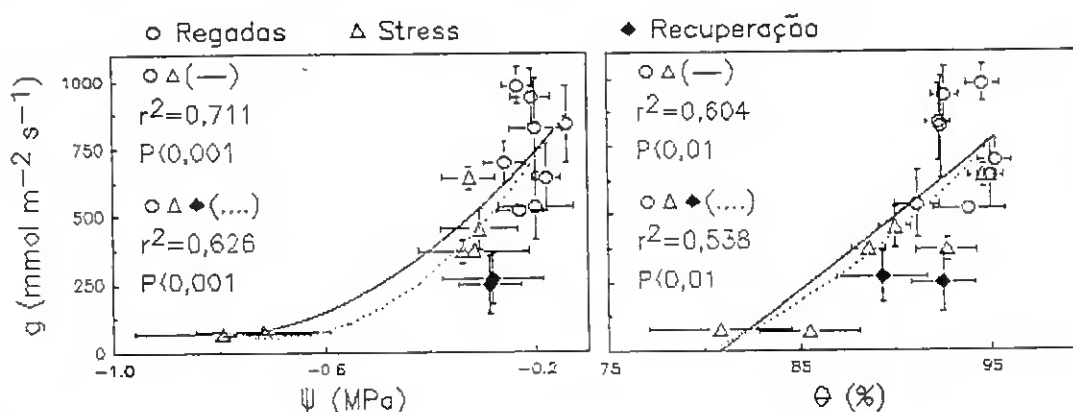


Fig. 48
Relação entre o teor relativo em água (θ) e o potencial hídrico foliar (Ψ), determinados antes do nascer do Sol e a condutância foliar (abaxial + adaxial) de plantas de *Lupinus albus* L. em desenvolvimento vegetativo.

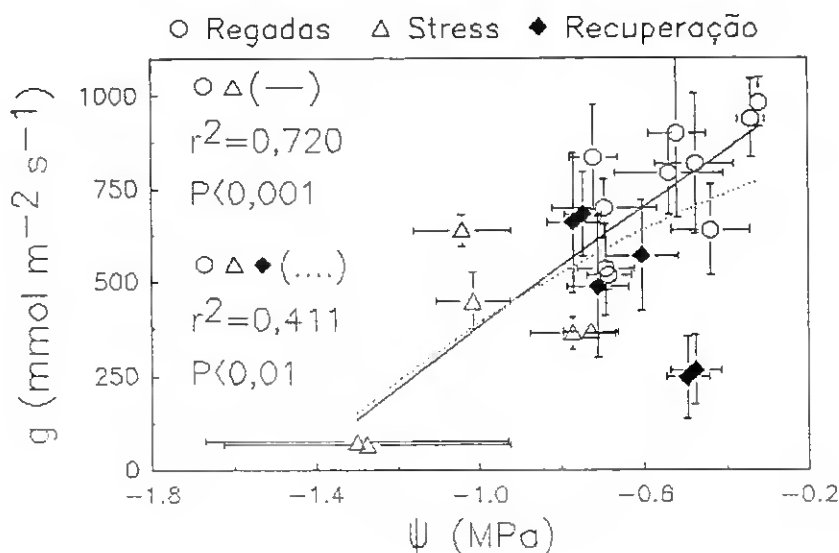


Fig. 49
Relação entre a condutância foliar (abaxial + adaxial) e o potencial hídrico determinado durante o dia (Ψ) em folhas de plantas de *Lupinus albus* L. em desenvolvimento vegetativo.

Quando se consideram isoladamente as determinações efectuadas nas folhas jovens e nas folhas adultas, verificou-se também que a condutância foliar se correlacionava mais estreitamente com as relações hídricas foliares determinadas antes do nascer do Sol e com o teor relativo em água do solo (fig. 50 e quadro IX) do que com o potencial hídrico foliar determinado durante o dia (quadro IX).

Tal como se tinha verificado no ensaio realizado no ano anterior, a concentração de açúcares nos exsudados foliares era muito elevada, sendo a sacarose o açúcar mais abundante: $88 \pm 8\%$

Quadro VIII

Correlação da condutância (g) das duas superfícies foliares de *Lupinus albus* L. com o potencial hídrico foliar determinado durante o dia (Ψ dia) ou antes do nascer do Sol (Ψ madrugada) e o teor relativo em água determinado antes do nascer do Sol (θ madrugada). A equação a que melhor se ajusta a relação entre aquelas variáveis é de 2ª ordem. São indicados os grau de liberdade (g.l.), os quadrados dos coeficientes de correlação (r^2) e respectivos níveis de significância: ** - $P < 0,01$ e *** - $P < 0,001$.

	g vs Ψ dia		g vs Ψ madrugada		g vs θ madrugada	
	g.l.	r^2	g.l.	r^2	g.l.	r^2
Abaxial	20	0,426***	14	0,590**	14	0,516**
Adaxial	20	0,399**	14	0,607***	14	0,514**

Quadro IX

Correlação dos valores médios da condutância (g) abaxial, adaxial e total (abaxial + adaxial) de *Lupinus albus* L. com o potencial hídrico foliar determinado durante o dia (Ψ dia) ou antes do nascer do Sol (Ψ madrugada), o teor relativo em água das folhas determinado antes do nascer do Sol (θ madrugada) e o teor relativo em água do solo (θ solo). A equação a que melhor se ajusta a relação entre estes parâmetros é de segunda ordem. São indicados os graus de liberdade (g.l.), os valores dos quadrados dos coeficientes de correlação, assim como o respectivo nível de significância (n.s. - $P > 0,05$, * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$ e *** - $P < 0,001$).

	Folha jovem			Folha adulta		
	Abaxial	Adaxial	Total	Abaxial	Adaxial	Total
g vs Ψ dia (g.l.=9)	0,484*	0,372*	0,470*	0,398*	0,311 ^{n.s.}	0,362 ^{n.s.}
g vs θ madrugada (g.l.=6)	0,918***	0,826**	0,954***	0,799**	0,694*	0,786**
g vs Ψ madrugada (g.l.=6)	0,702**	0,790**	0,759**	0,560*	0,510*	0,518*
g vs θ solo (g.l.=10)	0,736***	0,719***	0,766***	0,711***	0,529**	0,653**

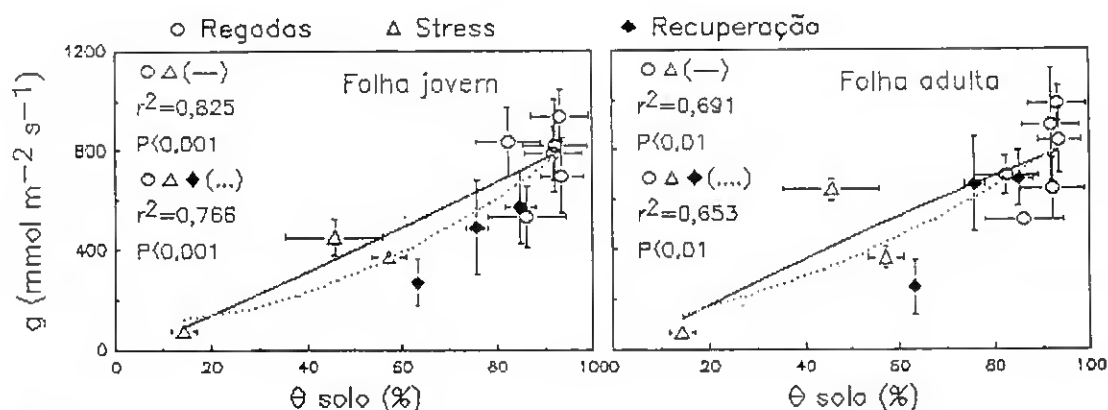


Fig. 50

Relação entre o teor relativo em água do solo (θ solo) e a condutância foliar (abaxial + adaxial) de plantas de *Lupinus albus* L. em desenvolvimento vegetativo.

do total. Assim, a concentração de ABA no xilema foi estimada como sendo o valor da intercepção nas ordenadas da relação entre a concentração deste regulador de crescimento e a concentração de sacarose determinada nas mesmas amostras (fig. 51). A análise de covariância das concentrações de ácido abscísico e sacarose nos exsudados foliares indicou que a relação entre aquelas duas variáveis era igual nas folhas jovens e adultas das plantas regadas. No entanto, no 9º dia de imposição do déficit hídrico o valor da intercepção nas ordenadas diferia entre as folhas jovens e as folhas adultas das plantas não regadas (quadro X). Para além disso, as diferenças entre tratamentos na relação ABA vs sacarose eram estatisticamente significativas, tanto nas folhas jovens como nas folhas adultas (quadro XI).

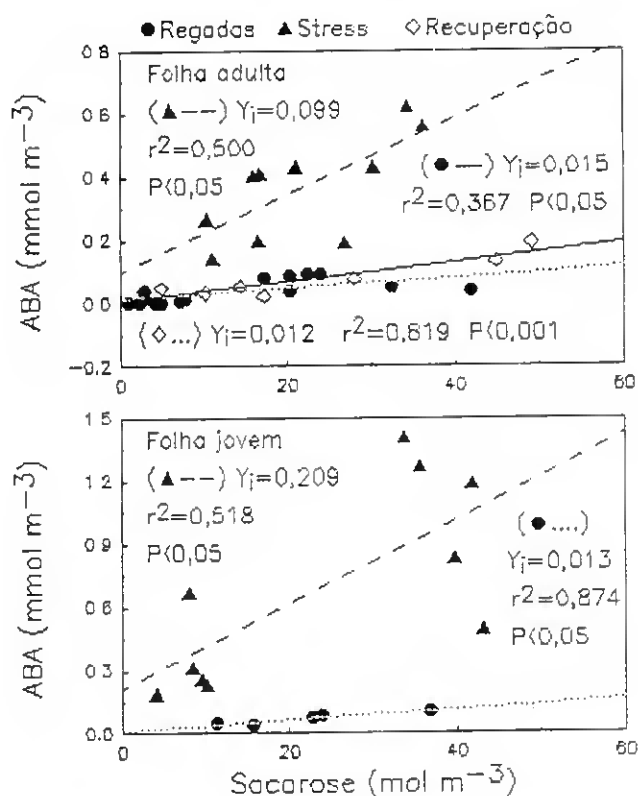


Fig. 51

Relação entre as concentrações de ácido abscísico (ABA) e sacarose nos exsudados foliares de plantas de *Lupinus albus* L. em desenvolvimento vegetativo. Os exsudados foram colhidos de plantas regadas diariamente, no 9º dia de imposição do déficit hídrico (stress) ou no dia imediatamente a seguir ao restabelecimento da rega, após esta ter sido suspensa durante 16 dias (recuperação). São indicados os quadrados dos coeficientes de correlação (r^2) assim como o valor da intercepção nas ordenadas (Y_i), estimativa da concentração de ácido abscísico no xilema.

No 9º dia de imposição do déficit hídrico a concentração de ABA no xilema das plantas não regadas era superior à das plantas regadas e esta diferença era maior nas folhas jovens do que nas folhas adultas (fig. 51). A maior acumulação de ABA nas folhas

jovens estava associada a uma depressão da condutância mais acentuada nestas folhas do que nas folhas adultas (fig. 47).

Contrariamente ao verificado no ensaio anterior (quadro VII), o atraso na reabertura dos estomas após o alívio do déficit hídrico (fig. 47) não estava associado à persistência de níveis elevados de ácido abscísico no xilema, pelo menos no caso das folhas adultas: no dia imediatamente a seguir ao restabelecimento da rega, a concentração de ABA no xilema das folhas adultas era semelhante nas plantas regadas diariamente e naquelas que tinham sido previamente sujeitas a déficit hídrico (fig. 51).

Quadro X

Análise de covariância das concentrações de ácido abscísico e sacarose nos exsudados de folhas em expansão e de folhas expandidas de plantas de *Lupinus albus* L., em desenvolvimento vegetativo. Os exsudados foram recolhidos de plantas regadas diariamente ou após 9 dias sem rega (stress). Para cada um dos grupos de plantas são indicados os valores de F referentes à regressão conjunta (F_c), o número de pontos da regressão conjunta (n) e os valores de F referentes às comparações, entre idades, tanto do declive (F_b) como da intercepção nas ordenadas (F_y). Quando os valores de F representam uma relação, ou uma diferença, estatisticamente significativa são assinalados com * ($P < 0,05$) ou ** ($P < 0,01$).

	n	F_c	F_b	F_y
Regadas	20	12,6**	0,3 ^{n.s.}	1,3 ^{n.s.}
Stress	20	16,9**	0,6 ^{n.s.}	6,6*

Quadro XI

Análise de covariância das concentrações de ácido abscísico e sacarose nos exsudados de folhas em expansão (jovens) e folhas expandidas (adultas) de plantas de *Lupinus albus* L., em desenvolvimento vegetativo, regadas diariamente ou sujeitas a déficit hídrico. Para cada um dos tipos de folhas são indicados os valores de F referentes à regressão conjunta considerando os vários tratamentos (F_c), o número de tratamento comparados (k), o número de pontos da regressão conjunta (n), assim como os valores de F referentes às comparações, entre tratamentos, tanto do declive (F_b) como da intercepção nas ordenadas (F_y). Quando os valores de F representam uma relação, ou uma diferença, estatisticamente significativa são assinalados com * ($P < 0,05$) ou ** ($P < 0,01$).

Folha	k	n	F_c	F_b	F_y
Jovem	2	15	10,5**	1,2 ^{n.s.}	13,4**
Adulta	3	33	27,1**	7,0*	-

A resposta estomática à aplicação de ABA exógeno foi estudada em folhas destacadas de plantas regadas e de plantas sujeitas a déficit hídrico. Nestas últimas foi também analisado o efeito da aplicação de benziladenina. A condutância das folhas destacadas, tanto de plantas regadas como de plantas sujeitas a

Na figura 53 são apresentados os resultados obtidos no ensaio de aplicação exógena de ABA a folhas destacadas de plantas regadas. Tal como se tinha verificado em resposta à imposição de

Fig. 53
 Condutância (g) de folhas destacadas de plantas regadas de *Lupinus albus* L. em desenvolvimento vegetativo, cujo pecíolo se encontrava imerso em água ou em soluções de ácido abscísico. Os valores apresentados correspondem à média de 8-11 folhas (em expansão e expandidas). A condutância foi determinada 2 horas e 30 minutos após as folhas serem iluminadas. Em ambas as superfícies foliares, a comparação entre as médias foi feita pelo teste SNK, sendo as médias dos tratamentos significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$) assinaladas com maiúsculas diferentes.

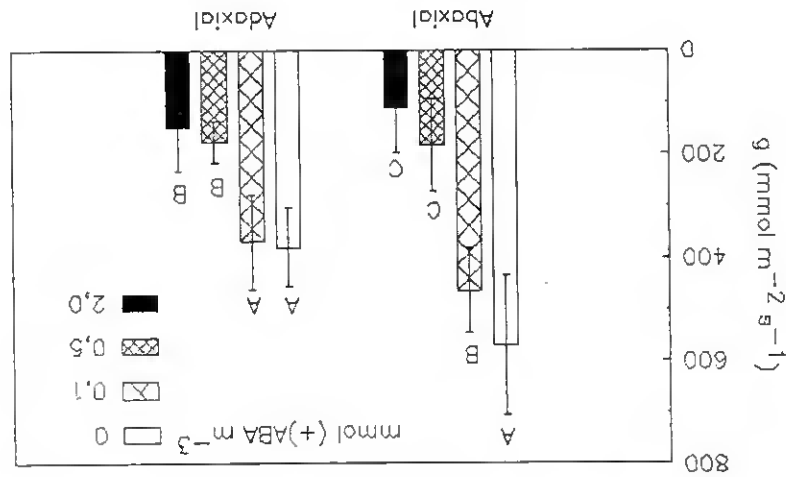
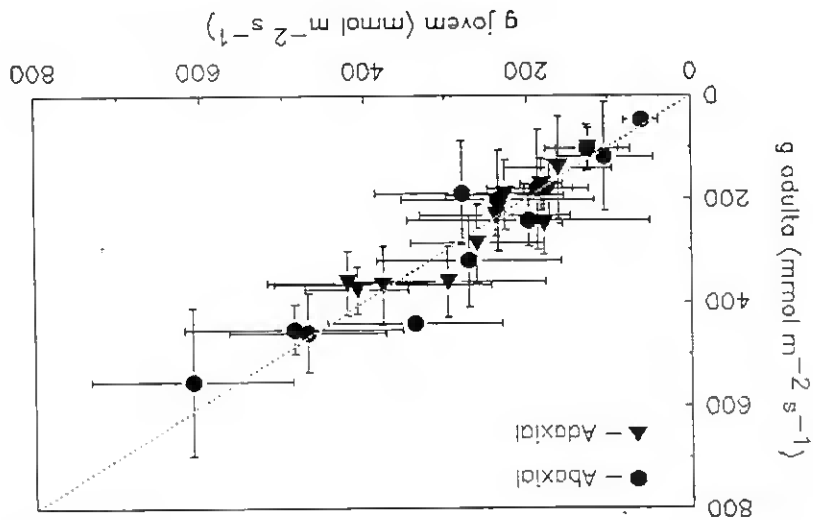


Fig. 52
 Relação entre a condutância (g) de folhas em expansão (jovens) e de folhas expandidas (adultas), destacadas de plantas de *Lupinus albus* L. em desenvolvimento vegetativo. As folhas foram destacadas de plantas regadas ou sujeitas a déficit hídrico e o seu pecíolo estava imerso em água, soluções de ácido abscísico ou soluções de benziladenina.



destacadas serão analisados conjuntamente. doraante os resultados obtidos em folhas adultas e folhas jovens, déficit hídrico, não variou com a idade foliar (fig. 52). Assim,

défice hídrico (fig. 47), a limitação da abertura estomática em resposta à aplicação de ABA exógeno foi mais acentuada na página abaxial do que na página adaxial: a introdução de $0,1 \text{ mmol (+) ABA m}^{-3}$ no fluxo transpiratório, por exemplo, inibiu a abertura dos estomas da página abaxial, mas não afectou a condutância adaxial (fig. 53).

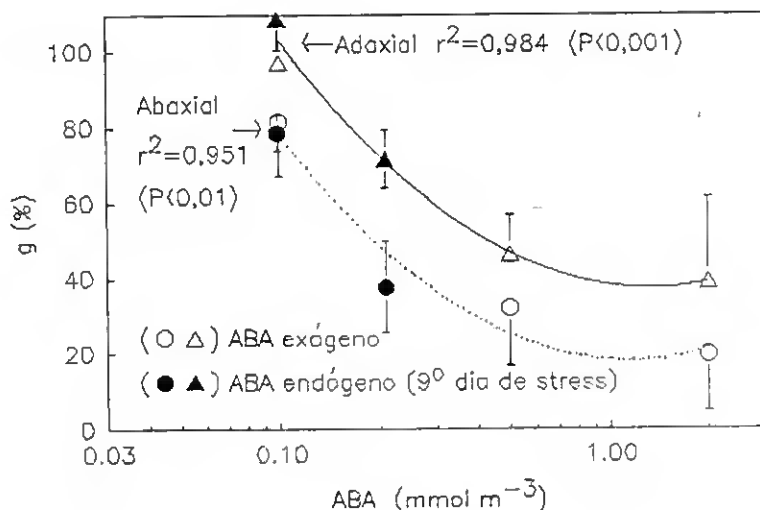


Fig. 54

Relação entre a concentração de ABA no fluxo transpiratório e o decréscimo da condutância foliar (g) de plantas de *Lupinus albus* L. em desenvolvimento vegetativo. A condutância é expressa em percentagem da condutância foliar média determinada, no mesmo dia e à mesma hora, em folhas de plantas regadas (ABA endógeno), ou em folhas destacadas de plantas regadas, cujo pecíolo se encontrava imerso em água (ABA exógeno).

Quando a condutância foliar era expressa em valor percentual da testemunha (folhas destacadas com o pecíolo imerso em água, ou folhas de plantas regadas) e representada em função da concentração de ácido abscísico no fluxo transpiratório, verificou-se que os pontos referentes às determinações efectuadas nas plantas sujeitas a 9 dias de secagem do solo se ajustavam à mesma curva que os pontos referentes às determinações efectuadas no ensaio de aplicação exógena de ABA a folhas destacadas de plantas regadas (fig. 54).

No 7º e 13º dias de imposição do défice hídrico, foi analisada a capacidade do destacamento foliar e imersão do pecíolo em água reverter a inibição da abertura estomática detectada em plantas intactas. Nas plantas sujeitas a défice hídrico severo (13 dias sem rega), o destacamento foliar e imersão do pecíolo em água resultou num acentuado aumento da condutância foliar: a condutância média da superfície abaxial era cerca de 16 vezes maior do que a determinada em folhas não

destacadas, enquanto que a condutância adaxial duplicava (quadro XII). Contudo, a reabertura dos estomas nas folhas destacadas de plantas sujeitas a déficit hídrico severo não foi suficiente para anular as diferenças de condutância entre estas plantas e as plantas testemunha: mesmo com o pecíolo imerso em água, a condutância (abaxial + adaxial) das folhas das plantas sujeitas a déficit hídrico severo correspondia a menos de 50% da condutância das folhas destacadas de plantas regadas (quadro XII). No caso das plantas sujeitas a déficit hídrico moderado (7 dias sem rega), a condutância abaxial das folhas destacadas e com o pecíolo imerso em água aumentou em cerca de 2,5 vezes relativamente às folhas não destacadas. Daí resultou a diminuição das diferenças de condutância entre as folhas das plantas regadas e das plantas sujeitas a déficit hídrico moderado: a condutância foliar total destas últimas correspondia a cerca de 90% da condutância das folhas destacadas de plantas regadas, não sendo a diferença estatisticamente significativa (quadro XII).

Quadro XII

Condutância foliar (em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) determinada em plantas intactas de *Lupinus albus* L. na fase de desenvolvimento vegetativo e em folhas destacadas das mesmas plantas. As folhas destacadas tinham o pecíolo imerso em água (H_2O) ou numa solução contendo 2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ABA m^{-3} (+ABA). As determinações de condutância foram efectuadas 3 horas após o nascer do Sol (plantas intactas) ou 2 horas após as folhas serem iluminadas (folhas destacadas). São apresentadas médias \pm desvio padrão de 8-10 folhas (jovens e adultas), no caso das plantas não regadas, enquanto que no caso das plantas regadas $n=18$, excepto nas folhas com o pecíolo imerso em água em que $n=13$. A comparação entre tratamentos foi feita pelo teste SNK, excepto no caso da condutância abaxial das plantas intactas e das folhas destacadas, com o pecíolo imerso em água, em que se utilizou o teste de Games & Howell. As médias significativamente diferentes entre si ($P<0,05$) são assinaladas com maiúsculas diferentes em superscripto.

Dias sem rega	Plantas intactas			H_2O			+ABA		
	Abaxial	Adaxial	Total	Abaxial	Adaxial	Total	Abaxial	Adaxial	Total
0	400 \pm 87 ^A	369 \pm 67 ^A	770 \pm 126 ^A	571 \pm 135 ^A	382 \pm 76 ^A	953 \pm 172 ^A	113 \pm 86 ^A	150 \pm 85 ^A	263 \pm 159 ^A
7	182 \pm 104 ^B	362 \pm 33 ^A	544 \pm 131 ^B	465 \pm 82 ^B	394 \pm 54 ^A	858 \pm 118 ^A	114 \pm 42 ^A	178 \pm 42 ^A	292 \pm 73 ^A
13	14 \pm 2 ^C	102 \pm 51 ^B	116 \pm 54 ^C	235 \pm 109 ^C	210 \pm 69 ^B	445 \pm 157 ^B	53 \pm 18 ^B	113 \pm 44 ^A	166 \pm 57 ^A

Nas folhas destacadas cujo pecíolo estava imerso numa solução de ABA não se detectaram diferenças significativas de condutância adaxial entre tratamentos, mas a limitação da condutância abaxial persistiu nas folhas destacadas de plantas sujeitas a stress hídrico severo (quadro XII). Contudo, em termos relativos, o ácido abscísico induziu um decréscimo da condutância abaxial da mesma ordem de grandeza nas folhas destacadas de

plantas regadas e de plantas sujeitas a déficit hídrico: em ambos os casos a condutância abaxial das folhas com o pecíolo imerso numa solução de ABA correspondia a cerca de 20% da condutância das folhas, do mesmo tratamento, cujo pecíolo estava imerso em água.

Quadro XIII

Condutância foliar (em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de plantas intactas de *Lupinus albus* L. na fase de desenvolvimento vegetativo e de folhas destacadas de plantas regadas diariamente, após 14 dias sem rega (stress) ou no dia imediatamente a seguir ao restabelecimento da rega após esta ter sido suspensa durante 13 dias (recup.). As folhas destacadas tinham o pecíolo imerso em água (H_2O) ou numa solução contendo $10 \mu\text{mol m}^{-3}$ de benziladenina (+BA). As determinações nas plantas intactas foram efectuadas 3 horas após o nascer do Sol e a condutância das folhas destacadas foi determinada 4 horas após as folhas serem iluminadas. Os valores apresentados representam a média \pm desvio padrão de 7 folhas (jovens e adultas), excepto nas folhas destacadas de plantas regadas em que $n=5$. A comparação entre tratamentos foi feita pelo teste SNK (folhas destacadas) ou teste de Games & Howell (plantas intactas). As médias significativamente diferentes entre si ($P<0,05$) são assinaladas com maiúsculas diferentes em superscripto.

	Plantas intactas			H_2O			+BA		
	Abaxial	Adaxial	Total	Abaxial	Adaxial	Total	Abaxial	Adaxial	Total
Regadas	465 \pm 83 ^A	443 \pm 94 ^A	907 \pm 123 ^A	699 \pm 173 ^A	526 \pm 144 ^A	1225 \pm 288 ^A	674 \pm 116 ^A	383 \pm 66 ^A	1057 \pm 154 ^A
Stress	18 \pm 4 ^B	94 \pm 30 ^B	111 \pm 32 ^B	217 \pm 99 ^B	241 \pm 66 ^B	458 \pm 144 ^B	223 \pm 96 ^B	224 \pm 58 ^B	447 \pm 146 ^B
Recup.	74 \pm 18 ^C	192 \pm 59 ^C	266 \pm 68 ^C	397 \pm 84 ^C	334 \pm 91 ^B	731 \pm 167 ^C	300 \pm 94 ^B	276 \pm 73 ^B	576 \pm 144 ^B

A inibição da abertura estomática nas folhas destacadas de plantas sujeitas a déficit hídrico severo persistiu mesmo quando se prolongou para 4 horas o tempo de iluminação com o pecíolo imerso em água. O mesmo se verificou em folhas destacadas no dia a seguir ao restabelecimento da rega (quadro XIII). A inibição da abertura estomática também não foi revertida pela introdução de benziladenina no fluxo transpiratório (quadro XIII).

4.3. Discussão

No ensaio realizado durante o Inverno, com plantas de *Lupinus albus* em desenvolvimento vegetativo, o decréscimo da condutância foliar na fase inicial de secagem do solo (fig. 47) precedeu o desenvolvimento de déficit hídrico foliar (fig. 42 e 44). Estes resultados indicam que a desidratação do solo pode induzir o encerramento dos estomas, mesmo na ausência de déficit hídrico foliar, tal como já se tinha verificado em *Lupinus cosentinii* (Henson et al, 1989a; Jensen et al, 1989), assim como em *Commelina communis*, no presente trabalho (cap. IV e V.2).

As observações anteriormente referidas sugerem que a abertura dos estomas será controlada por sinais químicos produzidos pelas raízes, tendo sido proposto que o ácido abcísico desempenhará um papel relevante no sistema de comunicação entre as raízes e a parte aérea (Zhang *et al.*, 1987; Neales *et al.*, 1989; Davies & Zhang, 1991). Contudo, num trabalho realizado nos anos 70, Lancaster *et al.* (1977) concluíram que o ABA é um fraco inibidor da abertura dos estomas de Lupinus luteus. Tal conclusão, a confirmar-se, questionaria qualquer hipótese deste regulador de crescimento desempenhar um papel importante no controlo da abertura estomática, pelo menos nesta espécie. A sensibilidade estomática à aplicação de ABA exógeno foi posteriormente posta em evidência em várias espécies do género Lupinus, nomeadamente em L. luteus (Henson *et al.*, 1989b; Henson & Turner, 1991). Contudo, nos trabalhos anteriormente referidos não foi testada a resposta estomática de Lupinus albus. No presente trabalho verificou-se que a condutância foliar de Lupinus albus decresce em resposta à aplicação exógena de ácido abcísico numa concentração igual ou superior a $0,1 \text{ mmol m}^{-3}$ (fig. 23 e 53). A aplicação de soluções de ABA tão diluídas inibe a abertura dos estomas de outras espécies de Lupinus (Henson & Turner, 1991), bem como de Commelina communis (Snaith & Mansfield, 1982a) e de Hordeum vulgare (Cooper *et al.*, 1972), mas não afecta a abertura dos estomas de Xanthium strumarium (Raschke, 1975) e Gossypium hirsutum (Radin & Hendrix, 1988). Assim, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que Lupinus albus se encontra entre as espécies cujas células guarda são afectadas por concentrações de ácido abcísico relativamente pequenas, tais como as que ocorrem no fluxo transpiratório de plantas em condições naturais.

A participação do ABA no sistema de controlo da abertura estomática de Lupinus albus, em situações de défice hídrico, é sugerida pelo facto de a sensibilidade relativa das duas superfícies foliares ser igual em resposta à secura no solo e à aplicação exógena daquele regulador de crescimento: nas plantas em desenvolvimento reprodutivo, tanto o défice hídrico no solo (fig. 29) como a aplicação exógena de ABA (fig. 23) afectaram igualmente a condutância das duas superfícies foliares; pelo contrário, no ensaio realizado com plantas mais jovens a superfície abaxial revelou-se mais sensível do que a adaxial, tanto em resposta ao défice hídrico (fig. 47) como à aplicação exógena de ácido abcísico (fig. 53), tal como já se tinha verificado anteriormente noutras espécies de Lupinus (Henson & Turner, 1991). Estes resultados sugerem que a sensibilidade

diferencial das duas superfícies foliares ao défice hídrico poderá ser determinada pela sensibilidade relativa dos estomas abaxiais e adaxiais para o ácido abcísico.

Como já foi referido (cap. II.1.2.), Henson & Turner (1991) concluíram que diferenças quanto à frequência estomática estarão na origem da aparente sensibilidade diferencial das duas superfícies foliares para o ácido abcísico: quanto maior a frequência estomática, menor será a sensibilidade aparente dos estomas para o ácido abcísico, visto que, para uma dada concentração de ABA no fluxo transpiratório, a quantidade daquele regulador de crescimento que se acumula por complexo estomático será menor na superfície foliar que tiver uma maior frequência estomática (Henson & Turner, 1991). Caso a sensibilidade diferencial das duas superfícies foliares, tanto para o défice hídrico como para o ácido abcísico, esteja associada à variação da frequência estomática entre as duas superfícies foliares, como foi proposto por Henson & Turner (1991), então as plantas de Lupinus albus, com as quais se realizaram os dois ensaios no presente trabalho, deveriam diferir quanto à razão entre a frequência estomática das duas superfícies foliares. Esta razão, para além de ser determinada geneticamente, pode também ser afectada pelos factores ambientais prevalecentes durante o período de crescimento, nomeadamente, a intensidade luminosa e a velocidade do vento (Jones, 1985). Estes factores deverão ter diferido nos dois ensaios realizados com plantas de tremoceiro. Recorde-se que o 1º ensaio foi realizado na Primavera, tendo as plantas crescido ao ar livre, enquanto que o 2º ensaio ocorreu no Inverno, sob abrigo. Para além disso, é admissível a ocorrência de variabilidade genética entre as plantas estudadas nos dois ensaios, visto que estas provinham de dois lotes diferentes de sementes. Contudo, a hipótese de a razão entre a frequência estomática das duas superfícies foliares de Lupinus albus ter diferido entre os dois ensaios não pode ser confirmada, visto que não foram efectuadas determinações de frequência estomática.

A avaliação do papel desempenhado pelas variações da concentração xilémica de ABA no controlo da abertura estomática foi dificultada pela forte contaminação floémica dos exsudados xilémicos recolhidos de folhas pressurizadas de Lupinus albus. Cerca de 50% das amostras tinham uma concentração de sacarose igual ou superior a 20 mol m^{-3} (fig. 37 e 51). Layzell et al (1981) não detectaram a presença de sacarose em exsudados xilémicos de raízes de tremoceiro, pelo que a ocorrência deste açúcar nos exsudados foliares deverá constituir um indicador de

contaminação floémica. Aqueles mesmos autores determinaram, no floema de plantas de Lupinus albus em floração, concentrações de sacarose oscilando entre 412 e 588 mol m⁻³. Se considerarmos que a concentração de sacarose no floema das plantas de tremoço estudadas no presente trabalho será da mesma ordem de grandeza, tal significa que a contaminação floémica era superior a 5% em mais de metade dos exsudados foliares nos quais o ABA foi quantificado.

A concentração de sacarose nos exsudados xilémicos de Lupinus albus é muito superior à determinada por Hartung et al (1988) em exsudados de folhas pressurizadas de algodoeiro, assim como nos exsudados de folhas pressurizadas de Vitis vinifera (cap. VI) e Helianthus annuus (cap. V.3.). Visto que o método de recolha dos exsudados foi essencialmente igual, a maior percentagem de contaminação floémica dos exsudados de tremoço deverá resultar da relativa facilidade com que esta planta produz exsudações floémicas, facto que está na origem do elevado número de trabalhos sobre transporte floémico que têm sido realizados nesta espécie (Hoad, 1978; Pate et al, 1979; Layzell et al, 1981; Munns et al, 1988; Wolf et al, 1990).

A concentração de ácido abscísico nos exsudados foliares de tremoço estava positivamente correlacionada com a concentração de sacarose determinada nas mesmas amostras (quadro VII, fig. 51), tal como seria de esperar tendo em conta que a concentração deste regulador de crescimento é geralmente mais elevada no floema (alcalino) do que no xilema (Zeevaart & Boyer, 1984). O declive da relação ABA vs sacarose era maior nas amostras colhidas de plantas não regadas do que nos exsudados foliares de plantas regadas (quadro VII, fig. 51). Contudo, no dia imediatamente a seguir ao restabelecimento da rega já não se detectaram diferenças no declive daquela relação. Estes resultados estão de acordo com o que seria de esperar tendo em conta que um aumento do declive da relação ABA vs sacarose deverá ser um indicador do aumento da razão entre as concentrações floémicas de ácido abscísico e de sacarose. Hoad (1978) analisou a concentração de ácido abscísico no floema de plantas de Lupinus albus em frutificação, tendo verificado que esta aumentava de 8 mmol m⁻³, em plantas regadas, para 56 mmol m⁻³ em plantas não regadas. Após o alívio do défice hídrico a concentração floémica de ABA decrescia rapidamente e, ao fim de 6 horas, atingia a mesma concentração das plantas regadas (Hoad, 1978). Por outro lado, não é previsível que a supressão da rega esteja associada a um aumento da concentração de sacarose no floema, visto que a

taxa de exportação de hidratos de carbono a partir das folhas é menor em plantas de tremoceiro sujeitas a déficit hídrico do que em plantas regadas (Quick *et al.*, 1992). Assim, é provável que em plantas não regadas ocorra um aumento da razão ABA/carbono no floema, tal como Wolf *et al.* (1990) verificaram em plantas de Lupinus albus sujeitas a stress salino.

Para além das referidas variações do declive, a supressão da rega resultou, em ambos os ensaios, num significativo aumento do valor da intercepção nas ordenadas da relação entre as concentrações de ABA e sacarose (quadro VII e fig. 51), a qual constitui uma estimativa da concentração xilémica de ácido abscísico, na ausência de contaminação floémica (cap. III.11). Considerando os resultados obtidos quando da aplicação de ABA exógeno a folhas destacadas de plantas regadas, o aumento da concentração endógena de ABA detectado no xilema das plantas não regadas era suficiente para explicar o observado decréscimo da condutância foliar (fig. 40 e 54).

No 1º ensaio, realizado com plantas em desenvolvimento reprodutivo, não foram detectadas diferenças de condutância foliar (fig. 27) e de concentração xilémica de ácido abscísico (fig. 33) entre folhas recém-expandidas e folhas adultas. No 2º ensaio, realizado com plantas em desenvolvimento vegetativo, foi comparado o comportamento estomático de folhas em expansão e de folhas recém-expandidas: após 9 dias de suspensão da rega, as folhas em expansão não só tinham os estomas mais fechados (fig. 47), como possuíam uma concentração xilémica de ABA 2 vezes superior à das folhas expandidas (quadro X e fig. 51). A referida diferença na concentração de ácido abscísico está de acordo com anteriores observações em Xanthium strumarium de que folhas em expansão de plantas não regadas acumulam maiores quantidades de ácido abscísico do que as folhas expandidas das mesmas plantas (Cornish & Zeevaart, 1984; Zeevaart & Boyer, 1984).

Os efeitos estomáticos do déficit hídrico persistiram dois dias após o restabelecimento da rega, em ambos os ensaios realizados (fig. 29 e 47). No 1º ensaio, o atraso na reabertura dos estomas de Lupinus albus ocorreu apesar da re-hidratação das plantas ter sido muito rápida: no dia a seguir ao restabelecimento da rega, as plantas testemunha tinham um potencial hídrico foliar inferior ao das plantas previamente sujeitas a déficit hídrico (fig. 28). Em consequência, a condutância foliar não estava correlacionada com o potencial hídrico foliar (fig. 30). No 2º ensaio a re-hidratação das plantas foi mais lenta (fig. 44), pelo que, nos dois dias que se

seguiram ao restabelecimento da rega, as plantas que recuperavam dos efeitos da secagem do solo mantiveram potenciais hídricos inferiores, em cerca de 0,15 MPa, aos das plantas testemunha. Note-se, no entanto, que no 1º dia de alívio do déficit hídrico, o potencial hídrico foliar das plantas que recuperavam dos efeitos da secagem no solo, apesar de ser inferior ao potencial hídrico determinado no mesmo dia nas plantas testemunha, era igual ou superior ao Ψ determinado, em dias anteriores, nas plantas regadas (fig. 44). Assim, mesmo no 2º ensaio, parece pouco provável que os efeitos a posteriori do déficit hídrico tenham resultado da persistência de déficit hídrico foliar.

As diferenças quanto ao teor relativo em água do solo persistiram no dia a seguir à reposição da rega, tanto no 1º (fig. 24) como no 2º ensaio (fig. 41). Tais observações, consideradas isoladamente, poderiam levar a concluir que os efeitos a posteriori do déficit hídrico sobre a abertura estomática teriam resultado do atraso na re-hidratação do solo. Contudo, tal hipótese não parece sustentável: no 1º ensaio, no dia a seguir ao restabelecimento da rega o teor relativo em água do solo era inferior ao valor médio determinado nesse mesmo dia nos vasos regados diariamente, mas era muito semelhante ao que estes apresentavam nos dias anteriores (fig. 24), sem que tal tivesse resultado em qualquer inibição da abertura dos estomas das plantas testemunha. Por outro lado, no 2º dia de alívio do déficit hídrico, as diferenças de abertura estomática persistiram (fig. 29), apesar de se terem anulado as diferenças quanto ao teor relativo em água do solo (fig. 24). Assim, quando se consideram as determinações efectuadas tanto durante a imposição do déficit hídrico como após o alívio do mesmo, só cerca de 65% das diferenças observadas na condutância foliar podiam ser explicadas pela variação do teor relativo em água do solo (fig. 31). No segundo ensaio, a relação entre aquelas duas variáveis era semelhante no caso das folhas adultas, enquanto que nas folhas em expansão mais de 77% das diferenças de condutância foliar estavam correlacionadas com a variação do teor relativo em água do solo (fig. 50).

No primeiro ensaio, elevadas concentrações xilémicas de ácido abscísico persistiram após o restabelecimento da rega (quadro VII) e os níveis residuais daquele composto eram adequados para explicar o atraso na reabertura dos estomas (fig. 40). Já anteriormente Cornish & Zeevaart (1985a) tinham verificado, em Xanthium strumarium, que a concentração xilémica de ABA não voltava aos valores pré-stress imediatamente após a

re-hidratação das plantas. Contudo, aqueles autores concluíram que os níveis residuais de ácido abscísico só permitiam explicar a fase inicial do atraso na reabertura estomática. Quando a condutância recuperava para um terço dos valores determinados anteriormente à imposição do stress a concentração xilémica daquele regulador de crescimento já não diferia da concentração existente no xilema das plantas de Xanthium strumarium regadas diariamente (Cornish & Zeevaart, 1985a). No presente trabalho, as diferenças quanto à concentração xilémica de ABA, entre plantas regadas e plantas sujeitas a défice hídrico, persistiam 2 dias após o restabelecimento da rega (quadro VII), quando a condutância foliar das plantas previamente sujeitas a défice hídrico já tinha recuperado para cerca de 2/3 do valor determinado nas plantas testemunha (fig. 29). Assim, a associação entre o atraso na reabertura estomática e a persistência de concentrações relativamente elevadas de ABA no xilema de Lupinus albus não se restringiu à fase inicial de recuperação do défice hídrico, contrariamente ao verificado por Cornish & Zeevaart (1985a) em Xanthium strumarium.

Apesar da concentração de ácido abscísico no xilema foliar estar correlacionada com o teor relativo em água do solo, a relação entre aquelas duas variáveis após o alívio do défice hídrico parecia diferir da relação detectada durante a secagem do solo (fig. 38): quando se consideravam somente as determinações efectuadas nas plantas testemunha e nas plantas não regadas, desde que o teor relativo em água do solo se mantivesse acima dos 70%, a concentração xilémica de ABA não era afectada pela desidratação do solo; contudo, a concentração de ABA no xilema das plantas que recuperavam dos efeitos da deficiência hídrica era relativamente elevada, apesar do teor relativo em água do solo ser superior a 70% (fig. 38). Assim, parece pouco provável que a persistência de elevadas concentrações de ABA no xilema, após a reposição da rega, seja uma consequência directa do atraso na re-hidratação do solo e, consequentemente, das raízes. Cornish & Zeevaart (1985b) verificaram que, contrariamente ao que acontece após a re-hidratação foliar, a re-hidratação de raízes destacadas não é acompanhada pela rápida degradação do ácido abscísico. A fraca capacidade das raízes metabolizarem o ABA poderá estar na origem da persistência de níveis residuais daquele regulador de crescimento no xilema das plantas re-hidratadas.

No ensaio realizado com plantas em desenvolvimento vegetativo, no dia a seguir ao restabelecimento da rega a

concentração de ABA no xilema de folhas adultas não diferia entre as plantas sujeitas a déficit hídrico e as plantas regadas diariamente (fig. 51), contrariamente ao verificado no ensaio anterior (quadro VII). Também os resultados obtidos em folhas destacadas indicaram que os efeitos a posteriori do déficit hídrico não estavam associados à produção de mensagens positivas a partir das raízes: o destacamento foliar e imersão do pecíolo em água não anulou as diferenças de condutância entre as folhas das plantas testemunha e as folhas de plantas sujeitas a déficit hídrico severo (quadro XII e XIII), ou que recuperavam dos efeitos do mesmo (quadro XIII). Em contrapartida, nas folhas destacadas de plantas sujeitas a déficit hídrico moderado (7 dias sem rega), a imersão do pecíolo em água resultou na anulação das diferenças de condutância total (abaxial + adaxial) relativamente às folhas destacadas de plantas regadas (quadro XII). Estes resultados indicam que a depressão da condutância foliar em situações de déficit hídrico moderado será provocada pela presença de um inibidor da abertura estomática no fluxo transpiratório, mas as mensagens positivas não permitem explicar a inibição da abertura dos estomas em plantas sujeitas a déficit hídrico severo.

Os dois ensaios realizados com plantas de Lupinus albus distinguiram-se em vários aspectos, para além das já referidas diferenças quanto à velocidade de retorno da concentração xilémica de ABA aos valores anteriores à imposição do déficit hídrico. O 2º ensaio caracterizou-se não só por o período de suspensão da rega ter sido mais prolongado, como por a desidratação final do solo ter sido mais acentuada do que no 1º ensaio (comparar figuras 24 e 41). Behl & Hartung (1984) verificaram que a concentração de ABA aumentava quando raízes destacadas de Hordeum distichon eram sujeitas a stress osmótico moderado. Contudo, a concentração radicular daquele regulador de crescimento decrescia quando o potencial osmótico do meio externo atingia valores inferiores ao potencial osmótico celular. Por outro lado, Wartinger et al (1990) sugeriram que o papel do ABA no controlo da abertura estomática de Prunus dulcis decresce à medida que se acentua o déficit hídrico no solo e diminui a actividade e crescimento dos ápices radiculares, onde aquele regulador de crescimento é sintetizado (Cornish & Zeevaart, 1985b; Robertson et al, 1985; Zhang & Davies, 1987). Esta hipótese está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, concretamente com as observações de que a variação da concentração xilémica de ABA permitia explicar o decréscimo na condutância foliar de plantas sujeitas a déficit hídrico moderado

(fig. 40 e 54), mas os efeitos a posteriori do déficit hídrico severo e prolongado (2º ensaio) não estavam associados à manutenção de concentrações elevadas de ácido abscísico no xilema (fig. 51).

Os dois ensaios com Lupinus albus diferiram também quanto à ocorrência de ajustamento osmótico, o qual só foi detectado no último ensaio (fig 42 e 44). O decréscimo do potencial osmótico no estado de máxima hidratação estava associado à diminuição da razão entre a massa foliar túrgida e a massa foliar seca (fig. 43 e 44), tal como foi observado anteriormente noutras espécies de Lupinus (Turner et al, 1987). A diminuição daquela razão indica que terá ocorrido uma acumulação passiva de solutos, em consequência da redução do volume osmótico provocada quer pela acumulação de polímeros insolúveis (Girma & Krieg, 1992), como pelo decréscimo do volume celular ou pelo espessamento das paredes celulares (Cutler et al, 1977). Contudo, a redução do potencial osmótico no estado de máxima hidratação não resultou exclusivamente da acumulação passiva de solutos, pois também foi detectado um aumento do número de osmoles de solutos por unidade de massa foliar seca (fig. 43 e 45).

As diferenças entre os dois ensaios quanto à ocorrência de ajustamento osmótico poderão estar associadas ao diferente estado de desenvolvimento das plantas com que foram realizados (ver cap. V.4.1.). Contudo, a ocorrência de ajustamento osmótico no 2º ensaio poderá indicar que, apesar da taxa de assimilação ter sido necessariamente afectada devido ao decréscimo da condutância estomática (fig. 29 e 47), a secura no solo terá afectado menos intensamente a produção de solutos do que a sua utilização nos processos de crescimento. É provável que o crescimento das raízes tenha sido mais afectado no 2º ensaio visto que, como já foi referido, o período de suspensão da rega foi mais prolongado e a desidratação final do solo foi mais severa do que no 1º ensaio (comparar figuras 24 e 41). Note-se que os dois ensaios diferiram ainda pelo facto de a re-hidratação das plantas, após o restabelecimento da rega, ter sido mais lenta no ensaio realizado com plantas jovens (fig. 44) do que no 1º ensaio (fig. 28). Estas observações, sugerem que o prolongamento e intensificação da secagem do solo no 2º ensaio poderá ter afectado consideravelmente o crescimento e a integridade das raízes, daí resultando o decréscimo da condutância hidráulica do sistema radicular.

Meinzer & Grantz (1990) sugeriram que a correlação entre a condutância estomática e a condutância hidráulica das plantas,

detectada em alguns trabalhos (Aston & Lawlor, 1979; Saliendra & Meinzer, 1989; Meinzer & Grantz, 1990), seria o resultado de a actividade e integridade do sistema radicular afectar paralelamente a condutância hidráulica e a produção de compostos promotores da abertura estomática. Entre estes estariam incluídas as citocininas, as quais são sintetizadas nos ápices radiculares (Chen et al., 1985). Por outro lado, Wartinger et al. (1990) sugeriram que, à medida que se acentua o défice hídrico no solo e diminui a actividade e crescimento dos ápices radiculares, aumentaria a importância da escassez de citocininas para a limitação da abertura dos estomas. Posteriormente, Fußeder et al. (1992) verificaram que a redução da concentração xilémica de citocininas pode acentuar o encerramento estomático induzido por concentrações não muito elevadas de ABA. Estes resultados sugerem que a escassez de citocininas pode estar associada ao atraso na reabertura dos estomas após o alívio de défices hídricos severos. Contudo, tal como se tinha verificado quando da aplicação de cinetina a folhas destacadas de Helianthus annuus (fig. 22), a aplicação exógena de benziladenina não reverteu a inibição da abertura estomática em folhas destacadas de plantas de Lupinus albus que recuperavam dos efeitos de deficiência hídrica severa (quadro XIII). Aparentemente, estes resultados questionam a hipótese de a carência de citocininas estar na origem da limitação da condutância estomática, detectada em plantas sujeitas a stress hídrico severo. Contudo, a aplicação da benziladenina a folhas destacadas de Lupinus albus foi limitada a 4 horas. Consequentemente, não seria de esperar que deste ensaio de aplicação exógena resultasse a reversão de limitações da abertura estomática induzidas pela escassez de citocininas (e/ou acumulação de ácido abscísico), eventualmente associadas a modificações ao nível da expressão genética e constituição das células guarda, as quais não serão reversíveis a curto prazo.

5. Conclusões

Em resumo, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o encerramento dos estomas, desencadeado pela desidratação do solo, se encontra associado à acumulação de ácido abscísico tanto ao nível do mesófilo como da epiderme e do xilema. O aumento da concentração daquele regulador de crescimento no xilema de Lupinus albus foi suficiente para justificar o encerramento dos estomas, mesmo no caso em que este precedeu o desenvolvimento de défice hídrico foliar (fig. 54).

Quanto aos efeitos a posteriori dos défices hídricos sobre a abertura estomática, os resultados obtidos em Commelina communis indicam que estes não são causados pelo facto de o decréscimo da concentração de ácido abcísico ser mais lento na epiderme do que no resto da folha (quadro IV). A persistência de elevadas concentrações de ABA no xilema só permitiu explicar o atraso na reabertura dos estomas no 1º ensaio realizado com Lupinus albus (fig. 40), o qual se caracterizou por a secagem do solo ter sido relativamente moderada e pela rapidez da recuperação das relações hídricas foliares após o alívio do défice hídrico. A importância do ácido abcísico para a limitação da condutância foliar diminuiu no ensaio com plantas de girassol e no 2º ensaio com tremoceiro. Nestes ensaios a desidratação do solo foi mais severa, sendo admissível que a actividade e integridade das raízes tenham sido severamente afectadas. Nessas condições, a abertura estomática deverá passar a ser progressivamente limitada pela escassez de promotores da abertura estomática (mensagens negativas) ou por alterações estruturais ao nível das células guarda, não reversíveis a curto prazo.

VI. EFEITO DA DISPONIBILIDADE DE ÁGUA NO SOLO NA VARIAÇÃO DA CONDUTÂNCIA FOLIAR DE Vitis vinifera L. EM CONDIÇÕES DE CAMPO.

1. Introdução - Variação da abertura estomática ao longo do dia.

A abertura dos estomas pode apresentar flutuações diurnas, não só em folhas intactas (Zhang et al, 1987), como em epidermes destacadas (Blackman & Davies, 1985). Também as respostas fisiológicas de protoplastos de células guarda podem variar consoante o período do dia em que são isolados (Dodge et al, 1992). A variação da abertura dos estomas ao longo do dia é particularmente acentuada em plantas que se desenvolvem em condições naturais: em dias de Verão, tem-se verificado que a condutância estomática de várias espécies decresce significativamente ao longo do dia (Losch et al, 1982; Burschka et al, 1983; Pereira et al, 1986; Tenhunen et al, 1987).

Vitis vinifera encontra-se entre as espécies que apresentam frequentemente um decréscimo da condutância estomática ao longo de dias de Verão (Loveys, 1984; Chaves et al, 1987; Downton et al, 1987). Nesta espécie verificou-se que, não só o decréscimo da abertura estomática ao longo do dia se acentua quando o teor em água no solo diminui (Downton et al, 1987), como o fecho dos estomas durante a tarde é acompanhado por um aumento da sensibilidade estomática para o dióxido de carbono (Correia et al, 1990; Düring, 1991). Esta última característica é geralmente atribuída ao ácido abscísico (Dubbe et al, 1978). Contudo, as flutuações da condutância estomática ao longo do dia não se encontram necessariamente correlacionadas com o teor foliar em ABA. Loveys & Düring (1984), por exemplo, verificaram que, em condições semi-áridas, só durante a primeira metade do dia a condutância estomática de Vitis vinifera se encontrava inversamente relacionada com a concentração foliar de ácido abscísico. Durante a tarde, apesar da concentração foliar daquele regulador de crescimento decrescer, a condutância estomática mantinha-se muito baixa, particularmente nos dias mais quentes e secos. Por outro lado, Henson et al (1982) verificaram que os estomas de Pennisetum americanum abriam de manhã, apesar dos elevados níveis foliares de ácido abscísico, fechando após o meio-dia quando a concentração daquele regulador de crescimento se

encontrava em declínio. Discrepâncias entre as flutuações diurnas da condutância estomática e a concentração foliar de ABA foram também detectadas em Arbutus unedo (Burschka et al, 1983), Malus domestica (Davies & Lakso, 1978), Prunus persica (Xiloyannis et al, 1980) e Zea mays (Tardieu et al, 1992b).

Tal como foi referido no capítulo II, o ABA pode encontrar-se distribuído por vários compartimentos celulares, mas só num deles (o apoplasto) é acessível às células guarda. Daí resulta que as variações da concentração de ABA nos outros compartimentos celulares não deverão afectar a abertura dos estomas, o que tornará infrutíferas as tentativas de correlacionar a condutância estomática com o teor em ácido abscísico na globalidade da folha. A compartimentação intracelular do ABA poderá assim contribuir para explicar a referida falta de correlação entre a abertura dos estomas e a concentração foliar deste regulador de crescimento.

Burschka et al (1983) verificaram que a resposta dos estomas à introdução de ABA no fluxo transpiratório de plantas intactas de medronheiro decrescia a meio do dia. Este facto foi interpretado como indicador da existência de uma elevada concentração de ácido abscísico endógeno no apoplasto foliar. Nessas circunstâncias, o ABA exógeno injectado no xilema do pecíolo não produziria um aumento significativo da concentração endógena, pelo que a resposta estomática seria pequena. Baseando-se nestes dados, Burschka et al (1983) sugeriram que o ácido abscísico seria libertado no apoplasto ao longo do dia.

Contudo, a maior parte dos trabalhos não aponta no sentido de as flutuações diárias da condutância estomática resultarem de variações da concentração de ABA no apoplasto foliar. Loveys et al (1987), por exemplo, concluíram que a concentração de ácido abscísico no xilema de Prunus armeniaca era insuficiente para influenciar a abertura estomática. Por outro lado, num estudo comparativo do comportamento estomático de duas cultivares de Vitis vinifera, Loveys (1984) verificou que, apesar da condutância estomática da cultivar Riesling decrescer ao longo do dia, a concentração de ABA no xilema se mantinha praticamente inalterável. Na outra cultivar de videira estudada por Loveys (1984), apesar de a concentração xilémica de ácido abscísico aumentar à tarde, tal só se verificava após ter ocorrido o encerramento estomático. Também Waringer et al (1990) não conseguiram estabelecer qualquer relação entre a variação diurna da condutância estomática de amendoeira e a concentração de ABA no fluxo transpiratório. Estes dados indicam que o decréscimo da abertura estomática ao longo do dia não resulta da libertação de

ácido abscísico no apoplasto foliar.

Nos trabalhos em que se analisaram as flutuações ao longo do dia da condutância estomática e da concentração xilémica de ABA, aquelas duas variáveis só se encontravam correlacionadas num estudo levado a cabo em plantas de milho crescendo em condições de campo e em solos com diferente estrutura e disponibilidade de água (Tardieu et al, 1991). No entanto, trabalhos posteriores dos mesmos autores (Tardieu & Davies, 1992; Tardieu et al, 1992b) revelaram que a relação entre a condutância estomática e a concentração de ABA no xilema de plantas de milho não se mantém constante: ao longo do dia verificou-se um aumento da sensibilidade estomática para o ABA existente no apoplasto, entendendo-se sensibilidade como o declive da relação entre a condutância e a concentração daquele regulador de crescimento.

Blackman & Davies (1985) sugeriram o envolvimento das citocininas nas variações diurnas da sensibilidade estomática para o ácido abscísico. Aquelles autores verificaram, em plantas de milho sujeitas a secagem parcial do sistema radicular, que o encerramento dos estomas se acentuava 3 horas após o início do fotoperíodo. O referido decréscimo na abertura estomática estava associado a um aumento da sensibilidade estomática para o ácido abscísico e mantinha-se mesmo após a incubação de fragmentos foliares em água, mas era revertido pela aplicação exógena de citocininas. Com base nestes dados, Blackman & Davies (1985) sugeriram que o aumento ao longo do dia da resposta dos estomas à aplicação de ABA seria devido à redução do fornecimento de citocininas pelas raízes. Também Wartinger et al (1990) sugeriram o envolvimento das citocininas no controlo da sensibilidade estomática para o ácido abscísico, particularmente em situações de défice hídrico severo. Estes autores verificaram que, durante a fase inicial de secagem do solo, a condutância estomática máxima (registada de manhã) estava inversamente relacionada com a concentração xilémica de ABA. Contudo, quando a desidratação do solo se acentuava, Wartinger et al (1990) detectaram o decréscimo da concentração de ácido abscísico no xilema de amendoeira, facto que atribuíram à morte de parte do sistema radicular. Segundo Wartinger et al (1990), o papel do ABA no controlo da abertura estomática deverá decrescer à medida que se acentua o défice hídrico no solo e diminui a actividade e crescimento dos ápices radiculares. Nessas condições será de prever um decréscimo do transporte de citocininas das raízes para a parte aérea e, conseqüentemente, o aumento da sensibilidade estomática para o ácido abscísico.

A hipótese do envolvimento das citocininas no decréscimo da condutância estomática ao longo do dia é apoiada pela observação de que a actividade daqueles reguladores de crescimento em folhas de choupo flutua ao longo do dia, sendo o pico de actividade das citocininas detectado no início da manhã (Hewett & Wareing, 1973). Também no xilema de Prunus dulcis foram recentemente detectadas flutuações diurnas da concentração de citocininas, registando-se de manhã as maiores concentrações (Fußeder et al, 1992). Para além disso, no trabalho referido anteriormente verificou-se que, quando a concentração xilémica de ABA não era muito elevada, as variações da condutância estomática estavam associadas às flutuações da concentração xilémica de citocininas. Contudo, tal não se verificava quando a concentração de ABA no xilema era superior a $0,2 \text{ mmol m}^{-3}$: neste caso os estomas mantinham-se fechados, independentemente da variação da concentração de citocininas. Estes resultados indicam que, na ausência de défice hídrico, ou em situações de défice hídrico moderado, a condutância estomática pode ser afectada a curto prazo pelas flutuações ao longo do dia da concentração xilémica de citocininas. Contudo, quando o défice hídrico se acentua, a inibição da abertura estomática provocada pelo ácido abscísico não é revertida pelo aumento da concentração xilémica de citocininas, pelo menos a curto prazo.

Como já foi referido (cap. II.2.3.), a sensibilidade estomática para o ácido abscísico depende, para além das citocininas, de outros factores. Concretamente, o efeito inibitório do ABA sobre a abertura dos estomas acentua-se com o aumento da temperatura foliar (Rodriguez & Davies, 1982; Cornic & Ghashghaie, 1991), do défice de pressão de vapor entre a folha e o ar (Loveys, 1991), do pH apoplástico (Paterson et al, 1988) e da concentração de iões Ca^{2+} (De Silva et al, 1985; Schurr et al, 1992). Segundo Tardieu & Davies (1992), também o potencial hídrico foliar, ou epidérmico, pode influenciar a resposta estomática ao ácido abscísico. Aqueles autores verificaram que o efeito inibitório do ABA sobre a abertura estomática é significativamente amplificado pela redução do potencial osmótico do meio de incubação de epidermes destacadas de Commelina communis. De acordo com estes dados, será de esperar que a sensibilidade estomática para o ABA aumente ao longo da manhã, visto que durante esse período se regista geralmente um aumento tanto da temperatura foliar como do défice de pressão de vapor entre a folha e o ar, enquanto que o potencial hídrico foliar tende a decrescer. Quanto ao pH e à concentração iónica do

xilema, Anderson & Brodbeck (1989) detectaram, a meio do dia, um aumento tanto do pH como da concentração de iões cálcio no xilema de Vitis rotundifolia, o que também poderá contribuir para o aumento da sensibilidade estomática para o ácido abcísico.

No presente trabalho procurou-se avaliar o papel desempenhado pelo ácido abcísico no controlo da abertura dos estomas de plantas de Vitis vinifera crescendo no campo. Com esse objectivo, analisou-se, em diferentes períodos do dia, não só a relação entre a condutância foliar e a concentração de ABA no xilema, como a resposta estomática à introdução daquele regulador de crescimento no fluxo transpiratório de folhas destacadas de plantas com diferente disponibilidade de água no solo.

2. Material vegetal e condições experimentais

O presente estudo foi efectuado numa vinha, orientada no sentido SSW-NNE, com cerca de 23 anos (idade reportada a 1990, ano em que se efectuaram as primeiras determinações). A área de vinha onde decorreu o estudo compreendia dois tipos de solos, cuja caracterização, bem como a distribuição de raízes no seu perfil, foi descrita por Pacheco (1989): o solo I apresentava uma camada de grés a cerca de 1 m de profundidade, registando-se um decréscimo abrupto da quantidade de raízes abaixo dos 80 cm de profundidade; no solo II, a quantidade de raízes também decrescia com a profundidade mas de uma forma mais suave. Com base na distribuição e estado de agregação do sistema radicular nos dois tipos de solo, Pacheco (1989) concluiu que, até à profundidade de 80 cm, a eficiência de utilização da água do solo deve ser semelhante para os dois tipos de solos, mas o sistema radicular das videiras instaladas no solo II tem uma maior capacidade para explorar as camadas mais profundas.

Foram efectuadas determinações em 3 grupos de plantas, um dos quais era regado semanalmente a partir de Junho. As plantas regadas localizavam-se na zona de solo II o mesmo se verificando com um dos grupos de plantas não regadas. Estas últimas serão designadas como estando em condições de stress moderado. O outro grupo de plantas não regadas encontrava-se numa zona de solo I e será designado como estando em condições de stress severo.

O estudo foi realizado, em três anos sucessivos (1990, 1991 e 1992), no fim do mês de Julho. Nos dias em que se procedeu à recolha dos dados, as condições meteorológicas eram características de dias quentes de Verão, com céu limpo e

temperatura máxima superior a 30 °C.

Todas as determinações foram efectuadas em folhas recém-expandidas de ramos principais.

A condutância para a difusão do vapor de água da superfície abaxial foi determinada, em condições naturais, utilizando o porómetro Li-Cor 1600. Foram também analisadas as trocas gasosas (vapor de água e dióxido de carbono) de folhas mantidas durante o dia em condições constantes de temperatura e défice de pressão de vapor. Para tal utilizou-se o sistema aberto para medições de trocas gasosas com minicuvete de ambiente controlado (H. Walz).

O potencial hídrico foliar foi determinado, com a câmara de pressão, tendo esta também sido utilizada para a recolha dos exsudados xilémicos.

A concentração de ácido abscísico nos exsudados foi determinada por técnica imunoenzimática (ELISA) e a sua taxa de transporte até às folhas foi calculada a partir das taxas de transpiração medidas com o porómetro Li-Cor 1600.

No ano de 1990 efectuaram-se determinações da condutância foliar, em condições naturais, em dois períodos do dia: a meio da manhã (entre as 10.30 e 11.30) e à tarde (entre as 15.30 e 16.30). O potencial hídrico foi determinado nas mesmas folhas, das quais também se colheram exsudados xilémicos (1 amostra por folha) após pressurização da câmara 0,2 MPa acima da pressão de equilíbrio. As determinações foram feitas em 3 dias sucessivos. Em cada dia colheram-se dados de 2 folhas por tratamento.

Em 1991 efectuaram-se determinações de g e Ψ em dois dias, entre os quais ocorreu a rega das plantas regadas. A condutância foliar foi medida em 4 períodos do dia: 2 de manhã e 2 à tarde. O potencial hídrico foi determinado, noutras folhas, antes do nascer do Sol e imediatamente após as medições de condutância efectuadas no início da manhã e da tarde. A recolha dos exsudados foliares foi feita nas mesmas folhas em que se determinou o potencial hídrico a meio da manhã e à tarde. De cada folha colheram-se 3 amostras aumentando a pressão na câmara de 0,2 MPa por 3 vezes sucessivas. Em cada amostra de exsudados foliares foi determinada não só a concentração de ácido abscísico, como a concentração de frutose, glucose e sacarose.

Em 1992 só foram efectuadas determinações do potencial hídrico foliar antes do nascer do Sol. A condutância foliar foi medida no início da manhã (9h 30m) e no princípio da tarde (15h). Neste ano só se efectuaram determinações nas plantas com menor disponibilidade de água no solo e nas plantas regadas.

A resposta estomática à aplicação exógena de ácido abscísico

foi analisada nos anos de 1991 e 1992. O ABA foi aplicado em folhas destacadas de plantas regadas e de plantas sujeitas a déficit hídrico severo. As folhas foram destacadas no início da manhã (8 horas) e a meio do dia (às 14 horas em 1991 e às 12 horas no ano seguinte). Após o destacamento (efectuado debaixo de água) o pecíolo foi recortado debaixo de água e as folhas permaneceram no escuro durante 2 horas antes de serem transferidas para um local com iluminação natural. Contudo, tais precauções não evitaram que algumas folhas apresentassem sinais de emurchecimento após terem sido transferidas para a luz. Estas folhas não foram consideradas para os resultados apresentados. A condutância da página abaxial foi medida, com o porómetro Li-Cor 1600, 2 horas após as folhas terem sido iluminadas. Em 1992, após a determinação da condutância e corte da extremidade do pecíolo imersa, foi medido o potencial hídrico foliar e recolheram-se exsudados xilémicos (3 amostras por folha) nos quais se quantificou o ácido abscísico e a sacarose.

3. Resultados

3.1. Variação da condutância foliar em plantas intactas

3.1.1. 1990

Como se pode verificar na figura 55, de manhã, a condutância foliar média das plantas regadas era superior à das plantas não regadas, sendo a condutância das plantas sujeitas a stress moderado intermédia à das plantas regadas e das plantas com menor disponibilidade de água no solo. À tarde, a condutância foliar média era cerca de metade do valor determinado durante a manhã, apesar da diferença só ser estatisticamente significativa no caso das plantas sujeitas a stress moderado. Em virtude do acentuado encerramento estomático que ocorria neste último grupo de plantas, durante a tarde a condutância foliar era semelhante nos dois grupos de plantas não regadas.

O potencial hídrico foliar das plantas regadas era superior ao das plantas não regadas, tanto de manhã como de tarde. Contudo, as diferenças de condutância foliar entre os dois grupos de plantas não regadas não estavam associadas a diferenças do valor médio do potencial hídrico foliar (fig. 55). O potencial hídrico das plantas regadas decresceu ligeiramente à tarde, mas nas plantas não regadas Ψ era semelhante nos dois períodos do dia (fig. 55). Assim, apesar da condutância foliar determinada de

manhã estar positivamente correlacionada com o potencial hídrico foliar, o mesmo não ocorria à tarde (fig. 56). Neste último período do dia verificava-se que as folhas com menores condutâncias eram aquelas que tinham um maior Ψ , provavelmente em resultado de terem menores taxas de transpiração (fig. 55).

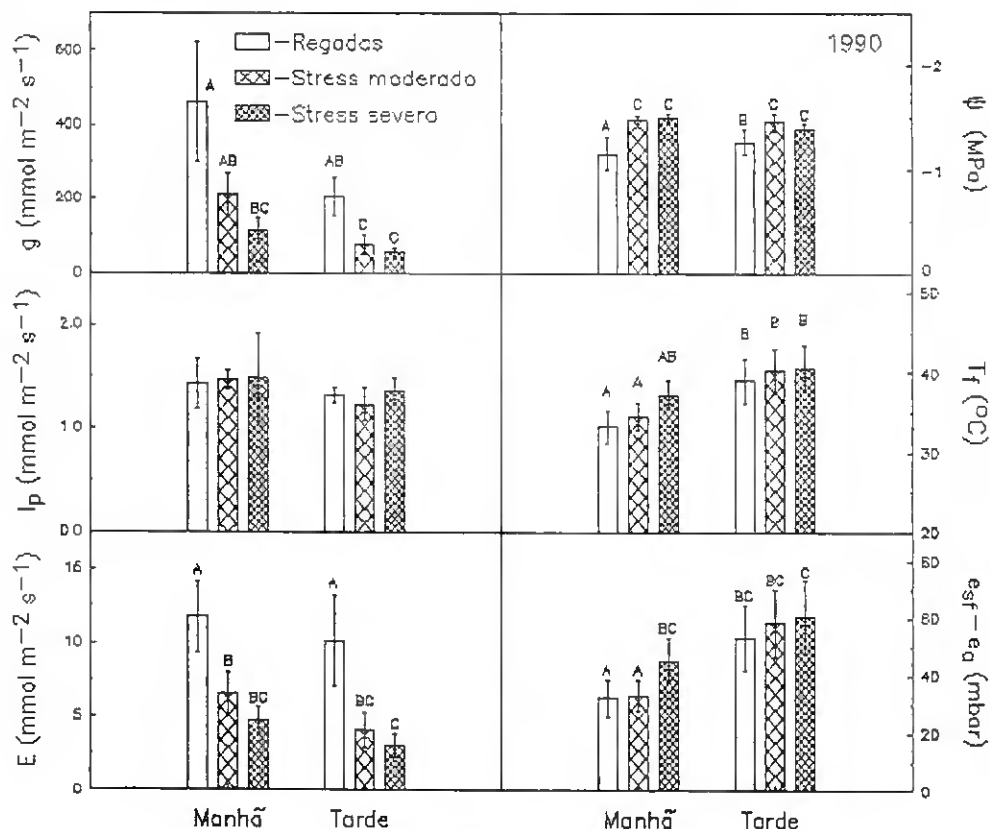


Fig. 55

Condutância abaxial (g), potencial hídrico foliar (Ψ), temperatura foliar (T_f), déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar ($e_{sf}-e_a$), taxa de transpiração (E) e densidade de fluxo fotónico incidente (I_p) em folhas de *Vitis vinifera* L., em condições naturais. Os valores apresentados são médias de 6 determinações. A comparação entre as médias foi feita pelo teste de Games & Howell no caso de g e pelo teste SNK nos restantes. As médias significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$) são assinaladas com maiúsculas diferentes.

A densidade de fluxo fotónico incidente não diferiu significativamente entre os dois períodos do dia em que as determinações foram efectuadas (fig. 55). Contudo, à tarde a temperatura foliar e o déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar eram significativamente superiores aos da manhã (fig. 55). Apesar de a condutância foliar máxima aumentar com a disponibilidade de água no solo, quando se analisaram separadamente as determinações efectuadas nos 3 grupos de plantas, verificou-se que a condutância estava negativamente correlacionada com a temperatura foliar e com o déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (fig. 57).

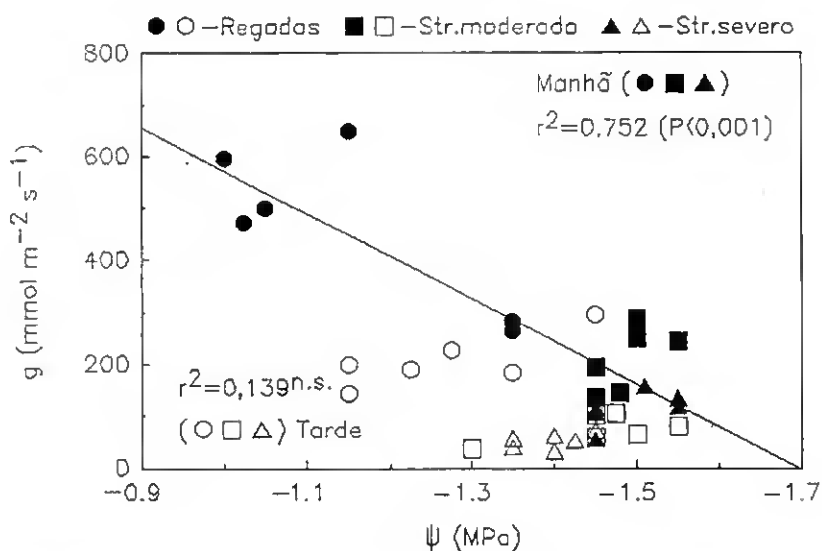


Fig. 56
Relação entre a condutância abaxial (g) e o potencial hídrico (Ψ) determinados, em 1990, em folhas recém-expandidas de *Vitis vinifera* L. em condições naturais.

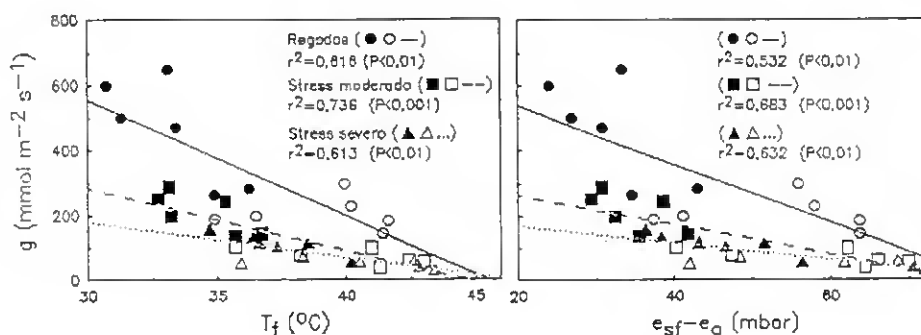


Fig. 57
Relação da condutância abaxial (g) com a temperatura foliar (T_f) e o défice de pressão de vapor entre a folha e o ar ($e_{sf}-e_a$). As determinações foram efectuadas em folhas recém-expandidas de *Vitis vinifera* L. em condições naturais.

Quando a temperatura foliar e o défice de pressão parcial de vapor entre a folha e o ar eram mantidos constantes a valores moderados ao longo do dia (fig. 58), a condutância da folha de uma planta regada decresceu, ao fim da tarde, para cerca de 75% do valor máximo determinado de manhã. A diminuição da condutância da folha da planta sujeita a stress moderado foi ainda mais acentuada: neste caso a condutância decresceu à tarde para cerca de 50% do valor determinado de manhã (fig. 58), sendo este decréscimo da mesma ordem de grandeza do registado nas folhas em condições naturais (fig. 55). No caso da folha da planta com menor disponibilidade de água no solo, mesmo em condições de temperatura e défice de pressão de vapor moderados, a sua condutância manteve-se baixa ao longo de todo o dia (fig. 58).

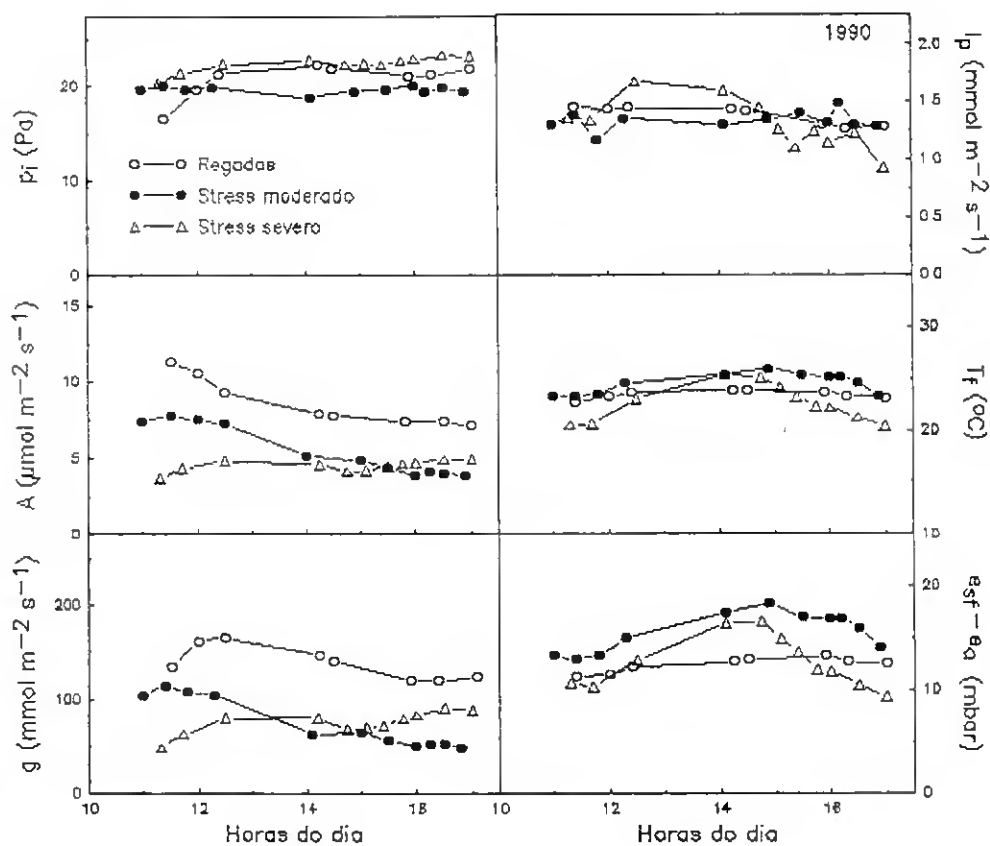


Fig. 58

Varição ao longo do dia da condutância foliar para a difusão do vapor de água (g), taxa de fotossíntese (A), pressão parcial de CO_2 nos espaços intercelulares (p_i), déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar ($e_{sf} - e_a$), temperatura foliar (T_f) e densidade de fluxo fótonico incidente (I_p) em folhas recém-expandidas de *Vitis vinifera* L. mantidas durante o dia numa câmara de ambiente controlado.

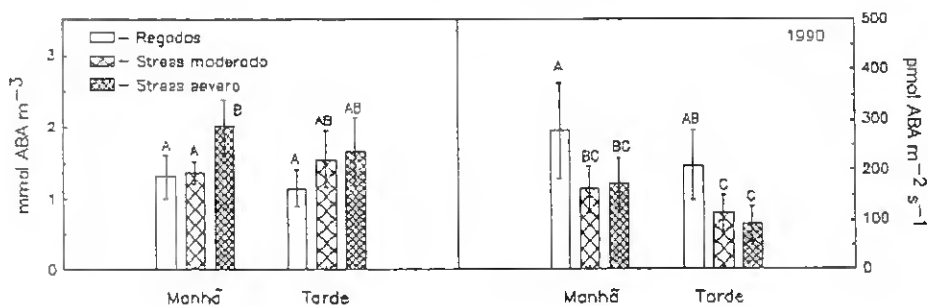


Fig. 59

Concentração de ácido abscísico (ABA) nos exsudados foliares e taxa de transporte daquele composto até à folha. As determinações foram efectuadas nas mesmas folhas em que se procedeu à medição do potencial hídrico e da condutância foliar em condições naturais (fig. 55). Os valores apresentados representam médias de 6 determinações sendo indicado o desvio padrão. As médias significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$; teste SNK) são assinaladas com maiúsculas diferentes.

Na figura 59 são apresentados os valores médios da concentração de ácido abscísico nos exsudados foliares, assim como a taxa de transporte daquele composto até à folha. Apesar

de, tanto de manhã como de tarde, a concentração média de ABA ser inferior nas plantas regadas do que nas plantas não regadas, as diferenças só eram estatisticamente significativas em relação ao valor determinado de manhã nas plantas sujeitas a déficit hídrico severo. Em nenhum dos grupos de plantas se detectou qualquer aumento da concentração de ABA durante a tarde, o mesmo se verificando relativamente à taxa de transporte deste composto (fig. 59).

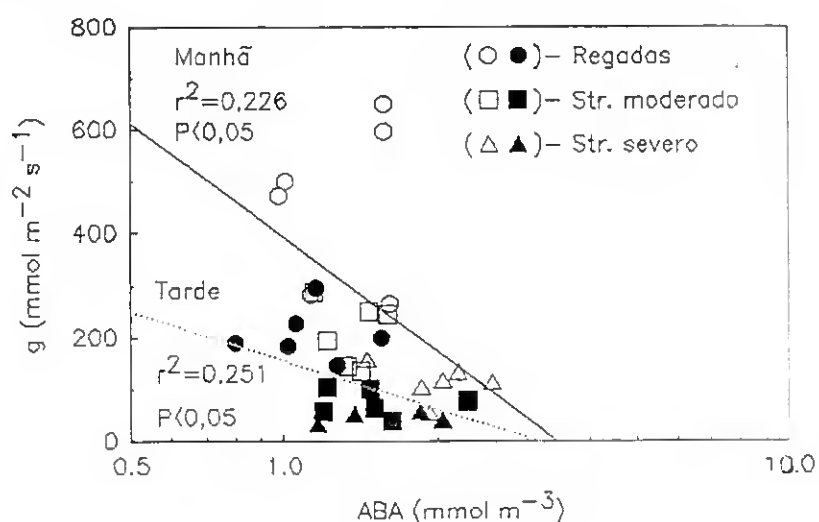


Fig. 60

Relação entre a condutância abaxial (g) e a concentração de ácido abcísico (ABA) nos exsudados de folhas recém-expandidas de *Vitis vinifera* L. em condições naturais. Os símbolos abertos representam as determinações efectuadas de manhã e os símbolos a cheio representam as determinações efectuadas à tarde.

Na figura 60 a condutância foliar é representada em função do logaritmo da concentração de ácido abcísico nos exsudados foliares. A análise de covariância da regressão conjunta (manhã e tarde) entre aquelas variáveis indica que elas se encontravam relacionadas ($F_{[1,33]}=8,05$; $P<0,01$), o mesmo se verificando quando se consideravam separadamente as determinações efectuadas de manhã ($F_{[1,16]}=4,67$; $P<0,05$) e de tarde ($F_{[1,16]}=5,35$; $P<0,05$). Contudo, a relação diferia entre os dois períodos do dia: apesar do declive não ser significativamente diferente ($F=1,41$; n.s.), a intercepção nas ordenadas era maior de manhã do que à tarde ($F=16,02$; $P<0,01$). Ou seja, quando se representa a condutância foliar em função da concentração de ABA nos exsudados foliares, verifica-se que, para uma dada concentração daquele regulador de crescimento, a condutância à tarde era inferior à da manhã (fig. 60).

Apesar da correlação entre a condutância foliar e a concentração de ABA ser estatisticamente significativa, em ambos

os períodos do dia, a variação da concentração daquele regulador de crescimento só permitia explicar pouco mais de 20% das diferenças de condutância foliar entre plantas com diferente disponibilidade de água no solo (fig. 60).

As diferenças de condutância entre tratamentos também não podiam ser explicadas com base na taxa de transporte do ácido abscísico: em virtude de serem pequenas as diferenças de concentração de ABA entre tratamentos e de a taxa de transpiração ser significativamente inferior nas plantas não regadas (fig. 55), as plantas regadas apresentavam uma taxa média de transporte de ABA para a folha superior à das plantas não regadas (fig. 59).

Contudo, na discussão destes resultados deverá ter-se presente que as concentrações de ABA que foram determinadas, no presente trabalho, nos exsudados foliares de videira (fig. 59) são muito superiores às determinadas noutros trabalhos. Loveys (1984), por exemplo, verificou que a concentração de ABA no xilema de videiras regadas oscilava entre 0,15 e 0,50 mmol m⁻³, tendo Wartinger *et al* (1990) encontrado valores semelhantes em amendoeira. Tais discrepâncias poderão resultar da contaminação floémica dos exsudados foliares analisados no presente trabalho. Contudo, não é possível testar tal hipótese, visto não ter sido determinada a concentração de sacarose nos exsudados recolhidos em 1990, falha essa que será corrigida nos anos seguintes.

3.1.2. 1991

No início das manhãs, dos dois dias de Julho de 1991 em que se efectuaram determinações, a condutância foliar era semelhante nas plantas regadas e nas plantas sujeitas a stress hídrico moderado (fig. 61). Contudo, a condutância foliar destas últimas decrescia acentuadamente ao longo da manhã, daí resultando que, a meio do dia, a condutância não diferia entre os dois grupos de plantas não regadas. Tal como se tinha verificado no ano anterior, logo no início da manhã, a condutância foliar das plantas com menor disponibilidade de água no solo era significativamente inferior à das plantas regadas (fig. 61).

Antes do nascer do Sol, o potencial hídrico foliar das plantas regadas era significativamente superior ao das plantas com menor disponibilidade de água no solo, enquanto que as plantas sujeitas a stress moderado apresentavam um potencial hídrico intermédio ao dos outros dois grupos (quadro XIV). Contudo, de manhã e à tarde as diferenças de Ψ entre os 3 grupos de plantas não eram estatisticamente significativas (fig. 62).

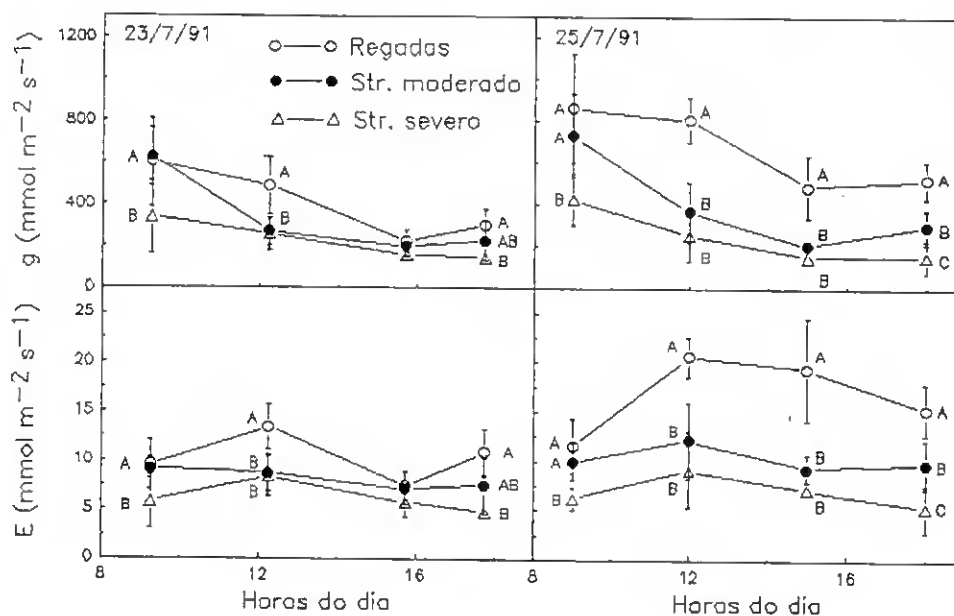


Fig. 61

Condutância (g) e taxa de transpiração (E) da superfície abaxial de folhas recém-expandidas de *Vitis vinifera* L. em condições naturais. Os valores apresentados representam médias de 4 ou 5 determinações, sendo indicado o desvio padrão. Em cada um dos períodos, as médias significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$; teste SNK) são assinaladas com maiúsculas diferentes.

Quadro XIV

Potencial hídrico determinado, antes do nascer do Sol, em folhas recém-expandidas de plantas de *Vitis vinifera* L. regadas, sujeitas a stress hídrico moderado ou stress hídrico severo. Os valores apresentados são médias \pm desvio padrão de 4-6 determinações. Em cada um dos dias, as médias significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$; teste SNK) são assinaladas com maiúsculas diferentes em superscrito.

	Regadas	Stress moderado	Stress severo
23/7/91	$-0,38 \pm 0,07^A$	$-0,42 \pm 0,04^A$	$-0,55 \pm 0,11^B$
25/7/91	$-0,36 \pm 0,04^A$	$-0,46 \pm 0,08^B$	$-0,54 \pm 0,05^B$

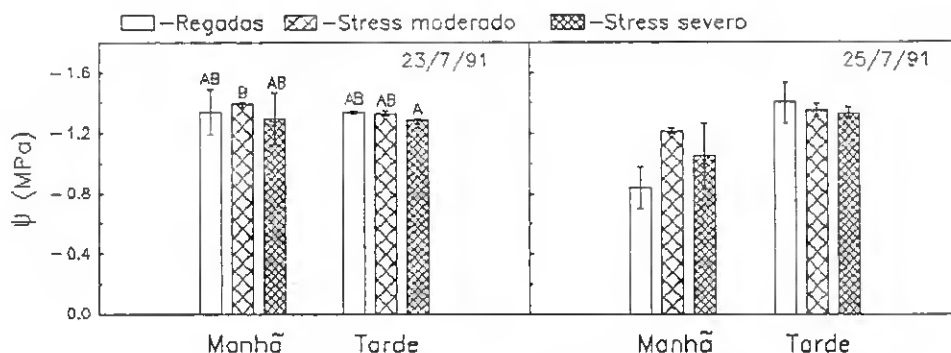


Fig. 62

Potencial hídrico (Ψ) de folhas recém-expandidas de *Vitis vinifera* L. em condições naturais. São apresentadas médias de 3 determinações, sendo indicado o desvio padrão. Em cada um dos dias, as médias significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$; teste de Games & Howell) são assinaladas com maiúsculas diferentes.

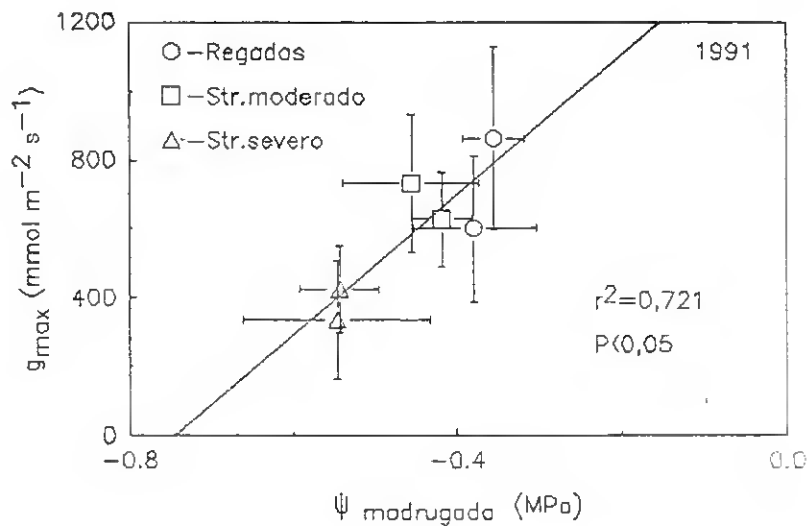


Fig. 63
 Relação entre o potencial hídrico determinado antes do nascer do Sol ($\Psi_{madrugada}$) e a condutância foliar máxima (g_{max}), determinada no início da manhã, em folhas recém-expandidas de *Vitis vinifera* L. em condições naturais.

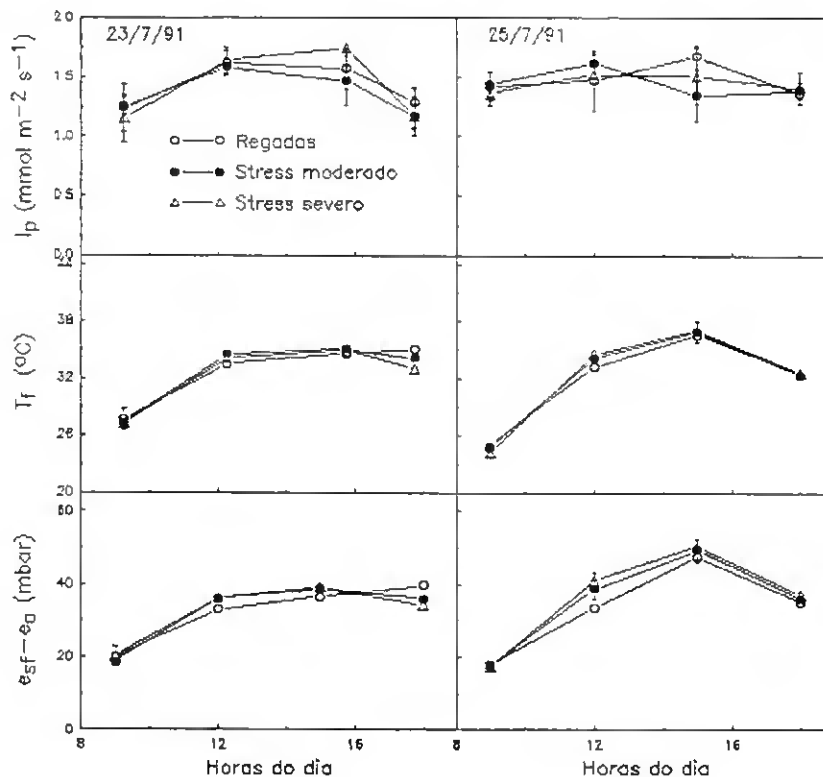


Fig. 64
 Variação da temperatura foliar (T_f), do déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar ($e_{sf}-e_a$) e da densidade de fluxo fotônico incidente (I_p) em folhas de *Vitis vinifera* L. cuja condutância é apresentada na figura 61.

A condutância foliar máxima (determinada no início da manhã) estava positivamente correlacionada com o potencial hídrico foliar determinado antes do nascer do Sol (fig. 63). Contudo, o

decréscimo da condutância ao longo do dia não resultou da diminuição do potencial hídrico foliar. Como se pode verificar na figura 62, o potencial hídrico não diferiu entre a manhã e a tarde do 1º dia de determinações, em qualquer dos grupos de plantas. No 2º dia, apesar de se ter registado um decréscimo de Ψ à tarde (particularmente no caso das plantas regadas), as diferenças não eram estatisticamente significativas. O decréscimo da condutância foliar à tarde também não estava associado a elevadas taxas de transpiração de manhã: apesar das taxas de transpiração máximas terem sido superiores no 2º dia, particularmente no caso das plantas regadas, a condutância mínima determinada à tarde não foi inferior à do 1º dia (fig. 61).

A evolução da condutância foliar ao longo do dia não pode ser explicada com base nas variações da densidade de fluxo fotónico incidente (fig. 64): o encerramento estomático, detectado entre as 9 e as 12 horas da manhã, ocorreu numa altura em que a densidade de fluxo fotónico aumentava (1º dia) ou se mantinha estável no seu valor máximo (2º dia).

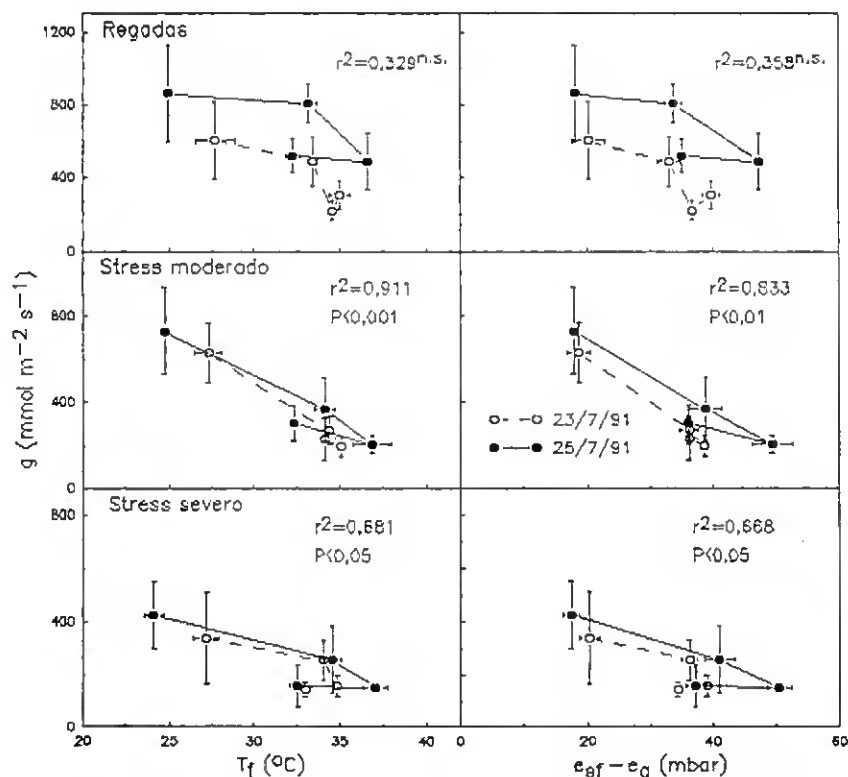


Fig. 65

Relação da condutância foliar (g) de *Vitis vinifera* L. com a temperatura foliar (T_f) e o défice de pressão de vapor entre a folha e o ar ($e_{sf} - e_a$).

Tal como no ano transacto, a temperatura foliar e o défice de pressão de vapor entre a folha e o ar registaram um

significativo aumento da manhã para a tarde (fig. 64). A variação da condutância foliar das plantas não regadas correlacionava-se negativamente com aquelas duas variáveis, mas o mesmo não se verificava nas plantas regadas. Quando a condutância foliar destas últimas plantas é representada em função da temperatura foliar, ou do déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (fig. 65) é evidente uma marcada histeresis nessas relações. Aliás, a análise da figura 65 indica que, também nas plantas não regadas as relações g vs T_f e g vs déficit de pressão de vapor apresentam histeresis, apesar de esta não ser tão acentuada como no caso das plantas regadas.

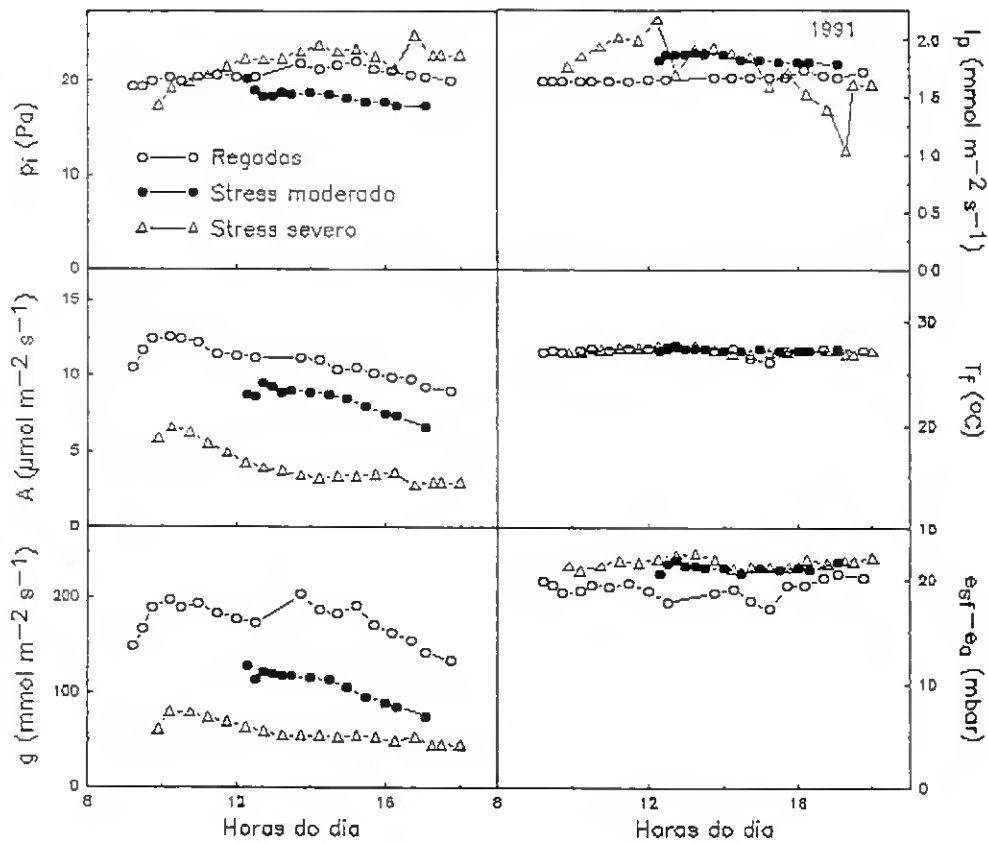


Fig. 66
 Variação da condutância foliar para a difusão do vapor de água (g), taxa de fotossíntese (A), pressão parcial de CO_2 nos espaços intercelulares (p_i), déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar ($e_{sf}-e_a$), temperatura foliar (T_f) e densidade de fluxo fotônico incidente (I_p) em folhas recém-expandidas de *Vitis vinifera* L. mantidas durante o dia numa câmara de ambiente controlado.

Na figura 66 é apresentada a variação ao longo do dia da condutância foliar para a difusão do vapor de água, taxa de fotossíntese e concentração intercelular de CO_2 de folhas mantidas a temperatura e déficit de pressão de vapor entre a folha

e o ar constantes. Apesar da manutenção de uma temperatura moderada, a condutância da folha da planta com menor disponibilidade de água decresceu à tarde para cerca de 60% do valor inicial. Na folha da planta regada, apesar da taxa de fotossíntese decrescer ao longo do dia, a condutância manteve-se estável até às 3 da tarde, mas nas 3 horas seguintes registou um decréscimo de cerca de 30%. A folha da planta sujeita a stress moderado só foi introduzida na cuvete a meio do dia. Mesmo assim foi evidente, ao longo da tarde, um decréscimo de cerca de 40% na condutância foliar. Ou seja, tal como no ano anterior (fig. 58), verificou-se que quando a temperatura e o défice de pressão de vapor entre a folha e o ar eram mantidos em valores moderados, se mantinham os valores relativos de condutância entre os 3 tipos de plantas. Para além disso, apesar de não ser evitado o decréscimo da condutância foliar ao longo do dia, este era menos intenso e ocorria mais tardiamente.

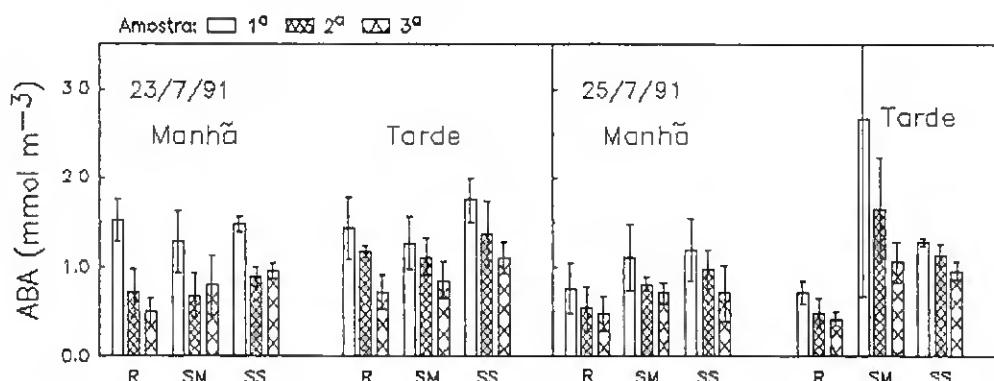


Fig. 67

Concentração de ácido abscísico (ABA) nos exsudados foliares de plantas de *Vitis vinifera* L. regadas (R), sujeitas a défice hídrico moderado (SM) ou stress severo (SS). Os valores apresentados representam médias de 3 determinações, sendo indicado o desvio padrão.

A concentração de ácido abscísico nos exsudados de folhas pressurizadas é apresentada na figura 67. Os valores médios determinados na primeira amostra oscilavam entre 0,75 e 1,75 mmol m⁻³, sendo da mesma ordem de grandeza dos determinados no ano anterior. Contudo, a concentração de ABA decrescia geralmente nas amostras seguintes.

A análise da concentração de açúcares nos exsudados foliares indica que a contaminação de origem celular e/ou floémica pode ser elevada, particularmente nas primeiras amostras recolhidas. Como se pode verificar na figura 68, as concentrações de sacarose e glucose eram superiores a 1 mol m⁻³ nas primeiras amostras recolhidas. Anderson & Brodbeck (1989) detectaram a presença de

glucose e de frutose em exsudados de xilema radicular de Vitis rotundifolia, variando a sua concentração entre 0,05 e 0,20 mol m⁻³. Contudo, aqueles autores não detectaram a presença de sacarose no xilema. Também os dados obtidos por Marangoni et al, (1986) indicam que, em videiras a transpirar, a concentração xilémica de sacarose é negligível. No presente trabalho, a 3ª amostra tinha ainda 0,34 ± 0,19 e 0,26 ± 0,12 mol m⁻³ de glucose e sacarose, respectivamente (fig. 68). Estas concentrações excedem os valores publicados para o xilema de videira, o que poderá significar que estas amostras ainda estarão contaminadas com o conteúdo de células destruídas no acto de corte do pecíolo. As concentrações de glucose e de sacarose estavam estreitamente correlacionadas ($r^2=0,678$, $n=106$, $P<0,001$). Considerando esta relação, a concentração de glucose correspondente a uma concentração zero de sacarose seria de 0,14 mol m⁻³, a qual está dentro da gama de concentrações de glucose que Anderson & Brodbeck (1989) determinaram no xilema de Vitis rotundifolia.

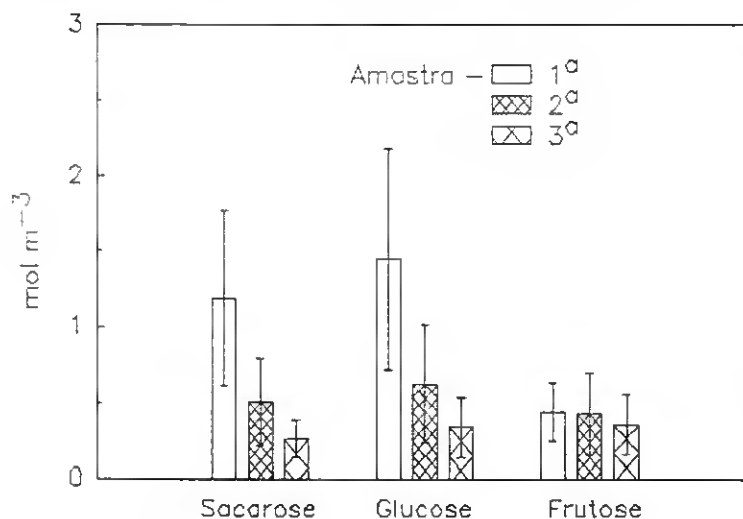


Fig. 68

Concentração de açúcares nos exsudados foliares de Vitis vinifera L. nos quais foi quantificado o ácido abscísico. Os valores apresentados representam médias de 36 determinações, sendo indicado o desvio padrão.

Como já foi referido (cap. III.11), se a presença de sacarose nos exsudados xilémicos for devida a contaminação floémica, então a concentração de ácido abscísico nos exsudados foliares deverá estar correlacionada com a concentração de sacarose nos mesmos, visto que a concentração de ABA no floema é geralmente mais elevada do que no xilema (Zeevaart & Boyer, 1984). Efectivamente, como se pode verificar no quadro XV, a análise de covariância das concentrações de ABA e sacarose indicou que a regressão conjunta (manhã e tarde) era

estatisticamente significativa em ambos os dias e nos 3 grupos de plantas.

Quadro XV

Análise de covariância entre as concentrações de ácido abscísico e de sacarose determinadas, de manhã e de tarde, nos exsudados foliares de *Vitis vinifera* L. São indicados os valores de F referentes às regressões em cada um dos períodos do dia (manhã: F_M ; tarde: F_T) e à regressão conjunta (manhã e tarde: F_C), assim como os valores de F referentes à comparação, entre a manhã e a tarde, do declive (F_b) e da intercepção nas ordenadas (F_Y). Quando os valores de F indicam uma relação, ou uma diferença, estatisticamente significativa são assinalados com * [$P < 0,05$] ou ** [$P < 0,01$].

	F_M	F_T	F_C	F_b	F_Y
23/7/91					
Regadas	9,9*	8,2*	19,7**	0,04	1,61
Stress moderado	5,6*	51,5**	20,6**	0,34	1,26
Stress severo	7,9*	21,5*	29,2**	0,25	2,38
25/7/91					
Regadas	4,3	7,7*	11,2**	0,01	0,00
Stress moderado	9,8*	10,3*	11,2**	5,54*	-
Stress severo	5,6*	6,4*	12,3**	0,00	5,34*

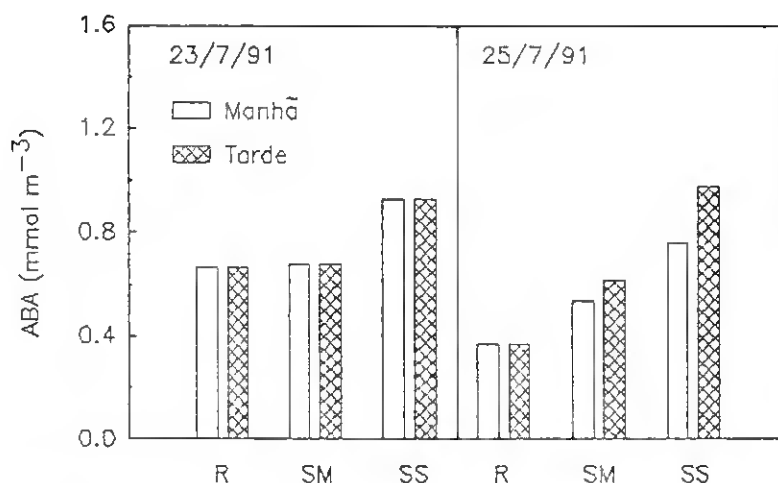


Fig. 69

Concentração de ácido abscísico (ABA) no xilema de plantas de *Vitis vinifera* L. regadas (R) e sujeitas a déficit hídrico moderado (SM) ou severo (SS). A concentração xilémica de ABA foi estimada a partir da intercepção nas ordenadas da relação entre a concentração deste regulador de crescimento e a concentração de sacarose determinada nos mesmos exsudados (cap. III.11).

Considerando que o xilema deverá ser desprovido de sacarose, a intercepção nas ordenadas da relação ABA vs sacarose representa uma estimativa da concentração xilémica de ácido abscísico (cap. III.11). Com exceção das folhas das plantas não regadas, no 2º dia, não foram detectadas diferenças significativas entre os dois períodos do dia, quer no que diz respeito ao declive como à intercepção nas ordenadas daquela relação (quadro XV). Assim,

exceptuando estes dois casos, a concentração de ácido abscísico no xilema (fig. 69) foi estimada a partir da intercepção nas ordenadas da relação ABA vs sacarose, considerando conjuntamente os resultados obtidos nos exsudados recolhidos de manhã e à tarde. No 2º dia, no caso das plantas não regadas, os resultados obtidos nos exsudados colhidos nos dois períodos do dia foram analisados separadamente. Os valores da concentração de ABA no xilema assim estimados são apresentados na figura 69.

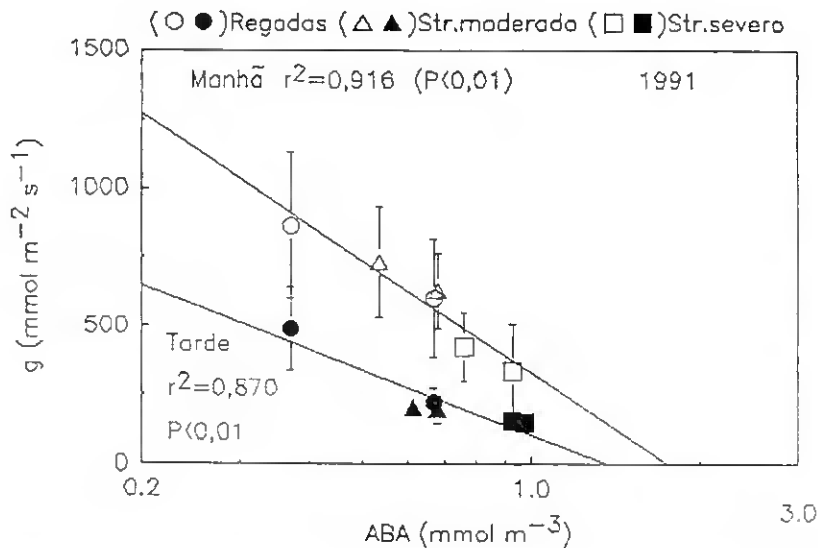


Fig. 70
Relação entre a concentração estimada de ácido abscísico (ABA) no xilema e a condutância abaxial (g) de folhas recém-expandidas de *Vitis vinifera* L. em condições naturais.

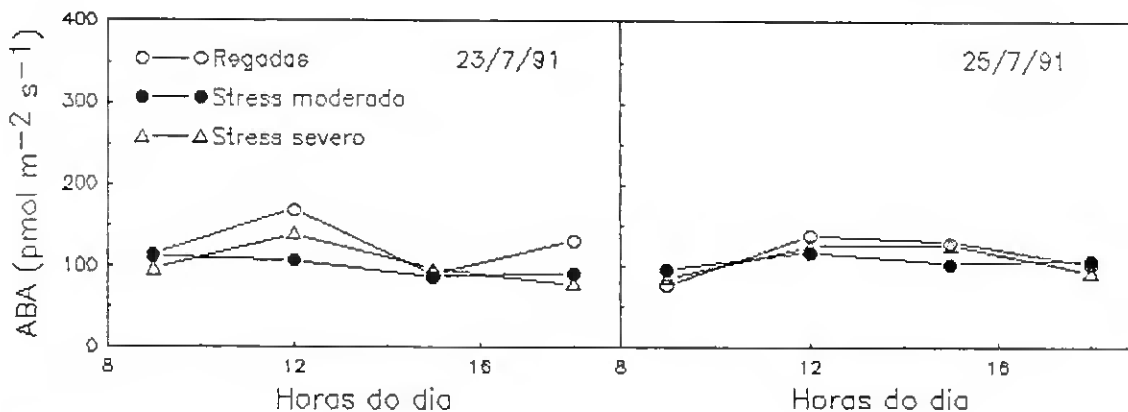


Fig. 71
Variação ao longo do dia da taxa de transporte do ácido abscísico (ABA) através do fluxo transpiratório de folhas recém-expandidas de *Vitis vinifera* L. em condições naturais.

A condutância foliar, determinada no início da manhã e da tarde, estava estreitamente correlacionada com o logaritmo da estimativa da concentração de ácido abscísico no xilema (fig. 70).

Contudo, a relação entre aquelas variáveis era diferente nos dois períodos do dia: a análise de covariância indicou que entre os dois períodos, apesar do declive da relação não ser significativamente diferente ($F_{[1,8]}=5,0$), a intercepção nas ordenadas variava ($F_{[1,9]}=68,4$; $P<0,01$). Daí resulta que, para uma dada concentração de ácido abscísico no xilema, a correspondente condutância foliar era inferior à tarde do que de manhã (fig. 70).

Na figura 71 é apresentada a variação ao longo do dia da taxa de transporte de ABA até à folha, calculada a partir da concentração estimada (fig. 69) e das taxas de transpiração (fig. 61). Em ambos os dias não se detectou qualquer aumento da taxa de transporte de ABA entre a manhã e a tarde. Pelo contrário, nos casos em que ocorreu variação entre os dois períodos do dia a taxa de transporte daquele regulador de crescimento foi menor à tarde. A análise da figura 71 indica também que o aumento da concentração de ácido abscísico no xilema das plantas não regadas foi compensado pelo decréscimo da taxa de transpiração, de tal modo que a redução da disponibilidade de água no solo não resultou no aumento da taxa de transporte daquele regulador de crescimento até às folhas.

3.2. Resposta estomática à aplicação exógena de ácido abscísico

3.2.1. 1991

Na figura 72 são apresentados os resultados obtidos no ensaio de aplicação exógena de ácido abscísico realizado em 1991. A condutância das folhas destacadas de plantas regadas, cujo pecíolo estava imerso em água, era semelhante nos dois períodos do dia: $957 \pm 416 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $815 \pm 129 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, de manhã e de tarde. Contudo, quando uma solução de ABA exógeno, numa concentração correspondente a $0,5 \text{ mmol (+) ABA m}^{-3}$, era introduzida no fluxo transpiratório de folhas destacadas de plantas regadas, a condutância das folhas destacadas a meio do dia era significativamente menor ($352 \pm 7 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) do que a condutância das folhas destacadas no início da manhã ($635 \pm 27 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Estes valores são da mesma ordem de grandeza aos que seriam de esperar considerando a relação entre a condutância foliar de plantas intactas e a concentração endógena de ABA (fig. 70): $339 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ à tarde e $735 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de manhã.

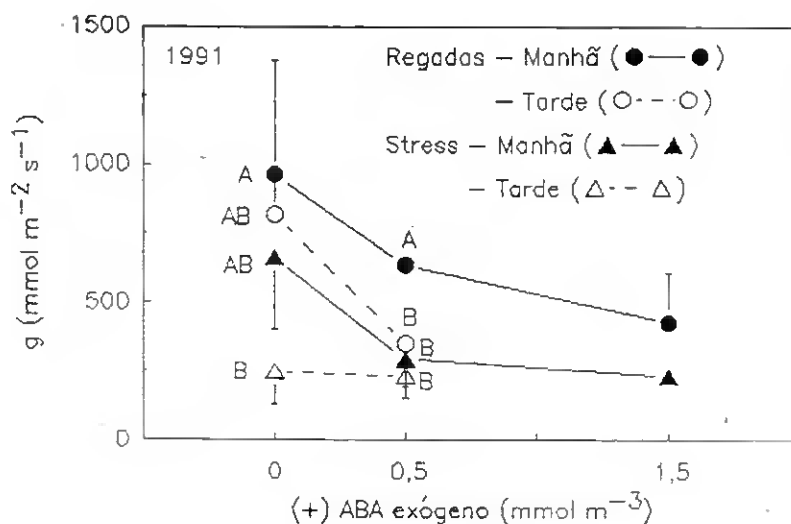


Fig. 72

Condutância abaxial [g] de folhas destacadas, no início da manhã ou a meio do dia [tarde], de plantas de *Vitis vinifera* L. regadas ou sujeitas a déficit hídrico severo [stress]. O pecíolo das folhas estava imerso em água ou em soluções de ABA sintético. Os valores apresentados representam médias de 3 ou 4 determinações, sendo indicado o desvio padrão. Para cada uma das concentrações de ABA, as médias significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$; teste SNK) são assinaladas com maiúsculas diferentes.

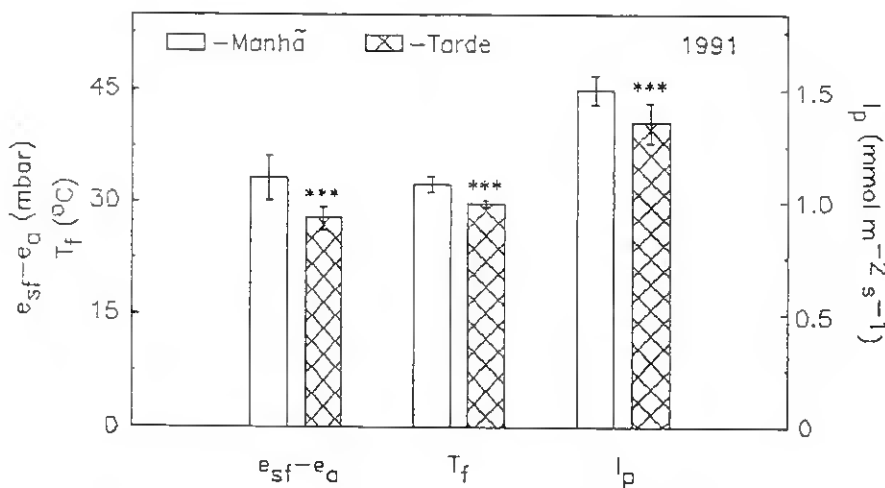


Fig. 73

Temperatura [T_f], déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar ($e_{sf}-e_a$) e densidade de fluxo fotónico incidente [I_p] em folhas destacadas de *Vitis vinifera* L., cuja condutância é apresentada na figura 72. As médias dos dois períodos do dia são significativamente diferentes entre si (***, $P < 0,001$; teste de Student).

O decréscimo da abertura estomática de folhas destacadas à tarde não estava associado ao aumento da temperatura foliar ou do déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (fig. 73). Quanto à densidade de fluxo fotónico incidente, apesar de ter decrescido à tarde, o seu valor médio manteve-se sempre acima dos $1000 \mu\text{mol quanta PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fig. 73).

Quando a concentração de ácido abscísico exógeno, introduzida

no fluxo transpiratório de folhas destacadas de manhã de plantas regadas, era aumentada de 0,5 para 1,5 mmol (+) ABA m⁻³, a condutância foliar diminuía de 635 ± 27 mmol m⁻² s⁻¹ para 429 ± 179 mmol m⁻² s⁻¹ (fig. 72). Caso a concentração de ABA no xilema das folhas destacadas seja igual à concentração da solução exógena, então o decréscimo na taxa de transpiração, resultante da triplicação da concentração exógena de ABA, não foi suficiente para evitar que a taxa de transporte daquele regulador de crescimento aumentasse. Concretamente, a triplicação da concentração de ABA exógeno teria resultado na duplicação da taxa de transporte: de 152 ± 15 para 318 ± 97 pmol (+) ABA m⁻³.

A condutância das folhas destacadas de manhã de plantas com menor disponibilidade de água no solo era inferior à das folhas destacadas de plantas regadas (fig. 72), quer o pecíolo estivesse imerso em água (69%), quer em soluções de ácido abscísico [46% e 54%, respectivamente, no caso de soluções com 0,5 e 1,5 mmol (+) ABA m⁻³]. Para além disso, nas folhas destacadas à tarde de plantas sujeitas a stress hídrico severo a condutância foliar mantinha-se baixa, mesmo quando o pecíolo era imerso em água.

3.2.2. 1992

O ensaio de aplicação exógena de ácido abscísico foi repetido em 1992 em folhas destacadas de plantas regadas e de plantas sujeitas a stress severo. Estas plantas tinham, antes do nascer do Sol, um potencial hídrico foliar de -0,14 ± 0,08 MPa (n=4) e -0,57 ± 0,03 MPa (n=3), respectivamente, no caso das plantas regadas e das plantas não regadas. A condutância foliar máxima (determinada às 9h 30m) era de 416 ± 69 mmol m⁻² s⁻¹ e 144 ± 76 mmol m⁻² s⁻¹, respectivamente, nas plantas regadas e nas plantas com menor disponibilidade de água no solo. Ao longo do dia detectou-se um acentuado decréscimo da condutância: às 15 horas a condutância foliar média decresceu para cerca de 54% (plantas regadas) e 40% (plantas não regadas) do valor determinado de manhã.

Quando as folhas de plantas não regadas eram destacadas e o seu pecíolo imerso em água verificou-se um significativo aumento da condutância foliar, relativamente aos valores determinados, no mesmo período do dia, em folhas não destacadas (fig. 74). Também a condutância das folhas destacadas, à tarde, de plantas regadas aumentou após a imersão do pecíolo em água, apesar de a diferença não ser estatisticamente significativa (fig. 74). Contudo, a referida recuperação da abertura estomática em folhas destacadas,

após imersão do pecíolo em água, foi só parcial. Tal como já se tinha verificado no ano anterior (fig. 72), a condutância das folhas destacadas a meio do dia, tanto das plantas regadas como das plantas sujeitas a stress severo, era inferior à condutância das folhas destacadas no início da manhã; no caso das folhas com o pecíolo imerso em água, a condutância à tarde era cerca de 75% (plantas regadas) e 69% (não regadas) do valor determinado de manhã (fig. 75).

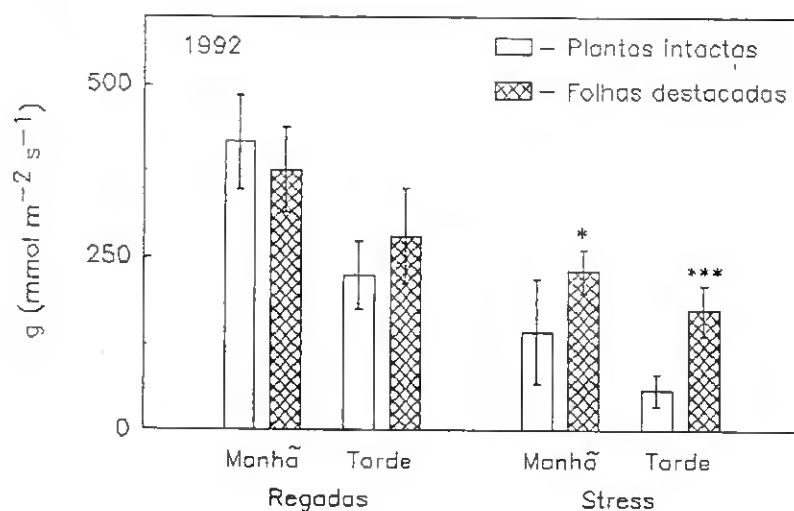


Fig. 74

Comparação entre a condutância abaxial (g) determinada em plantas intactas de *Vitis vinifera* L. e a condutância de folhas destacadas das mesmas plantas, cujo pecíolo se encontrava imerso em água. As médias das folhas destacadas significativamente diferentes [$P < 0,05$; teste de Student] das plantas intactas são assinaladas com * [$P < 0,05$] ou *** [$P < 0,001$].

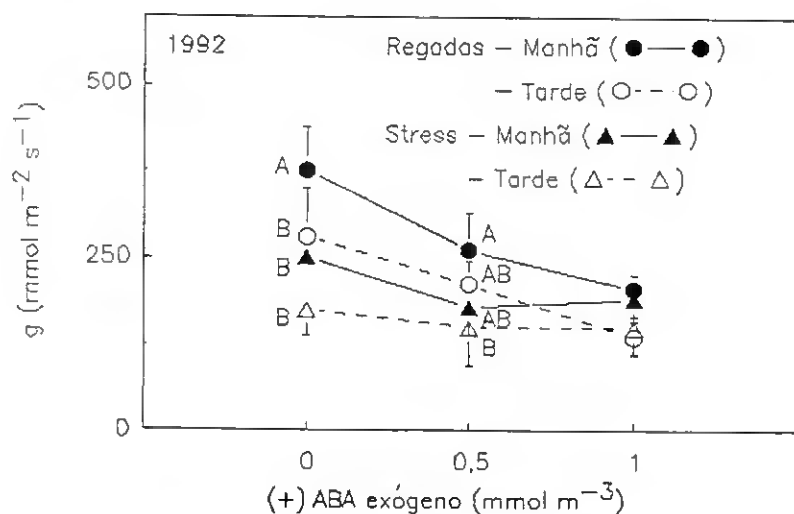


Fig. 75

Condutância abaxial (g) de folhas de *Vitis vinifera* L., destacadas no início da manhã ou a meio do dia (tarde). O pecíolo das folhas estava imerso em água ou em soluções de ácido abscísico sintético e os valores apresentados representam médias de 3 ou 4 determinações, sendo indicado o desvio padrão. Para cada concentração de ABA, as médias significativamente diferentes entre si [$P < 0,05$; teste SNK] são assinaladas com maiúsculas diferentes.

A limitação da abertura estomática nas folhas destacadas à tarde não estava associada à variação da temperatura foliar ou do déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (fig. 76). Também não foram detectadas diferenças de potencial hídrico entre as folhas destacadas de manhã e ao meio dia (fig. 77). Diferenças quanto à densidade de fluxo fotónico incidente também não parecem poder explicar a variação da abertura estomática entre os dois períodos do dia, visto que aquela variável se manteve sempre acima dos $1000 \mu\text{mol quanta PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fig. 76).

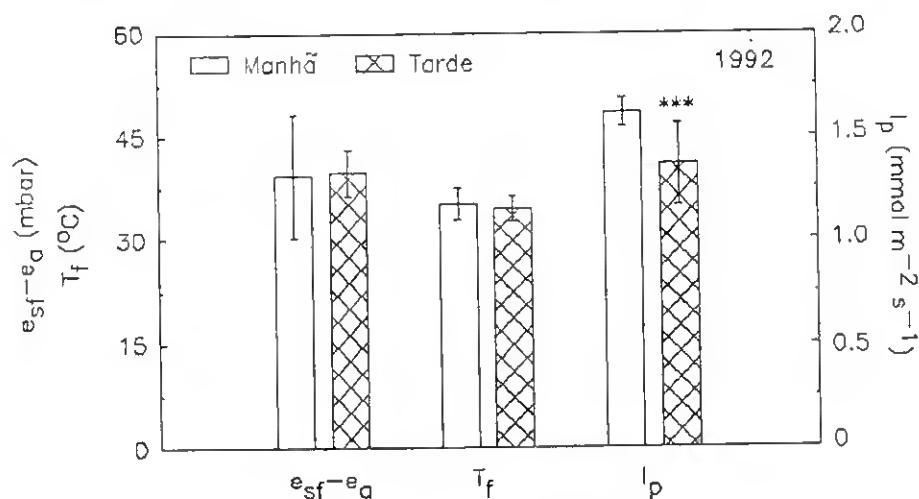


Fig. 76
Temperatura (T_f), déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar ($e_{sf}-e_a$) e densidade de fluxo fotónico incidente (I_p) em folhas destacadas de *Vitis vinifera* L., cuja condutância é apresentada na figura 75. As médias das determinações efectuadas à tarde significativamente diferentes ($P < 0,05$; teste de Student) das médias da manhã são assinaladas: *** [$P < 0,001$].

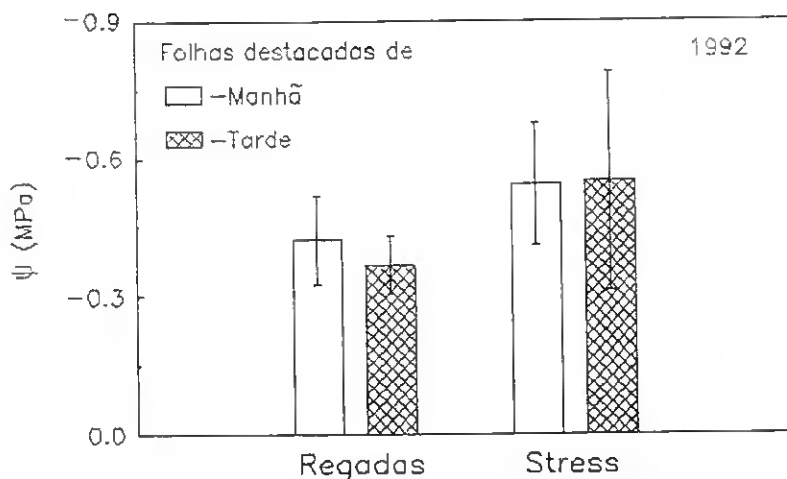


Fig. 77
Potencial hídrico (ψ) das folhas destacadas de *Vitis vinifera* L. nas quais se procedeu à aplicação exógena de ácido abscísico. Os valores apresentado representam médias de 8 determinações, excepto no caso das folhas destacadas à tarde das plantas sujeitas a stress hídrico ($n=4$).

Tal como já se tinha verificado no ano anterior (fig. 72), em ambos os períodos do dia, a condutância das folhas destacadas de plantas não regadas, com o pecíolo imerso em água ou numa solução diluída de ABA, era inferior à das folhas destacadas de plantas regadas em iguais circunstâncias (fig. 75). Com vista a avaliar se a limitação da abertura estomática nas folhas destacadas das plantas sujeitas a stress severo resultaria da manutenção de elevadas concentrações xilémicas de ácido abscísico, foi determinada a concentração deste composto nos exsudados recolhidos das folhas destacadas de manhã nas quais se procedeu ao ensaio de aplicação exógena de ABA. A concentração de ácido abscísico no xilema das folhas destacadas foi estimada a partir da relação entre a concentração deste regulador de crescimento e a concentração de sacarose determinada nas mesmas amostras, tal como se tinha feito no caso das plantas intactas. Como se pode verificar na figura 78, para igual concentração de ABA exógeno, a concentração deste regulador de crescimento no xilema das folhas destacadas de plantas não regadas não era superior à das folhas destacadas de plantas regadas. Por exemplo, nas folhas com o pecíolo imerso numa solução com $0,5 \text{ mmol ABA m}^{-3}$, a concentração xilémica deste regulador de crescimento era de $0,53 \text{ mmol m}^{-3}$ e $0,66 \text{ mmol m}^{-3}$, respectivamente, nas folhas das plantas sujeitas a défice hídrico e nas folhas das plantas regadas (fig. 78). Estes resultados indicam que a limitação da abertura estomática em folhas destacadas de plantas não regadas não resultou da persistência de elevadas concentrações xilémicas de ABA após o destacamento.

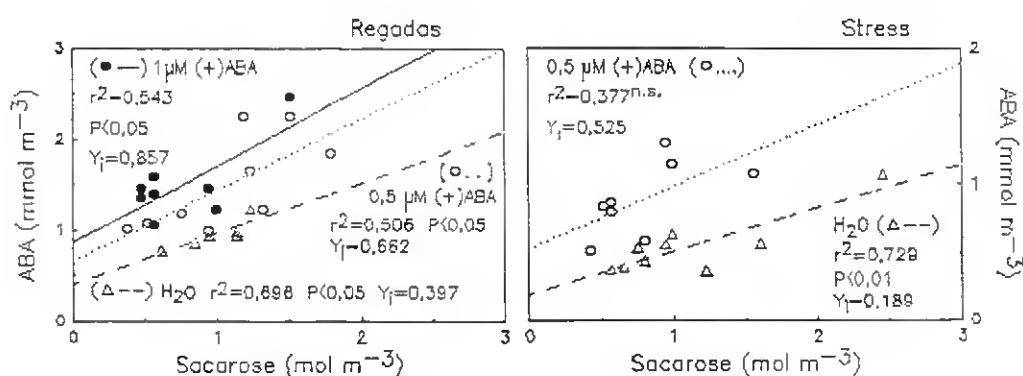


Fig. 78

Relação entre as concentrações de ácido abscísico (ABA) e sacarose determinadas nos exsudados de folhas destacadas de manhã, de plantas regadas e de plantas sujeitas a défice hídrico severo, cujo pecíolo se encontrava imerso em água ou em soluções contendo ácido abscísico sintético. São indicados os valores da intercepção nas ordenadas [Y_i], que constituem uma estimativa da concentração de ABA no xilema não contaminado.

Quando se duplicou a concentração de ABA exógeno fornecida às folhas destacadas de manhã de plantas regadas, o resultante decréscimo da taxa de transpiração foi de somente 20% (de $7,9 \pm 2,1 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para $6,3 \pm 0,8 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Assim, se a concentração de ABA no xilema das folhas destacadas fosse igual à concentração exógena fornecida, o referido decréscimo da taxa de transpiração não teria sido suficiente para evitar o aumento da taxa de transporte do ABA exógeno para a folha. Contudo, a duplicação da concentração exógena não se reflectiu num aumento proporcional da concentração endógena de ácido abscísico (fig. 78): quando a concentração exógena de ABA foi duplicada, de $0,5$ para $1,0 \text{ mmol m}^{-3}$, a concentração daquele regulador de crescimento no xilema das folhas destacadas de plantas regadas aumentou somente em de cerca de 30% (de $0,66$ para $0,86 \text{ mmol m}^{-3}$). Assim, quando a taxa de transporte de ABA é calculada a partir da concentração endógena determinada nas folhas destacadas de manhã das plantas regadas, verificou-se que a resposta de encerramento estomático foi suficientemente intensa para que a variação na taxa de transporte daquele composto não fosse estatisticamente significativa: $77 \pm 15 \text{ pmol ABA m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nas folhas com o pecíolo imerso em água, 94 ± 25 e $97 \pm 13 \text{ pmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, nas folhas com o pecíolo imerso em soluções com $0,5$ e $1,0 \text{ mmol m}^{-3}$ de ácido abscísico exógeno.

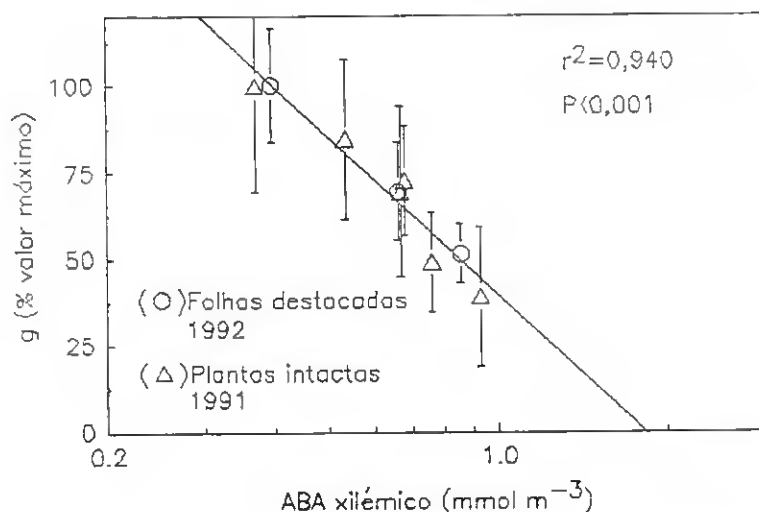


Fig. 79
Relação entre a limitação da condutância foliar (g) e a concentração xilémica de ácido abscísico (ABA), determinada de manhã, em 1991, em plantas intactas de *Vitis vinifera* L. com diferente disponibilidade de água no solo e em folhas destacadas, no início da manhã, de plantas regadas [1992].

Para possibilitar a comparação dos resultados da aplicação exógena de 1992 com a resposta estomática ao aumento da

concentração endógena de ABA determinada em 1991 em plantas intactas, a condutância foi expressa em valor relativo da condutância foliar máxima determinada em cada um dos casos: condutância determinada no início da manhã do dia 25/7/91 em folhas de plantas regadas (fig. 61) e condutância de folhas destacadas de manhã de plantas regadas (fig. 75), folhas estas cuja concentração xilémica de ABA era semelhante (fig. 69 e 78). Quando a condutância é expressa deste modo e representada em função da concentração de ácido abscísico no xilema (fig. 79), verifica-se uma estreita coincidência entre a relação determinada de manhã em plantas intactas (1991) e a resposta à aplicação de ABA exógeno em folhas destacadas, de manhã, de plantas regadas (1992). Ou seja, a aplicação exógena de ABA a folhas destacadas de plantas regadas reproduziu a resposta estomática de plantas intactas ao aumento da concentração endógena de ácido abscísico que estava associada à redução da disponibilidade de água no solo.

4. Discussão

A análise dos dados experimentais recolhidos no presente trabalho sugere que causas distintas poderão estar na origem do decréscimo ao longo do dia da condutância estomática de Vitis vinifera e das diferenças de condutância associadas à variação da disponibilidade de água no solo.

A correlação detectada de manhã entre a condutância foliar e o potencial hídrico determinado antes do nascer do Sol (fig. 63), sugere que a disponibilidade de água no solo determinará a condutância estomática máxima. Contudo, a limitação da abertura dos estomas durante a tarde, tanto em plantas intactas (fig. 55 e 61), como em folhas destacadas (fig. 72 e 75) não resultou do decréscimo de Ψ (fig. 55, 64 e 77).

Estes resultados indicam que o decréscimo da abertura estomática verificado à tarde não resultou do desenvolvimento de défice hídrico foliar, mas não permitem excluir a hipótese de a depressão da condutância durante a tarde estar associada ao desenvolvimento de défice hídrico em zonas localizadas da folha (nomeadamente ao nível da epiderme), as quais poderiam não ser detectadas quando o potencial hídrico é medido pela câmara de pressão. O aparecimento de zonas localizadas de défice hídrico foliar, nomeadamente ao nível da epiderme, poderá resultar da existência de resistências internas ao transporte de água na planta e da ocorrência de elevadas taxas de transpiração durante

a manhã. Contudo, em 1991 verificou-se que, apesar das taxas de transpiração máximas terem sido superiores no 2º dia, as condutâncias foliares mínimas determinadas à tarde não foram inferiores às do 1º dia (fig. 61). Estes resultados não são consistentes com a hipótese de a depressão da condutância estomática à tarde resultar do desenvolvimento de déficit hídrico localizado, pois se fosse essa a causa do encerramento dos estomas, seria de esperar que a condutância mínima (determinada à tarde) se encontrasse negativamente correlacionada com a taxa de transpiração registada de manhã (Raschke & Resemann, 1986).

A limitação da abertura estomática detectada durante a tarde, tanto em plantas intactas (fig. 55 e 61), como em folhas destacadas (fig. 72 e 75), não parece ter resultado de variações da densidade de fluxo fotónico incidente. Chaves *et al* (1987) e Downton *et al* (1987) verificaram que a condutância estomática de *Vitis vinifera* não era limitada quando a densidade de fluxo fotónico decrescia de 1500 para 1000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No presente trabalho a condutância foliar foi sempre determinada acima dos 1000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fig. 55, 64, 73 e 76), pelo que não é plausível que esta variável esteja na origem da limitação da abertura estomática registada à tarde.

Os resultados obtidos em 1990, relativamente à variação diurna da condutância de folhas em condições naturais (fig. 57), sugerem uma estreita associação entre o encerramento estomático ao longo do dia e o aumento da temperatura foliar e do déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar. Contudo, a condutância das folhas destacadas à tarde era inferior à das folhas destacadas de manhã, mesmo quando os valores médios da temperatura foliar e do déficit de pressão de vapor folha-ar determinados à tarde eram iguais ou inferiores aos da manhã (fig. 73 e 76). Por outro lado, em 1992 foi detectada uma marcada histeresis tanto na relação entre a condutância foliar e o déficit de pressão de vapor folha-ar como na relação g vs T_f (fig. 65), tal como tinha sido observado anteriormente em *Eucalyptus globulus* (Pereira *et al*, 1987). Também Chaves *et al* (1987) tinham detectado histeresis na relação entre a taxa de fotossíntese e a temperatura foliar de duas outras cultivares de videira. Estes resultados indicam que, mesmo que o decréscimo da condutância seja desencadeado pelo aumento da temperatura foliar e/ou decréscimo da humidade do ar, daí resultará uma inibição da capacidade de abertura dos estomas que não é imediatamente reversível pela redução da temperatura e do déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar.

O facto de a condutância foliar estar correlacionada com o

défice de pressão de vapor folha-ar e com a temperatura foliar não implica, por si só, que tal relação seja causal. Caso o encerramento estomático durante a tarde represente um resposta ao aumento daquelas duas variáveis, então a condutância foliar deveria manter-se inalterável estando as folhas em condições constantes de temperatura e défice de pressão de vapor moderados ao longo do dia. Contudo, a análise das trocas gasosas de folhas mantidas a temperatura moderada durante o dia (fig. 58 e 66) indica que as elevadas temperaturas e défice de pressão de vapor entre a folha e o ar podem contribuir para acentuar e acelerar o decréscimo da condutância ao longo do dia, mas não constituem a sua causa única.

Como se pode verificar na figura 70, quando se analisavam separadamente as determinações efectuadas de manhã e de tarde, a condutância foliar estava estreitamente correlacionada com a concentração de ABA no xilema. Estes resultados sugerem que as diferenças de condutância associadas à diminuição da disponibilidade de água no solo resultarão do aumento da concentração xilémica de ácido abscísico. Contudo, a acumulação de ABA no xilema das plantas não regadas não se traduziu no incremento da taxa de transporte daquele composto até às folhas (fig. 71), o que indica que a supressão da rega não resultou num aumento da quantidade absoluta de ácido abscísico proveniente das raízes. Este facto pode significar que o aumento registado na concentração daquele composto no xilema das plantas não regadas será o resultado da diminuição do efeito diluidor do fluxo de água.

Tardieu et al (1992a) verificaram, em plantas de milho em condições de campo, que o aumento da concentração xilémica de ABA e o encerramento dos estomas só eram detectáveis quando a secagem do solo era suficientemente intensa para que ocorresse um decréscimo significativo na capacidade de absorção de água pelas raízes. Estas observações levaram aqueles autores a sugerir que a diluição do ABA xilémico pelo fluxo de água através das raízes contribuiria para que a condutância estomática estivesse em sintonia com os fluxos de água através do sistema radicular, dependentes não só do estado hídrico do solo como da condutância hidráulica do sistema radicular. Contudo, esta hipótese só é válida se as células guarda responderem exclusivamente à concentração de ácido abscísico no xilema, não dependendo a resposta estomática da taxa de transporte daquele composto. A validação desta hipótese requer também a demonstração de que a resposta de fecho estomático induzida pelo aumento da

concentração de ABA no xilema é suficientemente intensa para manter constante a taxa de transporte daquele composto, apesar do aumento na sua concentração.

Os resultados do 1º ensaio de aplicação exógena de ácido abscísico em folhas destacadas poderiam sugerir que a resposta de encerramento dos estomas, desencadeada por aquele composto, não era suficientemente intensa para evitar o aumento da taxa de transporte de ABA exógeno para as folhas. No entanto, quando se compara a relação entre a condutância foliar e a concentração de ABA endógeno com a resposta estomática de folhas destacadas, deverá ter-se em consideração o facto de a concentração mais elevada de ABA exógeno que foi aplicada ($1,5 \text{ mmol m}^{-3}$) estar fora da gama de concentrações endógenas estimadas nestas plantas (fig. 69). Este facto, segundo (Trewavas, 1991; Trewavas & Jones, 1991), dificulta a interpretação dos resultados, visto que a sensibilidade estomática para o ácido abscísico varia com a concentração deste composto. Segundo os mesmos autores, a ausência de dados experimentais relativos à concentração endógena, resultante da manipulação da concentração exógena, pode também limitar a interpretação dos resultados. No segundo ensaio o ABA exógeno só foi aplicado na gama de concentrações determinadas no xilema de plantas intactas e foi estimada a concentração de ácido abscísico no xilema das folhas destacadas. Os dados obtidos indicam que a aplicação exógena de ABA, em folhas destacadas de manhã de plantas regadas, é capaz de reproduzir a resposta estomática de plantas intactas à variação da concentração endógena daquele regulador de crescimento (fig. 79).

Visto que a relação entre a condutância foliar e a concentração de ABA endógeno era igual nas plantas regadas e nas plantas sujeitas a défice hídrico (fig. 70), seria de esperar que as folhas destacadas destas últimas tivessem uma resposta estomática à aplicação exógena de ABA semelhante à das folhas destacadas de plantas regadas. Contudo, tal não se verificou (fig. 72 e 75).

O destacamento foliar e imersão do pecíolo em água resultou no aumento da condutância das folhas de plantas não regadas (fig. 74), o que indica que a abertura estomática estaria limitada pela presença de um inibidor da abertura estomática (eventualmente o ácido abscísico) no fluxo transpiratório de plantas intactas. Contudo, a referida reabertura dos estomas foi apenas parcial não sendo suficiente para anular as diferenças de condutância foliar entre as plantas com diferente disponibilidade de água no solo

(fig. 72 e 75). A limitação da condutância foliar das plantas não regadas, mesmo quando não era fornecido ABA exógeno, poderá indicar que a abertura dos estomas seria também limitada pela carência de um ou mais compostos promotores da abertura estomática. Mas a reduzida condutância das folhas destacadas de plantas não regadas pode também resultar da alteração do processo de compartimentação intracelular do ABA. A concentração de ácido abscísico no apoplasto foliar não depende só da sua concentração a montante. Radin & Hendrix (1988) verificaram que a experiência de stress hídrico resultava num aumento da proporção do ácido abscísico, transportado no fluxo transpiratório, que permanecia no apoplasto foliar. O facto de a condutância das folhas destacadas à tarde de plantas com menor disponibilidade de água no solo ser praticamente igual no caso de o pecíolo estar imerso em água ou numa solução com $0,5 \text{ mmol m}^{-3}$ de (+) ABA (fig. 72), poderia eventualmente resultar de as folhas com o pecíolo em água manterem uma concentração apoplástica de ácido abscísico endógeno relativamente elevada, pelo que seria limitado o aumento resultante da aplicação exógena. Contudo, a análise da concentração de ABA no xilema das folhas destacadas, nas quais se procedeu ao 2º ensaio de aplicação exógena daquele composto, indica que a persistência da limitação da abertura dos estomas das folhas destacadas de plantas sujeitas a stress hídrico não resultou da manutenção de elevados níveis apoplásticos de ABA (fig. 78).

Como foi referido anteriormente (cap. II.2.3.), a experiência de défice hídrico pode acentuar a resposta estomática para o ácido abscísico (Davies, 1978; Ackerson, 1980; Wilson, 1981; Radin & Hendrix, 1988; Henson & Turner, 1991). Ackerson (1980), por exemplo, verificou que a quantidade de ABA necessária para desencadear o encerramento dos estomas de algodoeiro era inferior nas plantas que tinham sofrido previamente um período de défice hídrico do que naquelas que tinham sido sempre regadas. Segundo Trewavas (1991) e Trewavas & Jones (1991) a resposta estomática ao ácido abscísico deverá ser proporcional ao inverso do número de receptores hormonais existentes no plasmalema das células guarda. A diminuição da concentração mínima de ABA capaz de afectar a abertura estomática poderia assim resultar, por hipótese, do aumento do número de receptores do ácido abscísico ao nível das células guarda. Tais alterações só ocorreriam em resposta à exposição prolongada de elevadas concentrações daquele regulador de crescimento, sendo admissível que os seus efeitos persistam por algum tempo após o retorno da concentração de ABA

aos valores pré-stress. Apesar desta hipótese ser capaz de explicar a persistência da limitação da abertura estomática em folhas destacadas de plantas não regadas, ela carece de validação experimental. Efectivamente não existem dados experimentais relativamente aos eventuais efeitos do défice hídrico prolongado e da acumulação de ácido abcísico sobre o número de receptores desta hormona ao nível do plasmalema das células guarda.

Tanto o défice hídrico (Hubac et al, 1989), como o ácido abcísico (Stillwell & Hester, 1984; Leshem et al, 1990) podem afectar a composição e estrutura das membranas, bem como a expressão de alguns genes (Bray, 1991). No caso do ABA, existem dados experimentais recentes que demonstram que este composto afecta a expressão de genes que codificam enzimas associadas à biogénese membranar (Hughes et al, 1992). Se a biogénese das membranas das células guarda for afectada pelo défice hídrico e pelo ABA, é provável que daí resultem modificações ao nível dos processos de transporte através das membranas, dos quais depende a abertura estomática. Segundo Raschke (1987), também as propriedades mecânicas da parede celular das células guarda serão afectadas pela acumulação prolongada de ácido abcísico. A confirmarem-se tais hipóteses isso poderia contribuir para explicar a persistência da limitação da abertura estomática em folhas destacadas de plantas não regadas, visto não ser plausível que alterações da estrutura da parede e das membranas sejam revertidas instantaneamente pela remoção do agente que as desencadeou, por hipótese o ácido abcísico.

Relativamente ao decréscimo da condutância estomática de Vitis vinifera à tarde, foi anteriormente sugerido que tal facto poderia estar associado à ocorrência de fotoinibição ao nível do mesófilo (Correia et al, 1990). Já anteriormente Wong et al (1985) tinham constatado que a condutância estomática de Phaseolus vulgaris e Eucalyptus pauciflora decrescia quando as folhas eram fotoinibidas. O mecanismo pelo qual a condutância estomática seria afectada pela ocorrência de fotoinibição no mesófilo não foi identificado. Contudo, num trabalho recente (Lee & Bowling, 1992) obtiveram-se dados experimentais que indicam que as amplas aberturas estomáticas estarão dependentes da produção pelos cloroplastos de um produto fotossintético solúvel (não identificado) que será transportado até às células guarda onde promoverá a abertura dos estomas. Noutros trabalhos verificou-se que o decréscimo da condutância estomática ao longo do dia estava associado à ocorrência de fotoinibição ao nível do mesófilo, não só em Vitis vinifera (Correia et al, 1990; Quick et al, 1992),

como noutras espécies do mesmo género (Gamon & Pearcy, 1990). No entanto, não é possível concluir se tal também se terá verificado no presente trabalho. Apesar da manutenção de uma concentração intercelular de CO₂ constante (fig. 58 e 66), poder indicar que a condutância estomática e a capacidade fotossintética terão decrescido em paralelo, há que ter presente que a videira é uma das plantas onde foi demonstrada a ocorrência de fecho não uniforme dos estomas, fenómeno estes que pode resultar na sobrestimação da concentração intercelular de CO₂ (Terashima, 1992).

Burschka et al (1983) sugeriram que o decréscimo da condutância estomática ao longo do dia resultaria da libertação de ABA no apoplasto foliar. Contudo, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o encerramento dos estomas ao longo do dia não resultará da acumulação apoplástica de ácido abscísico (fig. 59 e 69). Também Wartinger et al (1990) não detectaram, ao longo do dia, aumentos significativos da concentração de ABA no xilema de amendoeira em condições de campo. Num outro trabalho, em que foram estudadas plantas de milho em condições de campo, Tardieu et al (1992a) verificaram mesmo que a concentração xilémica de ácido abscísico durante o dia era inferior à determinada antes do nascer do Sol, facto que atribuíram ao efeito diluidor do fluxo transpiratório.

Tal como Tardieu & Davies (1992) e Tardieu et al (1992b) já tinham constatado em plantas de milho, a relação entre a condutância foliar e a concentração de ácido abscísico no xilema de Vitis vinifera alterou-se ao longo do dia (fig 70), sendo as condutâncias foliares determinadas à tarde inferiores aos valores matinais para a mesma concentração de ABA. Estas diferenças de comportamento estomático entre os dois períodos do dia verificavam-se também quando da aplicação exógena de ácido abscísico em folhas destacadas (fig. 72 e 75), apesar de a temperatura foliar e o défice de pressão de vapor folha-ar não terem aumentado à tarde (fig. 73 e 76).

Loveys (1984) concluiu que o parâmetro mais adequado para explicar a variação ao longo do dia da condutância estomática de Vitis vinifera não era a concentração apoplástica de ácido abscísico mas sim a sua taxa de transporte para a folha, a qual depende não só da concentração daquele composto no xilema como da taxa de transpiração das folhas. Contudo, no presente trabalho, a taxa de transporte de ABA não aumentou à tarde relativamente ao valor determinado de manhã (fig. 71). Assim, estes resultados não permitem explicar as diferenças de condutância estomática

registadas entre os dois períodos do dia com base na variação da taxa de transporte do ácido abscísico até à folha.

Tardieu & Davies (1992) sugeriram que o decréscimo, ao longo do dia, do potencial hídrico foliar, ou epidérmico, estaria na origem da amplificação dos efeitos inibitórios do ácido abscísico durante a tarde. No presente trabalho, não foi detectado qualquer decréscimo estatisticamente significativo do potencial hídrico foliar entre os períodos de medida da condutância de manhã e de tarde (fig. 55, 64 e 77). Diferenças de potencial hídrico foliar não parecem assim estar na origem da variação ao longo do dia da relação entre a condutância foliar de Vitis vinifera e o ABA existente no apoplasto foliar.

A partir dos dados disponíveis não é possível avaliar a hipótese de variações do potencial hídrico epidérmico estarem na origem da alteração da resposta estomática ao ácido abscísico ao longo do dia. Não diminuindo significativamente o potencial hídrico foliar global, só poderia ocorrer um decréscimo do potencial ao nível da epiderme caso se verificasse um aumento da resistência foliar ao fluxo de água ou da taxa de transpiração. Esta última, como se pode verificar nas figuras 55 e 61, era da mesma ordem de grandeza nos dois períodos do dia, visto o aumento do défice de pressão de vapor entre a folha e o ar ter sido compensado pela diminuição da condutância foliar. Quanto à hipótese de a resistência foliar ao transporte de água aumentar, foi detectado em vários trabalhos um aumento da resistência hidráulica, ao longo do dia, tanto ao nível de raízes (Liu *et al.*, 1878), como de caules (Schultz & Matthews, 1988, Salleo & LoGullo, 1989) de plantas do género Vitis. Apesar de não existirem dados experimentais que tal também ocorra ao nível das folhas, não pode ser excluída a hipótese de a resistência ao transporte de água, do xilema para a epiderme, aumentar ao longo do dia, daí resultando o decréscimo do potencial hídrico da epiderme e o aumento da sensibilidade estomática para o ácido abscísico existente no apoplasto.

Contudo, a variação do potencial hídrico na epiderme pode não ser a única causa da alteração da relação entre a condutância foliar e a concentração de ABA no xilema (fig. 70). Flutuações diurnas da concentração de citocininas (Fußeder *et al.*, 1992), de iões cálcio e do pH (Anderson & Brodbeck, 1989) foram detectadas no xilema de plantas crescendo em condições naturais. Contudo, estas variáveis não foram quantificadas no presente trabalho, pelo que não é possível avaliar o seu eventual envolvimento no encerramento dos estomas de Vitis vinifera ao longo do dia.

5. Conclusões

No seu conjunto, os resultados obtidos em plantas intactas indicam que as diferenças de condutância foliar entre plantas de videira com diferente disponibilidade de água no solo podem ser explicadas com base na variação da concentração de ácido abscísico no xilema. Esta conclusão é reforçada pelo facto de a aplicação de ABA exógeno a folhas destacadas de plantas regadas ter reproduzido a resposta estomática de plantas intactas à variação da concentração endógena daquele regulador de crescimento. Contudo, a limitação da abertura estomática nas plantas com menor disponibilidade de água no solo não foi completamente revertida pela diminuição da concentração de ácido abscísico, o que sugere que a manutenção prolongada de elevadas concentrações deste composto poderá desencadear alterações estruturais ao nível das células guarda que não serão reversíveis a curto prazo. Quanto ao decréscimo da condutância estomática ao longo do dia verificou-se que não resultou do aumento da concentração de ácido abscísico no apoplasto, parecendo estar associado a uma limitação progressiva da capacidade de abertura dos estomas, cuja causa não foi identificada e que se mantinha mesmo em folhas destacadas e com o pecíolo imerso em água.

VII. CONCLUSÕES GERAIS

Dos resultados obtidos no presente trabalho podem tirar-se as seguintes conclusões:

Em muitas circunstâncias a abertura estomática encontra-se mais estreitamente relacionada com o estado hídrico das raízes do que com o das folhas. Isto verificou-se quando se procedeu à desidratação parcial do sistema radicular de Commelina communis e quando plantas envasadas de Lupinus albus foram sujeitas a um processo lento de secagem do solo, bem como em plantas de Vitis vinifera em condições de campo e com diferente disponibilidade de água no solo. Estes resultados indicam que o estado hídrico das raízes poderá afectar directamente o controlo da abertura dos estomas através da transmissão de sinais químicos, de natureza hormonal, das raízes para as folhas. Quanto à natureza dessas mensagens, a análise da resposta estomática de Commelina communis ao destacamento parcial do sistema radicular indicou que o encerramento dos estomas desencadeado pela desidratação das raízes não pode ser explicado recorrendo exclusivamente à intervenção de mensagens positivas ou de mensagens negativas e/ou cumulativas, pois os vários tipos parecem participar no sistema de regulação da abertura estomática pelo estado hídrico das raízes.

O encerramento estomático desencadeado pela desidratação do solo foi acompanhado pela acumulação de ácido abscísico na solução xilémica das três espécies nas quais se procedeu à quantificação da concentração xilémica daquele regulador de crescimento: Helianthus annuus, Lupinus albus e Vitis vinifera. Em situações de défice hídrico moderado e de curta duração, os estomas reabriam quando o ácido abscísico era removido do fluxo transpiratório através do destacamento das folhas e imersão do seu pecíolo em água. Por outro lado, a aplicação de ABA exógeno a folhas destacadas de plantas regadas reproduziu a resposta dos estomas de plantas intactas à variação da concentração endógena daquele regulador de crescimento. Estes resultados indicam que a acumulação de ABA no xilema de plantas sujeitas a défice hídrico moderado é suficiente para explicar o decréscimo observado na condutância foliar. Contudo, quando a desidratação das raízes se acentua e/ou prolonga, sendo a actividade e integridade do sistema radicular severamente afectadas, o fecho dos estomas não pode ser explicado exclusivamente com base no aumento da

concentração xilémica de ácido abscísico. Nessas circunstâncias, a abertura dos estomas deverá ser limitada por alterações estruturais ao nível das células guarda, desencadeadas pela acumulação prolongada de ácido abscísico e/ou pela escassez de promotores da abertura dos estomas. Tais modificações não são reversíveis, pelo menos a curto prazo, pelo destacamento das raízes secas, tal como se verificou em plantas de Commelina communis. Também a remoção do ácido abscísico do fluxo transpiratório, ou a aplicação exógena de citocininas, não resultaram na recuperação de amplas condutâncias estomáticas em folhas destacadas de plantas de Lupinus albus sujeitas a déficit hídrico severo.

Relativamente aos efeitos a posteriori dos défices hídricos sobre a abertura estomática, os resultados em Commelina communis indicaram que estes não resultam da persistência de elevadas concentrações de ABA quer ao nível do mesófilo ou da epiderme abaxial. Em contrapartida, a persistência de elevadas concentrações de ABA no xilema podia explicar o atraso na reabertura dos estomas de Lupinus albus após o alívio de um curto período de déficit hídrico moderado. Contudo, a importância do ácido abscísico para a limitação da abertura estomática parece diminuir quando a desidratação prévia do solo é prolongada e/ou severa. Nessas condições a actividade e integridade das raízes parece ser severamente afectada e o atraso na reabertura dos estomas, após o alívio do déficit hídrico, parece estar associado à persistência de limitações na condutância hidráulica da planta, como se verificou tanto em Commelina communis como em tremoço e girassol. Contudo, isso não se reflectiu na persistência de défices hídricos foliares após a re-hidratação do solo, visto que o aparente decréscimo da condutância hidráulica era compensado pela limitação da condutância estomática e, conseqüentemente, da taxa de transpiração. A referida inibição da abertura estomática durante o alívio de défices hídricos severos não foi revertida, a curto prazo, pela aplicação exógena de citocininas. Este facto não exclui a hipótese de os efeitos a posteriori dos défices hídricos sobre a abertura dos estomas resultarem de limitações à actividade das células guarda induzidas pela escassez prolongada de citocininas (e/ou acumulação de ABA). Pode admitir-se que tais limitações possam estar eventualmente associadas a modificações ao nível da expressão genética e da constituição das células guarda, as quais só serão reversíveis, a médio prazo, após o sistema radicular ter recuperado dos efeitos da desidratação.

Em condições de campo, as diferenças de condutância foliar

entre plantas de videira com diferente disponibilidade de água no solo estavam associadas à variação da concentração xilémica de ácido abscísico. Contudo, o decréscimo da abertura dos estomas ao longo do dia não pôde ser explicado pela acumulação de ácido abscísico no xilema. O decréscimo da condutância estomática ao longo do dia também não pôde ser explicado pelas flutuações diurnas do potencial hídrico. As elevadas temperaturas foliares e a baixa humidade do ar durante a tarde parecem contribuir para acentuar e acelerar o decréscimo da condutância ao longo do dia, mas não constituem a sua causa única. A redução da condutância estomática durante a tarde estava associada a uma limitação da capacidade de abertura dos estomas e à alteração da relação entre a condutância foliar e a concentração xilémica de ácido abscísico, tanto em plantas intactas como em folhas destacadas.

Estes resultados indicam que, em trabalhos futuros se deverá dar mais atenção à eventual relação entre os efeitos estomáticos do défice hídrico e os efeitos da desidratação ao nível do crescimento e integridade do sistema radicular. Por outro lado, relativamente aos efeitos do ácido abscísico (e de outros reguladores de crescimento, nomeadamente as citocininas) sobre a abertura estomática, deverão ser distinguidos os seus efeitos a curto prazo daqueles que eventualmente só se manifestarão após alterações prolongadas do balanço hormonal e que poderão estar associados a alterações ao nível da estrutura e/ou expressão genética das folhas.

RESUMO

O principal objectivo do presente trabalho foi avaliar o papel desempenhado pelo ABA no sistema de controlo da abertura dos estomas pelo estado hídrico das raízes. A importância relativa das mensagens positivas e negativas produzidas pelas raízes foi analisada determinando os efeitos do destacamento de parte do sistema radicular sobre a abertura dos estomas de Commelina communis. O destacamento de raízes secas resultou numa recuperação parcial da abertura estomática, verificando-se também que a condutância foliar decrescia quando se destacavam raízes hidratadas. Estes resultados indicam que a abertura dos estomas depende não só do aumento da produção de inibidores da abertura dos estomas pelas raízes (mensagens positivas), como da escassez de promotores da abertura dos estomas (mensagens negativas). Procurou-se também avaliar o envolvimento do ABA na regulação da abertura estomática durante a imposição e alívio de défices hídricos severos. Os resultados obtidos nos ensaios realizados com Commelina communis indicam que os efeitos a posteriori dos défices hídricos não resultam da persistência de elevadas concentrações de ABA quer no mesófilo como na epiderme abaxial. A concentração de ABA aumentou significativamente no xilema de plantas de Lupinus albus e Helianthus annuus sujeitas a défice hídrico. No presente trabalho considerou-se que o xilema é desprovido de sacarose, pelo que a sua presença nos exsudados foliares será um indicador de que estes estão contaminados com floema. A concentração xilémica de ABA foi estimada a partir da intercepção nas ordenadas da relação entre a concentração deste regulador de crescimento e a concentração de sacarose determinada nos mesmos exsudados. A aplicação exógena de ABA a folhas destacadas de plantas regadas era capaz de reproduzir a resposta estomática à variação da concentração endógena daquele regulador de crescimento observada em plantas de Lupinus albus sujeitas a défice hídrico moderado. Elevadas concentrações xilémicas de ABA persistiram após o alívio do défice hídrico num dos ensaios com Lupinus albus. Este ensaio caracterizou-se por a secagem do solo ter sido moderada e pela rapidez da recuperação das relações hídricas foliares após o restabelecimento da rega. Contudo, num outro ensaio com trevoceiro, bem como nos ensaios com Helianthus annuus, a desidratação do solo foi mais severa e após o alívio do défice hídrico a concentração de ABA no xilema voltou rapidamente

aos valores pré-stress. Nestes casos, a limitação da abertura estomática mantinha-se em folhas destacadas com o pecíolo imerso em água, não era revertida a curto prazo pela aplicação exógena de citocininas e estava associada a uma aparente limitação da condutância hidráulica das plantas. A concentração xilémica de ABA e a resposta estomática à aplicação exógena deste composto foi também determinada, de manhã e de tarde, em plantas de Vitis vinifera crescendo no campo, com diferente disponibilidade de água no solo. As diferenças de condutância entre plantas com diferente disponibilidade de água no solo estavam relacionadas com a variação da concentração xilémica daquele regulador de crescimento, mas o encerramento dos estomas ao longo do dia não resultou da acumulação de ABA no xilema. A redução da condutância foliar durante a tarde estava associada a uma limitação da capacidade de abertura dos estomas e à alteração da relação entre a condutância estomática e a concentração xilémica de ácido abscísico, tanto em plantas intactas como em folhas destacadas.

ABSTRACT

The objective of this study was to test the role of ABA on the control of stomatal aperture by root water status. In order to determine the relative importance of positive and negative root to shoot messages, we studied the effects of detaching part of the root system on stomatal conductance of Commelina communis. Partial stomatal reopening followed the excision of dried roots, whereas leaf conductance decreased after excising wet roots. These results indicate that both the increase in root-sourced stomatal inhibitors (positive messages) and the shortage of root-sourced stomatal promoters (negative messages) are involved in the depression of stomatal conductance when the roots are dehydrated. We also studied the involvement of ABA on the control of stomatal conductance during soil drying and after rewatering. In Commelina communis we found that the after-effect of drought on the stomata was not a consequence of the persistence of high ABA concentrations in the mesophyll or in the abaxial epidermis. Under drought conditions, xylem ABA concentration increased significantly in Lupinus albus and Helianthus annuus plants. We assumed that sucrose concentration in the xylem sap is negligible. Therefore, the presence of sucrose in leaf exudates indicated that they were contaminated with phloem. Using the regression between ABA and sucrose concentration determined in the same exudates, the concentration of ABA in xylem sap was estimated by extrapolating to zero sucrose concentration. Introducing exogenous ABA into the transpiration stream of leaves, detached from well-watered plants, reproduced the stomatal response to the endogenous xylem ABA concentration observed in intact plants subjected to moderate water stress. In one of the experiments with white lupin plants, the delay in stomatal reopening after stress relief was associated with the persistence of high ABA concentration in the xylem of rewatered plants. In this experiment, soil dehydration was relatively moderate and, after rewatering, the recovery of leaf water relations was fast. Soil drying was more severe in the experiments with Helianthus annuus and in a second experiment with white lupin plants. In these experiments we found that xylem ABA returned to pre-stress values the day following rewatering and the delay in stomatal reopening seemed to be associated with a restriction in plant hydraulic conductance. Ample stomatal

apertures were not restored in detached leaves fed with water or synthetic cytokinins. In field-grown Vitis vinifera plants, the differences in stomatal conductance between plants with different soil water availability were correlated with the variation in xylem ABA concentration. However, the decrease in stomatal conductance throughout the day was not a consequence of the accumulation of ABA in xylem. The relationship between leaf conductance and xylem ABA changed during the day and the afternoon depression in leaf conductance seemed to be associated with a limitation in stomatal opening potential.

REFERÊNCIAS

- Ackerson, R.C. (1980) Stomatal responses of cotton to water stress and abscisic acid as affected by water stress history. Plant Physiol., 65: 455-459
- Ackerson, R.C. (1982) Synthesis and movement of abscisic acid in water-stressed cotton leaves. Plant Physiol., 69: 609-613
- Ackerson, R.C. & Radin, J.W. (1983) Abscisic acid accumulation in cotton leaves in response to dehydration at high pressure. Plant Physiol., 71: 432-433
- Aharoni, N. (1978) Relation between leaf water status and endogenous ethylene in detached leaves. Plant Physiol., 61: 658-662
- Aharoni, N., Blumenfeld, A. & Richmond, A.E. (1977) Hormonal activity in detached lettuce leaves as affected by leaf water content. Plant Physiol., 59: 1169-1173
- Anderson, P.C. & Brodbeck, B.V. (1989) Diurnal and temporal changes in the chemical profile of xylem exudate from Vitis rotundifolia. Physiol. Plant., 75: 63-70
- Aston, M.J. & Lawlor, D.W. (1979) The relationship between transpiration, root water uptake, and leaf water potential. J. Exp. Bot., 30: 169-181
- Atkinson, C.J., Davies, W.J. & Mansfield, T.A. (1989a) Changes in stomatal conductance in intact ageing wheat leaves in response to abscisic acid. J. Exp. Bot., 40: 1021-1028
- Atkinson, C.J., Mansfield, T.A., Kean, A.M. & Davies, W.J. (1989b) Control of stomatal aperture by calcium in isolated epidermal tissue and whole leaves of Commelina communis L. New Phytol., 111: 9-17
- Balling, A. & Zimmermann, U. (1990) Comparative measurements of the xylem pressure of Nicotiana plants by means of the pressure bomb and pressure probe. Planta, 182: 325-338
- BassiriRad, H. & Caldwell, M.M. (1992) Root growth, osmotic adjustment and NO_3^- uptake during and after a period of drought in Artemisia tridentata. Aust. J. Plant Physiol., 19: 493-500
- Bates, L.M. & Hall, A.E. (1981) Stomatal closure with soil water depletion not associated with changes in bulk leaf water status. Oecologia, 50: 62-65
- Baughn, J.W. & Tanner, C.B. (1976) Leaf water potential: comparison of pressure chamber and in situ hygrometer on five herbaceous species. Crop Sci., 16: 181-184

- Beardsell, M.F. & Cohen, D. (1975) Relationships between leaf water status, abscisic acid levels and stomatal resistance in maize and sorghum. Plant Physiol., 56: 207-212
- Behl, R. & Hartung, W. (1984) Transport and compartmentation of abscisic acid in roots of Hordeum distichon under osmotic stress. J. Exp. Bot., 35: 1433-1440
- Behl, R. & Hartung, W. (1986) Movement and compartmentation of abscisic acid in guard cells of Valerianella locusta: effects of osmotic stress, external H⁺-concentration and fusicoccin. Planta, 168: 360-368
- Belefant, H. & Fong, F. (1989) Abscisic acid ELISA: organic acid interference. Plant Physiol., 91: 1467-1470
- Bengtson, C., Falk, S.O. & Larsson, S. (1979) Effects of kinetin on transpiration rate and abscisic acid content of water stressed young wheat plants. Physiol. Plant., 45: 183-188
- Bennett, J.M., Cortes, P.M. & Lorens, G.F. (1986) Comparison of water potential components measured with a thermocouple psychrometer and a pressure chamber and the effects of starch hydrolysis. Agron. J., 78: 239-244
- Ben-Yehoshua, S. & Aloni, B. (1974) Effect of water stress on ethylene production by detached leaves of Valencia orange (Citrus sinensis Osbeck). Plant Physiol., 53: 863-865
- Berkowitz, G.A. & Gibbs, M. (1983) Reduced osmotic potential inhibition of photosynthesis. Site-specific effects of osmotically induced stromal acidification. Plant Physiol., 72: 1100-1109
- Blackman, P.G. & Davies, W.J. (1983) The effects of cytokinins and ABA on stomatal behaviour of maize and Commelina. J. Exp. Bot., 34: 1619-1626
- Blackman, P.G. & Davies, W.J. (1984a) Age-related changes in stomatal response to cytokinins and abscisic acid. Ann. Bot., 54: 121-125
- Blackman, P.G. & Davies, W.J. (1984b) Modification of the CO₂ responses of maize stomata by abscisic acid and by naturally-occurring and synthetic cytokinins. J. Exp. Bot., 35: 174-179
- Blackman, P.G. & Davies, W.J. (1985) Root to shoot communication in maize plants of the effects of soil drying. J. Exp. Bot., 36: 39-48
- Bradford, K.J. (1983) Involvement of plant growth substances in the alteration of leaf gas exchange of flooded tomato plants. Plant Physiol., 73: 480-483
- Bradford, K.J., Sharkey, T.D. & Farquhar, G.D. (1983) Gas exchange, stomatal behavior, and $\delta^{13}\text{C}$ values of the flacca tomato

- mutant in relation to abscisic acid. Plant Physiol., 72: 245-250
- Bray, E.A. (1990) Drought-stress-induced polypeptide accumulation in tomato leaves. Plant Cell Environ., 13: 531-538
- Bray, E.A. (1991) Regulation of gene expression by endogenous ABA during drought stress. In Davies, W.J. & Jones, H.G. (Eds.). Abscisic acid physiology and biochemistry. Bios Scientific Publ., Oxford, pp. 81-98
- Brinckmann, E., Hartung, W. & Waringer, M. (1990) Abscisic acid levels of individual leaf cells. Physiol. Plant., 80: 51-54
- Brown, P.W. (1972) Determination of leaf osmotic potential using thermocouple psychrometers. In Brown, R.W. & van Haveren, B.P. (Eds.). Psychrometry in water relations research. Utah State University. pp. 198-209
- Brown, P.W. & Tanner, C.B. (1981) Alfafa water potential measurement: a comparison of the pressure chamber and leaf dew-point hygrometers. Crop Sci., 21: 240-244
- Brown, P.W. & Tanner, C.B. (1983) Alfafa osmotic potential: a comparison of the water-release curve and frozen-tissue methods. Agron. J., 75: 91-93
- Browning, G. (1974) 2-Chloroethanephosphonic acid reduces transpiration and stomatal opening in Coffea arabica. Planta, 121: 175-179
- Burschka, C., Tenhunen, J.D. & Hartung, W. (1983) Diurnal variations in abscisic acid content and stomatal response to applied abscisic acid in leaves of irrigated and non-irrigated Arbutus unedo plants under naturally fluctuating environmental conditions. Oecologia, 58: 128-131
- Campbell, E.C., Campbell, G.S. & Barlow, W.K. (1973) A dewpoint hygrometer for water potential measurement. Agric. Meteorol., 12: 113-121
- Canny, M.J. & McCully, M.E. (1988) The xylem sap of maize roots: its collection, composition and formation. Aust. J. Plant Physiol., 15: 557-566
- Chaves, M.M., Harley, P.C., Tenhunen, J.D. & Lange, O.L. (1987) Gas exchange studies in two Portuguese grapevine cultivars. Physiol. Plant., 70: 639-647
- Chen, C.M., Ertl, J.R., Leisner, S.M. & Chang, C.C. (1985) Localization of cytokinin biosynthetic sites in pea plants and carrot roots. Plant Physiol., 78: 510-513
- Cooper, M.J., Digby, J. & Cooper, P.J. (1972) Effects of plant hormones on the stomata of barley: a study of the interaction between abscisic acid and kinetin. Planta, 105: 43-49
- Cornic, G. & Ghashghaie, J. (1991) Effect of temperature on net

- CO₂ assimilation and photosystem II quantum yield of electron transfer of french bean (Phaseolus vulgaris L.) leaves during drought stress. Planta, 185: 255-260
- Cornish, K. & Zeevaart, J.A.D. (1984) Abscisic acid metabolism in relation to water stress and leaf age in Xanthium strumarium. Plant Physiol., 76: 1029-1035
- Cornish, K. & Zeevaart, J.A.D. (1985a) Movement of abscisic acid into the apoplast in response to water stress in Xanthium strumarium L. Plant Physiol., 78: 623-626
- Cornish, K. & J.A.D. Zeevaart (1985b) Abscisic acid accumulation by roots of Xanthium strumarium L. and Lycopersicon esculentum Mill. in relation to water stress. Plant Physiol., 79: 653-658
- Correia, M.J., Chaves, M.M. & Pereira, J.S. (1990) Afternoon depression in photosynthesis in grapevine leaves - evidence for a high light stress effect. J. Exp. Bot., 41: 417-426
- Cosgrove, D.J., Van Volkenburgh, E. & Cleland, R.E. (1984) Stress relaxation of cell walls and the yield threshold for growth. Demonstration and measurement by micro-pressure probe and psychrometer techniques. Planta, 162: 46-54
- Creelman, R.A., Mason, H.S., Bensen, R.J., Boyer, J.S. & Mullet, J.E. (1990) Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. Analysis of growth, sugar accumulation, and gene expression. Plant Physiol., 92: 205-214
- Crombie, O.S., Milburn, J.A. & Hipkins, M.F. (1985) Maximum sustainable xylem sap tensions in Rhododendron and other species. Planta, 163: 27-33
- Cruz, R.T., Jordan, W.R. & Drew, M.C. (1992) Structural changes and associated reduction of hydraulic conductance in roots of Sorghum bicolor L. following exposure to water deficit. Plant Physiol., 99: 203-212
- Cutler, J.M., Rains, D.W. & Loomis, R.S. (1977) The importance of cell size in the water relations of plants. Physiol. Plant., 40: 255-260
- Darbyshire, B. (1971) Changes in indoleacetic acid oxidase activity associated with plant water potential. Physiol. Plant., 25: 80-84
- Das, V.S.R., Rao, I.M. & Raghavendra, A.S. (1976) Reversal of abscisic acid induced stomatal closure by benzyladenine. New Phytol., 76: 449-452
- Davenport, T.L., Morgan, P.W. & Jordan, W.R. (1980) Reduction of auxin transport capacity with age and internal water deficits in cotton petioles. Plant Physiol., 65: 1023-1025

- Davies, W.J. (1978) Some effects of abscisic acid and water stress on stomata of Vicia faba L. J. Exp. Bot., 29: 175-182
- Davies, F.S. & Lakso, A.N. (1978) Water relations in apple seedlings: changes in water potential components, abscisic acid levels and stomatal conductances under irrigated and non-irrigated conditions. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 103: 310-313
- Davies, W.J. & Mansfield, T.A. (1983) The role of abscisic acid in drought avoidance. In Addicott, T.T. (Ed.). Abscisic acid. Praeger Press. Nova Iorque. pp. 237-267
- Davies, W.J. & Zhang, J. (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. Ann. Rev. Plant Physiol., 42: 55-76
- Davies, W.J., Metcalfe, J., Lodge, T.A. & Costa, A.R. (1986) Plant growth substances and the regulation of growth under drought. Aust. J. Plant Physiol., 13: 105-125
- Davies, W.J., Mansfield, T.A. & Hetherington, A.M. (1990) Sensing of soil water status and the regulation of plant growth and development. Plant Cell Environ., 13: 709-719
- De Silva, D.L.R., Hetherington, A.M. & Mansfield, T.A. (1985) Synergism between calcium ions and abscisic acid in preventing stomatal opening. New Phytol., 100: 473-482
- Dhawan, A.K., Paton, D.M. & Willing, R.R. (1979) Occurrence and bioassay responses of G a plant growth regulator in Eucalyptus and other myrtaceae. Planta, 146: 419-422
- Doerffling, K. & Tietz, D. (1985) Abscisic acid in leaf epidermis of Commelina communis L.; distribution and correlation with stomatal closure. J. Plant Physiol., 117: 297-305
- Doerffling, K., Streich, J., Kruse, W. & Muxfeldt, B. (1977) Abscisic acid and the after-effect on stomatal opening potential. Z. Pflanzenphysiol., 81: 34-42
- Dodge, S.M., Marsh, P.B. & Tallman, G. (1992) Comparison of physiological responses of guard cell protoplasts of Nicotiana glauca isolated from leaves collected before dawn or at midday. Physiol. Plant., 86: 221-230
- Downton, W.J.S., Grant, W.J.R. & Loveys, B.R. (1987) Diurnal changes in the photosynthesis of field-grown grapevines. New Phytol., 105: 71-80
- Dubbe, D.R., Farquhar, G.D. & Raschke, K. (1978) Effect of abscisic acid on the gain of the feedback loop involving carbon dioxide and stomata. Plant Physiol., 62: 413-417
- Düring, H. (1991) Determination of the photosynthetic capacity of grapevine leaves. Vitis, 30: 49-56
- Eamus, D. & Wilson, J.M. (1984) A model for the interaction of

- low temperature, ABA, IAA, and CO₂ in the control of stomatal behaviour. J. Exp. Bot., 35: 91-98
- El-Beltagy, A.S. & Hall, M.A. (1974) Effect of water stress upon endogenous ethylene levels in Vicia faba. New Phytol., 73: 47-60
- Fereres, E., Cruz-Romero, G., Hoffman, G.J. & Rawlins, J.L. (1979) Recovery of orange trees following severe water stress. J. Appl. Ecol., 16: 833-842
- Fischer, R.A. (1970) After-effect of water stress on stomatal opening potential. II. Possible causes. J. Exp. Bot., 21: 386-404
- Fischer, R.A., Hsiao, T.C. & Hagan, R.M. (1970) After-effect of water stress on stomatal opening potential. I. Techniques and magnitudes. J. Exp. Bot., 21: 371- 385
- Fußeder, A., Wartinger, A., Hartung, W., Schulze, E.-D. & Heilmeyer, H. (1992) Cytokinins in the xylem sap of desert-grown almond (Prunus dulcis) trees: Daily courses and their possible interactions with abscisic acid and leaf conductance. New Phytol., 122: 45-52
- Gamon, J.A. & Pearcy, R.W. (1990) Photoinhibition in Vitis californica: interactive effects of sunlight, temperature and water stress. Plant Cell Environ., 13: 267-275
- Gantet, P., Hubac, C. & Brown, S.C. (1990) Flow cytometric fluorescence anisotropy of lipophilic probes in epidermal and mesophyll protoplasts from water-stressed Lupinus albus L. Plant Physiol., 94: 729-737
- Gepstein, S. (1982) Light-induced H⁺ secretion and the relation to senescence of oat leaves. Plant Physiol., 70: 1120-1124
- Girma, F.S. & Krieg, D.R. (1992) Osmotic adjustment in sorghum. I. Mechanism of diurnal osmotic potential changes. Plant Physiol., 99: 577-582
- Goering, H., Koshuchowa, S., Münnich, H. & Dietrich, M. (1984) Stomatal opening and cell enlargement in response to light and phytohormone treatments in primary leaves of red light-grown seedlings of Phaseolus vulgaris L. Plant & Cell Physiol., 25: 683-690
- Gollan, T., Turner, N.C. & Schulze, E.-D. (1985) The response of stomata and leaf gas exchange to vapour pressure deficits and soil water content. III. In the sclerophyllous woody species Nerium oleander. Oecologia, 65: 356-362
- Gollan, T., Passioura, J.B. & Munns, R. (1986) Soil water status affects the stomatal conductance of fully turgid wheat and sunflower leaves. Aust. J. Plant Physiol., 13: 459-464
- Gollan, T., Schurr, U. & Schulze, E.-D. (1992) Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap

- composition of Helianthus annuus. I. The concentration of cations, anions, amino acids in, and pH of, the xylem sap. Plant Cell Environ., 15: 551-559
- Gowing, D.J., Davies, W.J. & Jones, H.G. (1990) A positive root-sourced signal as an indicator of soil drying in apple Malus x domestica Borkh. J. Exp. Bot., 41: 1535-1540
- Grange, R.I. (1983) Solute production during the measurement of solute potential on disrupted tissue. J. Exp. Bot., 34: 757-764
- Grantz, D.A., Ho, T.H.D., Uknes, S.J., Cheeseman, J.M. & Boyer, J.S. (1985) Metabolism of abscisic acid in guard cells of Vicia faba L. and Commelina communis L. Plant Physiol., 78: 51-56
- Grossi, M., Cattivelli, L., Terzi, V. & Stanca, A.M. (1992) Modification of gene expression induced by ABA in relation to drought and cold stress in barley shoots. Plant Physiol. Biochem., 30: 97-103
- Gunderson, C.A. & Taylor, G.E. (1988) Kinetics of inhibition of foliar gas exchange by exogenous ethylene: an ultrasensitive response. New Phytol., 110: 517-524
- Hardegree, S.P. (1989a) Xylem water holding capacity as a source of error in water potential estimates made with the pressure chamber and thermocouple psychrometer. Amer. J. Bot., 76: 356-360
- Hardegree, S.P. (1989b) Discrepancies between water potential isotherm measurements on Pinus ponderosa seedlings shoots: xylem hysteresis and apoplastic osmotic potentials. Plant Cell Environ., 12: 57-62
- Harris, M.J. & Outlaw, W.H. (1991) Rapid adjustment of guard-cell abscisic acid levels to current leaf-water status. Plant Physiol., 95: 171-173
- Harrison, M.A. & Walton, D.C. (1975) Abscisic acid metabolism in water-stressed bean leaves. Plant Physiol., 56: 250-254
- Hartung, W. (1983) The site of action of abscisic acid at the guard cell plasmalemma of Valerianella locusta. Plant Cell Environ., 6: 427-428
- Hartung, W. & Slovik, S. (1991) Physicochemical properties of plant growth regulators and plant tissues determine their distribution and redistribution: stomatal regulation by abscisic acid in leaves. New Phytol., 119: 361-382
- Hartung, W., Kaiser, W.M. & Burschka, C. (1983) Release of abscisic acid from leaf strips under osmotic stress. Z. Pflanzenphysiol., 112: 131-138
- Hartung, W., Radin, J.W. & Hendrix, D.L. (1988) Abscisic acid movement into the apoplastic solution of water-stressed cotton leaves. Role of apoplastic pH. Plant Physiol., 86: 908-913

- Hartung, W., Weiler, E.W. & Radin, J.W. (1992) Auxin and cytokinins in the apoplastic solution of dehydrated cotton leaves. J. Plant Physiol., 140: 324-327
- Heber, U., Neimanis, S. & Lange, O.L. (1986) Stomatal aperture, photosynthesis and water fluxes in mesophyll cells as affected by the abscission of leaves. Simultaneous measurements of gas exchange, light scattering and chlorophyll fluorescence. Planta, 167: 554-562
- Heilmann, B., Hartung, W. & Gimmler, H. (1980) The distribution of abscisic acid between chloroplasts and cytoplasm of leaf cells and the permeability of the chloroplast envelope for abscisic acid. Z. Pflanzenphysiol., 97: 67-78
- Henson, I.E. & Turner, N.C. (1991) Stomatal responses to abscisic acid in three lupin species. New Phytol., 117: 529-534
- Henson, I.E., Alagarswamy, G., Mahalakshmi, V. & Bidinger, F.R. (1982) Diurnal changes in endogenous abscisic acid in leaves of pearl millet (Pennisetum americanum [L.] Leeke) under field conditions. J. Exp. Bot., 33: 416-425
- Henson, I.E., Jensen, C.R. & Turner, N.C. (1989a) Leaf gas exchange and water relations of lupins and wheat. I. Shoot responses to soil water deficits. Aust. J. Plant Physiol., 16: 401-413
- Henson, I.E., Jensen, C.R. & Turner, N.C. (1989b) Leaf gas exchange and water relations of lupins and wheat. III. Abscisic acid and drought-induced stomatal closure. Aust. J. Plant Physiol., 16: 429-442
- Hewett, E.W. & Wareing, P.F. (1973) Cytokinins in Populus x robusta (Schneid): light effects on endogenous levels. Planta, 114: 119-129
- Hoad, G.V. (1975) Effects of osmotic stress on abscisic acid levels in xylem sap of sunflower. Planta, 124: 25-29
- Hoad, G.V. (1978) Effect of water stress on abscisic acid levels in white lupin (Lupinus albus L.) fruit, leaves and phloem exudate. Planta, 142: 287-290
- Hornberg, C. & Weiler, E.W. (1984) High-affinity binding sites for abscisic acid on the plasmalemma of Vicia faba guard cells. Nature, 310: 321-324
- Horton, R.F. (1971) Stomatal opening: the role of abscisic acid. Can. J. Bot., 49: 583-585
- Hubac, C., Guerrier, D., Ferran, J. & Tremolieres, A. (1989) Change of leaf lipid composition during water stress in two genotypes of Lupinus albus resistant or susceptible to drought. Plant Physiol. Biochem., 27: 737-744

- Hughes, M.A., Dunn, M.A., Pearce, R.S., White, A.J. & Zhang, L. (1992) An abscisic-acid-responsive low temperature barley gene has homology with a maize phospholipid transfer protein. Plant Cell Environ., 15: 861-865
- Imber, D. & Tal, M. (1970) Phenotypic reversion of flacca, a wilted mutant of tomato, by abscisic acid. Science, 169: 592-593
- Incoll, L.D. & Whitelam, G.C. (1977) The effect of kinetin on stomata of the grass Antheophora pubescens Nees. Planta, 137: 243-245
- Itai, C. (1978) Responses of Eucalyptus occidentalis to water stress induced by NaCl. Physiol. Plant., 43: 377-379
- Itai, C. & Benzioni, A. (1976) Water stress and hormonal response. In Lange, O.L., Kappen, L. & Schulze, E.-D. (Eds.). Water and plant life. Problems and modern approaches. Springer-Verlag, Berlin. pp. 225-242
- Itai, C. & Vaadia, Y. (1965) Kinetin-like activity in root exudate of water-stressed sunflower plants. Physiol. Plant., 18: 941-944
- Itai, C. & Vaadia, Y. (1971) Cytokinin activity in water-stressed shoots. Plant Physiol., 47: 87-90
- Itai, C., Weyers, J.D.B., Hillman, J.R., Meidner, H. & Willmer, C. (1978) Abscisic acid and guard cells of Commelina communis L. Nature, 271: 652-653
- Jachetta, J.J., Appleby, A.P. & Boersma, L. (1986) Use of the pressure vessel to measure concentrations of solutes in apoplastic and membrane-filtered symplastic sap in sunflower leaves. Plant Physiol., 82: 995-999
- Jackson, M.B. (1991) Regulation of water relationships in flooded plants by ABA from leaves, roots and xylem sap. In Davies, W.J. & Jones, H.G. (Eds.). Abscisic acid physiology and biochemistry. Bios Scientific Publ., Oxford. pp. 217-226
- Jackson, M.B. & Hall, K.C. (1987) Early stomatal closure in waterlogged pea plants is mediated by abscisic acid in the absence of foliar water deficits. Plant Cell Environ., 10: 121-130
- Jensen, C.R. & Henson, I.E. (1990) Leaf water relations characteristics of Lupinus angustifolius and L. cosentinii. Oecologia, 82: 114-121
- Jensen, C.R., Henson, I.E. & Turner, N.C. (1989) Leaf gas exchange and water relations of lupins and wheat. II. Root and shoot water relations of lupin during drought-induced stomatal closure. Aust. J. Plant Physiol., 16: 415-428
- Jewer, P.C. & Incoll, L.D. (1981) Promotion of stomatal opening

- in detached epidermis of Kalanchoe daigremontiana Hamet et Perr. by natural and synthetic cytokinins. Planta, 153: 317-318
- Jewer, P.C., Incoll, L.D. & Shaw, J. (1982) Stomatal responses of argenteum - a mutant of Pisum sativum L. with readily detachable epidermis. Planta, 155: 146-153
- Jones, H.G. (1985) Adaptive significance of leaf development and structural responses to environment. In Ong, C.K., Baker, N.R. & Davies, W.J. (Eds.). Control of leaf growth. Cambridge University Press. pp. 155-173
- Jones, M.M. & Turner, N.C. (1980) Osmotic adjustment in expanding and fully expanded leaves of sunflower in response to water deficits. Aust. J. Plant Physiol., 7: 181-192
- Jones, M.G.K., Outlaw, W.H. & Lowry, O.H. (1977) Enzymic assay of 10^{-7} to 10^{-4} moles of sucrose in plant tissues. Plant Physiol., 60: 379-383
- Jordan, W.R., Brown, K.W. & Thomas, J.C. (1975) Leaf age as a determinant in stomatal control of water loss from cotton during water stress. Plant Physiol., 56: 595-599
- Kaiser, W.M. & Hartung, W. (1981) Uptake and release of abscisic acid by isolated photoautotrophic mesophyll cells, depending on pH gradients. Plant Physiol., 68: 202-206
- Kannangara, T., Durley, R.C., Simpson, G.M. & Stout, D.G. (1982) Drought resistance of Sorghum bicolor. 4. Hormonal changes in relation to drought stress in field-grown plants. Can. J. Plant Sci., 62: 317-330
- Kikuta, S.B. & Richter, H. (1986) Graphical evaluation and partitioning of turgor responses to drought in leaves of durum wheat. Planta, 168: 36-42
- Kikuta, S.B. & Richter, H. (1992) Leaf discs or press sap? A comparison of techniques for the determination of osmotic potentials in freeze-thawed leaf material. J. Exp. Bot., 43: 1039-1044
- Kirschbaum, M.U.F. (1988) Recovery of photosynthesis from water stress in Eucalyptus pauciflora - a process in two stages. Plant Cell Environ., 11: 685-694
- Klein, A. & Itai, C. (1989) Is proline involved in stomata regulation of Commelina communis plants recovering from salinity stress? Physiol. Plant., 75: 399-404
- Kriedemann, P.E., Loveys, B.R., Fuller, G.L. & Leopold, A.C. (1972) Abscisic acid and stomatal regulation. Plant Physiol., 49: 842-847
- Kriedemann, P.E., Loveys, B.R. & Downton, W.J.S. (1975) Internal control of stomatal physiology and photosynthesis. II.

- Photosynthetic responses of phaseic acid. Aust. J. Plant Physiol., 2: 553-567
- Kuraishi, S., Hashimoto, Y. & Shiraishi, Y.M. (1981) Latent periods of cytokinin-induced stomatal opening in the sunflower leaf. Plant & Cell Physiol., 22: 911-916
- Lachno, D.R. & Baker, D.A. (1986) Stress induction of abscisic acid in maize roots. Physiol. Plant., 68: 215-221
- Lahr, W. & Raschke, K. (1988) Abscisic-acid contents and concentrations in protoplasts from guard cells and mesophyll cells of Vicia faba L. Planta, 173: 528-531
- Laloraya, M.M., Nozzolillo, C., Purohit, S. & Stevenson, L. (1986) Reversal of abscisic acid-induced stomatal closure by trans-cinnamic and p-coumaric acid. Plant Physiol., 81: 253-258
- Lancaster, J.E., Mann, J.D. & Porter, N.G. (1977) Ineffectiveness of abscisic acid in stomatal closure of yellow lupin, Lupinus luteus var. Weiko III. J. Exp. Bot., 28: 184-191
- Lange, O.L. & Tenhunen, J.D. (1984) A minicuvette system for measurement of CO₂ exchange and transpiration of plants under controlled conditions in field and laboratory. H. Walz, Effeltrich, Alemanha, 11 pp.
- Layzell, D.B., Pate, J.S., Atkins, A. & Canvin, D.T. (1981) Partitioning of carbon and nitrogen and the nutrition of root and shoot apex in a nodulated legume. Plant Physiol., 67: 30-36
- Lee, J. & Bowling, D.J.F. (1992) Effect of the mesophyll on stomatal opening in Commelina communis. J. Exp. Bot., 43: 951-957
- Lehmann, H. & Schütte, H.R. (1984) Abscisic acid metabolism in intact wheat seedlings under normal and stress conditions. J. Plant Physiol., 117: 201-209
- Leshem, Y.Y., Cojocar, M., Margel, S., El-Ani, D. & Landau, E.M. (1990) A biophysical study of abscisic acid interaction with membrane phospholipid components. New Phytol., 116: 487-498
- Levitt, L.K., Stein, D.B. & Rubinstein, B. (1987) Promotion of stomatal opening by indoleacetic acid and ethrel in epidermal strips of Vicia faba L. Plant Physiol., 85: 318-321
- Liu, Z. & Dickmann, D.I. (1992) Abscisic acid accumulation in leaves of two contrasting hybrid poplar clones affected by nitrogen fertilization plus cyclic flooding and soil drying. Tree Physiol., 11: 109-122
- Liu, W.T., Wenkert, W., Allen, L.H. & Lemon, E.R. (1978) Soil plant water relation in a New York vineyard: resistances to water movement. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 103: 226-230
- Livné, A. & Vaadia, Y. (1965) Stimulation of transpiration rate in barley leaves by kinetin and gibberellic acid. Physiol.

Plant., 18: 658-664

Losch, R., Tenhunen, J.D., Pereira, J.S. & Lange, O.L. (1982) Diurnal courses of stomatal resistance and transpiration of wild and cultivated Mediterranean perennials at the end of the Summer dry season in Portugal. Flora, 172: 138-160

Loveys, B.R. (1977) The intracellular location of abscisic acid in stressed and non-stressed leaf tissue. Physiol. Plant., 40: 6-10

Loveys, B.R. (1984) Diurnal changes in water relations and abscisic acid in field-grown Vitis vinifera cultivars. III. The influence of xylem-derived abscisic acid on leaf gas exchange. New Phytol., 98: 563-573

Loveys, B.R. (1991) How useful is a knowledge of ABA physiology for crop improvement? In Davies, W.J. & Jones, H.G. (Eds.). Abscisic acid physiology and biochemistry. Bios Scientific Publ., Oxford. pp. 245-260

Loveys, B.R. & Düring, H. (1984) Diurnal changes in water relations and abscisic acid in field-grown Vitis vinifera cultivars. II. Abscisic acid changes under semi-arid conditions. New Phytol., 97: 37-47

Loveys, B.R. & Kriedemann, P.E. (1973) Rapid changes in abscisic acid-like inhibitors following alterations in vine leaf water potential. Physiol. Plant., 28: 476-479

Loveys, B.R., Robinson, S.P. & Downton, W.J.S. (1987) Seasonal and diurnal changes in abscisic acid and water relations of apricot leaves (Prunus armeniaca L.). New Phytol., 107: 15-27

Ludlow, M.M., Ng, T.T. & Ford, C.W. (1980) Recovery after water stress of leaf gas exchange in Panicum maximum var. trichoglume. Aust. J. Plant Physiol., 7: 299-313

Luke, H.H. & Freeman, T.E. (1968) Stimulation of transpiration by cytokinins. Nature, 217: 873-874

MacRobbie, E.A.C. (1981) Effects of ABA in "isolated" guard cells of Commelina communis L. J. Exp. Bot., 32: 563-572

Mansfield, T.A. (1976) Delay in the response of stomata to abscisic acid in CO₂-free air. J. Exp. Bot., 27: 559-564

Marangoni, B., Vitagliano, C. & Peterlunger, E. (1986) The effect of defoliation on the composition of xylem sap from cabernet franc grapevines. Amer. J. Enol. Vitic., 37: 259-262

Markhart, A.H., Sionit, N. & Siedow, J.N. (1981) Cell wall water dilution: an explanation of apparent negative turgor potentials. Can. J. Bot., 59: 1722-1725

Masia, A., Pitacco, A. & Tonutti, P. (1985) Effects of ethephon on water balance of Prunus cerasus L. Acta Hort., 171:263-267

- Meinzer, F.C. & Grantz, D.A. (1990) Stomatal and hydraulic conductance in growing sugarcane: stomatal adjustment to water transport capacity. Plant Cell Environ., 13: 383-388
- Meinzer, F.C. & Moore, P.H. (1988) Effect of apoplastic solutes on water potential in elongating sugarcane leaves. Plant Physiol., 86:873-879
- Meinzer, F.C., Grantz, D.A. & Smit, B. (1991) Root signals mediate coordination of stomatal and hydraulic conductance in growing sugarcane. Aust. J. Plant Physiol., 18: 329-338
- Meyer, A., Vorkefeld, S. & Sembdner, G. (1989) Abscisic acid metabolism in barley seedlings subjected to drought. Biochem. Physiol. Pflanzen., 184: 127-136
- Milborrow, B.V. (1980) A distinction between the fast and slow responses to abscisic acid. Aust. J. Plant Physiol., 7: 749-754
- Milborrow, B.V. & Mallaby, R. (1975) Occurrence of methyl (+)-abscisate as an artefact of extraction. J. Exp. Bot., 26: 741-748
- Minchin, P.E.H. & McNaughton, G.S. (1987) Xylem transport of recently fixed carbon within lupin. Aust. J. Plant Physiol., 14: 325-329
- Mittelheuser, C.J. & van Steveninck, R.F.M. (1969) Stomatal closure and inhibition of transpiration induced by (RS)-abscisic acid. Nature, 221: 281-282
- Mizrahi, Y., Blumenfeld, A. & Richmond, A.E. (1970) Abscisic acid and transpiration in leaves in relation to osmotic root stress. Plant Physiol., 46: 169-171
- Monroe, D. (1984) Enzyme immunoassay. Anal. Chem., 56: 920-931
- Monteith, J.L., Campbell, G.S. & Potter, E.A. (1988) Theory and performance of a dynamic diffusion porometer. Agric. Forest Meteorol., 44: 27-38
- Morgan, P.W., He, C.J., De Greef, J.A. & De Proft, M.P. (1990) Does water deficit stress promote ethylene synthesis by intact plants? Plant Physiol., 94: 1616-1624
- Mott, K.A. & O'Leary, J.W. (1984) Stomatal behavior and CO₂ exchange characteristics in amphistomatous leaves. Plant Physiol., 74: 47-51
- Munns, R. & King, R.W. (1988) Abscisic acid is not the only stomatal inhibitor in the transpiration stream of wheat plants. Plant Physiol., 88: 703-708
- Munns, R., Tonnet, M.L., Shennan, C. & Gardner, P.A. (1988) Effect of high external NaCl concentration on ion transport within the shoot of Lupinus albus. II. Ion in phloem sap. Plant Cell Environ., 11: 291-300
- Neales, T.F. & McLeod, A.L. (1991) Do leaves contribute to the

- abscisic acid present in the xylem sap of "droughted" sunflower plants? Plant Cell Environ., 14: 979-986
- Neales, T.F., Masia, A., Zhang, J. & Davies, W.J. (1989) The effects of partially drying part of the root system of Helianthus annuus on the abscisic acid content of the roots, xylem sap and leaves. J. Exp. Bot., 40: 1113-1120
- Norman, S.M., Maier, V.P. & Pon, D.L. (1990) Abscisic acid accumulation and carotenoid and chlorophyll content in relation to water stress and leaf age of different types of citrus. J. Agric. Food Chem., 38: 1326-1334
- Ogunkanmi, A.B., Tucker, D.J. & Mansfield; T.A. (1973) An improved bioassay for abscisic acid and other antitranspirants. New Phytol., 72: 277-282
- O'Neill, S.D. (1983) Role of osmotic potential gradients during water stress and leaf senescence in Fragaria virginiana. Plant Physiol., 72: 931-937
- Pacheco, C.M.A. (1989) Influência de técnicas de não mobilização e da mobilização sobre aspectos estruturais e hídricos de solos com vinha, bem como sobre o respectivo sistema radical. Consequências das relações hídricas solo-vinha na produção. Dissertação de Doutoramento, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Palevitz, B.A. (1981) The structure and development of stomatal cells. In Jarvis, P.G. & Mansfield, T.A. (Eds.). Stomatal physiology. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 1-23
- Pallaghy, C.K. & Raschke, K. (1972) No stomatal response to ethylene. Plant Physiol., 49: 275-276
- Pallas, J.E. & Kays, S.J. (1982) Inhibition of photosynthesis by ethylene - a stomatal effect. Plant Physiol., 70: 598-601
- Parrondo, R.T., Smith, R.C. & Lazurick, K. (1975) Rubidium absorption by corn root tissue after a brief period of water stress and during recovery. Physiol. Plant., 35: 34-38
- Passioura, J.B. (1988) Water transport in and to roots. Ann. Rev. Plant Physiol., 39: 245-265
- Pate, J.S. (1975) Exchange of solutes between phloem and xylem and circulation in the whole plant. In Zimmermann, M.H. & Milburn, J.A. (Eds.). Transport in plants. I. Phloem transport. Springer-Verlag, Berlin. pp. 451-473
- Pate, J.S., Atkins, C.A., Hamel, K., McNeil, D.L. & Layzell, D.B. (1979) Transport of organic solutes in phloem and xylem of a nodulated legume. Plant Physiol., 63: 1082-1088
- Paterson, N.W., Weyers, J.D.B. & A'Brooks, R. (1988) The effect of pH on stomatal sensitivity to abscisic acid. Plant Cell

Environ., 11: 83-89

Paton, D.M., Dhawan, A.K. & Willing, R.R. (1980) Effect of Eucalyptus growth regulators on the water loss from plant leaves. Plant Physiol., 66: 254-256

Pavlik, B.M. (1984) Seasonal changes of osmotic pressure, symplasmic water content and tissue elasticity in the blades of dune grasses growing in situ along the coast of Oregon. Plant Cell Environ., 7: 531-539

Pemadasa, M.A. (1982a) Differential abaxial and adaxial stomatal responses to indole-3-acetic acid in Commelina communis L. New Phytol., 90: 209-219

Pemadasa, M.A. (1982b) Effects of phenylacetic acid on abaxial and adaxial stomatal movements and its interaction with abscisic acid. New Phytol., 92: 21-30

Pereira, J.S. & Kozlowski, T.T. (1977) Variations among woody angiosperms in response to flooding. Physiol. Plant., 41: 184-192

Pereira, J.S., Tenhunen, J.D., Lange, O.L., Beyschlag, W., Weyer, A. & David, M.M. (1986) Seasonal and diurnal patterns in leaf gas exchange of Eucalyptus globulus trees growing in Portugal. Can. J. For. Res., 16: 177-184

Pereira, J.S., Tenhunen, J.D. & Lange, O.L. (1987) Stomatal control of photosynthesis of Eucalyptus globulus Labill. trees under field conditions in Portugal. J. Exp. Bot., 38: 1678-1688

Pierce, M. & Raschke, K. (1980) Correlation between loss of turgor and accumulation of abscisic acid in detached leaves. Planta, 148: 174-182

Pierce, M. & Raschke, K. (1981) Synthesis and metabolism of abscisic acid in detached leaves of Phaseolus vulgaris L. after loss and recovery of turgor. Planta, 153: 156-165

Plumbe, A.M. & Willmer, C.M. (1986) Phytoalexins, water-stress and stomata. III. The effects of some phenolics, fatty acids and some other compounds on stomatal responses. New Phytol., 103: 17-22

Quarrie, S.A. (1978) A rapid and sensitive assay for abscisic acid using ethyl abscisate as an internal standard. Anal. Biochem., 87: 148-156

Quarrie, S.A. & Jones, H.G. (1977) Effects of abscisic acid and water stress on development of wheat. J. Exp. Bot., 28: 192-203

Quick, W.P., Chaves, M.M., Wendler, R., David, M.M., Rodrigues, M.L., Passarinho, J.A., Pereira, J.S., Adcock, M.D., Leegood, R.C. & Stitt, M. (1992) The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. Plant Cell Environ., 15: 25-35

- Radin, J.W. (1981) Water relations of cotton plants under nitrogen deficiency. IV. Leaf senescence during drought and its relation to stomatal closure. Physiol. Plant., 51: 145-149
- Radin, J.W. (1984) Stomatal responses to water stress and to abscisic acid in phosphorus-deficient cotton plants. Plant Physiol., 76: 392-394
- Radin, J.W. & Hendrix, D.L. (1988) The apoplastic pool of abscisic acid in cotton leaves in relation to stomatal closure. Planta, 174: 180-186
- Radin, J.W. & Loomis, R.S. (1971) Changes in the cytokinins of radish roots during maturation. Physiol. Plant., 25: 240-244
- Radin, J.W., Parker, L.L. & Guinn, G. (1982) Water relations of cotton plants under nitrogen deficiency. V. Environmental control of abscisic acid accumulation and stomatal sensitivity to abscisic acid. Plant Physiol., 70: 1066-1070
- Raghavendra, A.S. & Reddy, K.B. (1987) Action of proline on stomata differs from that of abscisic acid, G-substances, or methyl jasmonate. Plant Physiol., 83: 732-734
- Rai, V.K., Sharma, S.S. & Sharma, S. (1986) Reversal of ABA-induced stomatal closure by phenolic compounds. J. Exp. Bot., 37: 129-134
- Raschke, K. (1975) Simultaneous requirement of carbon dioxide and abscisic acid for stomatal closing in Xanthium strumarium L. Planta, 125: 243-251
- Raschke, K. (1987) Action of abscisic acid on guard cells. In Zeiger, E., Farquhar G.D. & Cowan, I.R. (Eds). Stomatal Function. Stanford University Press, Stanford. pp. 253-279
- Raschke, K. & Resemann, A. (1986) The midday depression of CO₂ assimilation in leaves of Arbutus unedo L.: diurnal changes in photosynthetic capacity related to changes in temperature and humidity. Planta, 168: 546-558
- Raschke, K. & Zeevaart, J.A.D. (1976) Abscisic acid content, transpiration, and stomatal conductance as related to leaf age in plants of Xanthium strumarium L. Plant Physiol., 58: 169-174
- Richards, J.H. & Caldwell, M.M. (1987) Hydraulic lift: substantial nocturnal water transport between soil layers by Artemisia tridentata roots. Oecologia, 73: 486-489
- Rioy, J., Dagan, E., Goren, R. & Yang, S.F. (1990) Characterization of abscisic acid-induced ethylene production in citrus leaf and tomato fruit tissues. Plant Physiol., 92: 48-53
- Robertson, J.M., Pharis, R.P., Huang, Y.Y., Reid, D.M. & Yeung, E.C. (1985) Drought induced increases in abscisic acid levels in the root apex of sunflower. Plant Physiol., 79: 1086-1089

- Robertson, J.M., Hubick, K.T., Yeung, E.C. & Reid, D.M. (1990) Developmental responses to drought and abscisic acid in sunflower roots. I. Root growth, apical anatomy and osmotic adjustment. J. Exp. Bot., 41: 325-337
- Rodriguez, J.L. & Davies, W.J. (1982) The effects of temperature and ABA on stomata of Zea mays L. J. Exp. Bot., 33: 977-987
- Sack, F.D. (1987) The development and structure of stomata. In Zeiger, E., Farquhar, G.D. & Cowan, I.R. (Eds.). Stomatal function. Stanford University Press, Stanford. pp. 59-90
- Salama, A.M.S. & Wareing, P.F. (1979) Effects of mineral nutrition on endogenous cytokinins in plants of sunflower (Helianthus annuus L.). J. Exp. Bot., 30: 971-981
- Saliendra, N.Z. & Meinzer, F.C. (1989) Relationship between root/soil hydraulic properties and stomatal behavior in sugarcane. Aust. J. Plant Physiol., 16: 241-250
- Salleo, S. & Lo Gullo, M.A. (1989) Xylem cavitation in nodes and internodes of Vitis vinifera L. plants subjected to water stress. Limits of restoration of water conduction in cavitated xylem conduits. In Kreeb, K.H., Richter, H. & Hinckley, T.M. (Eds.). Structural and functional responses to environmental stresses. SPB Academic Publ., The Hague. pp. 33-42
- Savage, M.J., Cass, A. & Jager, J.M. (1981) Measurement of water potential using thermocouple hygrometers. S. Afric. J. Sci., 77: 24-27
- Scholander, P.F., Hammel, H.T., Hemmingsen, E.A. & Bradstreet, E.D. (1964) Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 52: 119-125
- Schultz, H.R. & Matthews, M.A. (1988) Resistance to water transport in shoots of Vitis vinifera L. Relation to growth at low water potential. Plant Physiol., 88:718-724
- Schurr, U., Gollan, T. & Schulze, E.-D. (1992) Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of Helianthus annuus. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. Plant Cell Environ., 15: 561-567
- Seeley, S.D. & Powell, L.E. (1970) Electron capture-gas chromatography for sensitive assay of abscisic acid. Anal. Biochem., 35: 530-533
- Semann, A., Cruziat, P. & Vartanian, N. (1982) Cinétique de réhydratation de plantes entières en relation avec le potentiel hydrique initial et les conditions de transpiration. Acta Oecologia, 3: 359-371

- Sen Gupta, A. & Berkowitz, G.A. (1987) Osmotic adjustment, symplast volume, and nonstomatally mediated water stress inhibition of photosynthesis in wheat. Plant Physiol., 85: 1040-1047
- Sharkey, T.D. & Raschke, K. (1980) Effects of phaseic acid and dihydrophaseic acid on stomata and the photosynthetic apparatus. Plant Physiol., 65: 291-297
- Sharkey, T.D., Stevenson, G.F. & Paton, D.M. (1982) Effects of G, a growth regulator from Eucalyptus grandis, on photosynthesis. Plant Physiol., 69: 935-938
- Sharp, R.E. (1981) Mechanism of turgor maintenance in Zea mays. Ph. D. Thesis. University of Lancaster. Inglaterra.
- Sharp, R.E. & Davies, W.J. (1979) Solute regulation and growth by roots and shoots of water stressed maize plants. Planta, 147: 43-49
- Sharp, R.E., Silk, W.K. & Hsiao, T.C. (1988) Growth of the maize primary root at low water potentials. I. Spatial distribution of expansive growth. Plant Physiol., 87: 50-57
- Singh, B., Galson, E., Dashek, W.V. & Walton, D.C. (1979) Abscisic acid levels and metabolism in the leaf epidermal tissue of Tulipa gesneriana L. and Commelina communis L. Planta, 146: 135-138
- Sionit, N. & Kramer, P.J. (1976) Water potential and stomatal resistance of sunflower and soybean subjected to water stress during various growth stages. Plant Physiol., 58: 537-540
- Sivakumaran, S. & Hall, M.A. (1978) Effects of age and water stress on endogenous levels of plant growth regulators in Euphorbia lathyris L. J. Exp. Bot., 29: 195-205
- Skriver, K. & Mundy, J. (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. The Plant Cell, 2: 503-512
- Slavik, B. (1974) Methods of studying plant water relations. Springer-Verlag, Nova Iorque.
- Snaith, P.J. & Mansfield, T.A. (1982a) Stomatal sensitivity to abscisic acid: can it be defined? Plant Cell Environ., 5: 309-311
- Snaith, P.J. & Mansfield, T.A. (1982b) Control of the CO₂ responses of stomata by indol-3-ylacetic acid and abscisic acid. J. Exp. Bot., 33: 360-365
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. (1981) Biometry. 2^a Ed. W.H. Freeman & Company, Nova Iorque.
- Stillwell, W. & Hester, P. (1984) Kinetin blocks abscisic acid phosphatidylethanolamine channels in lipid bilayers. Z. Pflanzenphysiol., 114: 65-76
- Stitt, M., MacLilley, R., Gerhardt, R. & Heldt, H.W. (1989)

- Determination of metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. Meth. Enzym., 174: 518-552
- Syvertsen, J.P. (1982) Minimum leaf water potential and stomatal closure in citrus leaves of different ages. Ann. Bot., 49: 827-834
- Tal, M., Imber, D., Ezez, A. & Epstein, E. (1979) Abnormal stomatal behavior and hormonal imbalance in flacca, a wilted mutant of tomato. V. Effect of abscisic acid on indoleacetic acid metabolism and ethylene evolution. Plant Physiol., 63: 1044-1048
- Tardieu, F. & Davies, W.J. (1992) Stomatal response to abscisic acid is a function of current plant water status. Plant Physiol., 98: 540-545
- Tardieu, F., Katerji, N., Bethenod, O., Zhang, J. & Davies, W.J. (1991) Maize stomatal conductance in the field: its relationship with soil and plant water potentials, mechanical constraints and ABA concentration in the xylem sap. Plant Cell Environ., 14: 121-126
- Tardieu, F., Zhang, J. & Davies, W.J. (1992a) What information is conveyed by an ABA signal from maize roots in drying field soil? Plant Cell Environ., 15: 185-191
- Tardieu, F., Zhang, J., Katerji, N., Bethenod, O., Palmer, S. & Davies, W.J. (1992b) Xylem ABA controls the stomatal conductance of field-grown maize subjected to soil compaction or soil drying. Plant Cell Environ., 15: 193-197
- Tenhunen, J.D., Pearcy, R.W. & Lange, O.L. (1987) Characteristic time courses of stomatal conductance and leaf gas exchange under fluctuating environmental conditions in different habitats. In Zeiger, E., Farquhar, G.D. & Cowan, I.R. (Eds.). Stomatal function. Stanford University Press, Stanford. pp. 323-351
- Terashima, I. (1992) Anatomy of non-uniform leaf photosynthesis. Photosynthesis Res., 31: 195-212
- Trejo, C.L. & Davies, W.J. (1991) Drought-induced closure of Phaseolus vulgaris L. stomata precedes leaf water deficit and any increase in xylem ABA concentration. J. Exp. Bot., 42: 1507-1515
- Trewavas, A. (1986) Understanding the control of plant development and the role of growth substances. Aust. J. Plant Physiol., 13: 447-457
- Trewavas, A. (1991) How do plant growth substances work? II. Plant Cell Environ., 14: 1-12
- Trewavas, A. & Jones, H.G. (1991) An assessment of the role of ABA in plant development. In Davies, W.J. & Jones, H.G. (Eds.). Abscisic acid physiology and Biochemistry. Bios Sci. Publ.,

Oxford. pp. 169-188

Turner, N.C. (1974) Stomatal behavior and water status of maize, sorghum and tobacco under field conditions. II. At low soil water potential. Plant Physiol., 53: 360-365

Turner, N.C. (1988) Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. Irrig. Sci., 9: 289-308

Turner, N.C., Begg, J.E. & Tonnet, M.L. (1978) Osmotic adjustment of sorghum and sunflower crops in response to water deficits and its influence on the water potential at which stomata close. Aust. J. Plant Physiol., 5: 597-608

Turner, N.C., Schulze, E.-D. & Gollan, T. (1985) The responses of stomata and leaf gas exchange to vapour pressure deficits and soil water content. II. In the mesophytic herbaceous species Helianthus annuus. Oecologia, 65: 348-355

Turner, N.C., Stern, W.R. & Evans, P. (1987) Water relations and osmotic adjustment of leaves and roots of lupins in response to water deficits. Crop Sci., 27: 977-983

Tyree, M.T. & Hammel, H.T. (1972) The measurement of the turgor pressure and the water relations of plants by the pressure-bomb technique. J. Exp. Bot., 23: 267-282

Tyree, M.T. & Jarvis, P.G. (1982) Water in tissues and cells. In Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. & Ziegler, H. (Eds.). Encyclopedia of plant physiology. Physiological plant ecology. II. Springer-Verlag, Berlin. pp. 35-77

Tyree, M.T. & Wilmot, T.R. (1990) Errors in the calculation of evaporation and leaf conductance in steady-state porometry: the importance of accurate measurement of leaf temperature. Can. J. For. Res., 20: 1031-1035

Tyree, M.T., Dainty, J. & Benis, M. (1973) The water relations of hemlock (Tsuga canadensis). I. Some equilibrium water relations as measured by the pressure-bomb technique. Can. J. Bot., 51: 1471-1480

Tyree, M.T., Dainty, J. & Hunter, D.M. (1974) The water relations of hemlock (Tsuga canadensis). IV. The dependence of the balance pressure on temperature as measured by the pressure-bomb technique. Can. J. Bot., 52: 973-978

Tyree, M.T., Dixon, M.A. & Thompson, R.G. (1984) Ultrasonic acoustic emissions from the sapwood of Thuja occidentalis measured inside a pressure bomb. Plant Physiol., 74: 1046-1049

Tyree, M.T., Fiscus, E.L., Wullschlegel, S.D. & Dixon, M.A. (1986) Detection of xylem cavitation in corn under field conditions. Plant Physiol., 82: 597-599

van Kirk, C.A. & Raschke, K. (1978) Release of malate from

- epidermal strips during stomatal closure. Plant Physiol., 61: 474-475
- Vitagliano, C. (1975) Effects of ethephon on stomata, ethylene evolution, and abscission in olive (Olea europaea L.) cv. coratina. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 100: 482-484
- von Caemmerer, S. & Farquhar, G.D. (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. Planta, 153: 376-387
- Walker, M.A. & Dumbroff, E.B. (1981) Effects of salt stress on abscisic acid and cytokinins levels in tomato. Z. Pflanzenphysiol., 101: 461-470
- Walker, S., Oosterhuis, D.M. & Wiebe, H.H. (1984) Ratio of cut surface area to leaf sample volume for water potential measurements by thermocouple psychrometers. Plant Physiol., 75: 228-230
- Walker-Simmons, M.K. & Abrams, S.R. (1991) Use of ABA immunoassays. In Davies, W.J. & Jones, H.G. (Eds.). Abscisic acid physiology and biochemistry. Bios Scientific Publ., Oxford, pp. 53-61
- Walker-Simmons, M.K., Reaney, M.J.T., Quarrie, S.A., Pereta, P., Vernieri, P. & Abrams, S.R. (1991) Monoclonal antibody recognition of abscisic acid analogs. Plant Physiol., 95: 46-51
- Walton, D.C., Harrison, M.A. & Coté, P. (1976) The effects of water stress on abscisic acid levels and metabolism in roots of Phaseolus vulgaris L. and other plants. Planta, 131: 141-144
- Wardle, K. & Short, K.C. (1981) Responses of stomata in epidermal strips of Vicia faba to carbon dioxide and growth hormones when incubated on potassium chloride and potassium iminodiacetate. J. Exp. Bot., 32: 303-309
- Wartinger, A., Heilmeyer, H., Hartung, W. & Schulze, E.-D. (1990) Daily and seasonal courses of leaf conductance and abscisic acid in the xylem sap of almond trees [Prunus dulcis (Miller) D.A. Webb] under desert conditions. New Phytol., 116: 581-587
- Weiler, E.W. (1980) Radioimmunoassays for the differential and direct analysis of free and conjugated abscisic acid in plant extracts. Planta, 148: 262-272
- Weiler, E.W., Schnabl, H. & Hornberg, C. (1982) Stress-related levels of abscisic acid in guard cell protoplasts of Vicia faba L. Planta, 154: 24-28
- Wenkert, W. (1980) Measurement of tissue osmotic pressure. Plant Physiol., 65: 614-617
- Wenkert, W., Lemon, E.R. & Sinclair, T.R. (1978) Water content-potential relationship in soya bean: changes in component

- potentials for mature and immature leaves under field conditions. Ann. Bot., 42: 295-307
- West, D.W. & Gaff, D.F. (1976) Xylem cavitation in excised leaves of Malus sylvestris Mill. and measurement of leaf water stress with the pressure chamber. Planta, 129: 15-18
- Weyers, J.D.B. & Hillman, J.R. (1979) Uptake and distribution of abscisic acid in Commelina leaf epidermis. Planta, 144: 167-172
- Weyers, J.D.B. & Hillman, J.R. (1980) Effects of abscisic acid on $^{86}\text{Rb}^+$ fluxes in Commelina communis L. leaf epidermis. J. Exp. Bot., 31: 711-720
- Weyers, J.D.B. & Travis, A.J. (1981) Selection and preparation of leaf epidermis for experiments on stomatal physiology. J. Exp. Bot., 32: 837-850
- Willmer, C.M., Don, R. & Parker, W. (1978) Levels of short-chain fatty acids and abscisic acid in water-stressed and non-stressed leaves and their effects on stomata in epidermal strips and excised leaves. Planta, 139: 281-287
- Willmer, C.M., Wilson, A.B. & Jones, H.G. (1988) Changing responses of stomata to abscisic acid and CO_2 as leaves and plant age. J. Exp. Bot., 39: 401-410
- Wilson, J.A. (1981) Stomatal responses to applied ABA and CO_2 in epidermis detached from well-watered and water-stressed plants of Commelina communis L. J. Exp. Bot., 32: 261-269
- Wolf, O., Jeschke, W.D. & Hartung, W. (1990) Long distance transport of abscisic acid in NaCl-treated intact plants of Lupinus albus. J. Exp. Bot., 41: 593-600
- Wong, S.C., Cowan, I.R. & Farquhar, G.D. (1985) Leaf conductance in relation to rate of CO_2 assimilation. III. Influences of water stress and photoinhibition. Plant Physiol., 78: 830-834
- Wright, S.T.C. (1977) The relationship between leaf water potential (Ψ_{leaf}) and the levels of abscisic acid and ethylene in excised wheat leaves. Planta, 134: 183-189
- Wright, S.T.C. (1980) The effect of plant growth regulator treatments on the levels of ethylene emanating from excised turgid and wilted wheat leaves. Planta, 148: 381-388
- Wright, S.T.C. & Hiron, R.W.P. (1969) (+)-Abscisic acid, the growth inhibitor induced in detached wheat leaves by a period of wilting. Nature, 224: 719-720
- Xiloyannis, C., Uriu, K. & Martin, G.C. (1980) Seasonal and diurnal variations in abscisic acid, water potential, and diffusive resistance in leaves from irrigated and non-irrigated peach trees. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 105: 412-415
- Zeevaart, J.A.D. (1983) Metabolism of abscisic acid and its

- regulation in Xanthium leaves during and after water stress. Plant Physiol., 71: 477-481
- Zeevaart, J.A.D. & Boyer, G.L. (1984) Accumulation and transport of abscisic acid and its metabolites in Ricinus and Xanthium. Plant Physiol., 74: 934-939
- Zeiger, E. (1983) The biology of stomatal guard cells. Ann. Rev. Plant Physiol., 34: 441-475
- Zhang, J. & Davies, W.J. (1987a) ABA in roots and leaves of flooded pea plants. J. Exp. Bot., 38: 649-659
- Zhang, J. & Davies, W.J. (1987b) Increased synthesis of ABA in partially dehydrating root tips and ABA transport from roots to leaves. J. Exp. Bot., 38: 2015-2023
- Zhang, J. & Davies, W.J. (1989a) Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. Plant Cell. Environ., 12: 73-81
- Zhang, J. & Davies, W.J. (1989b) Sequential response of whole plant water relations to prolonged soil drying and the involvement of xylem sap ABA in the regulation of stomatal behaviour in sunflower plants. New Phytol., 113: 167-174
- Zhang, J. & Davies, W.J. (1990) Changes in the concentration of ABA in xylem sap as a function of changing soil water status can account for changes in leaf conductance and growth. Plant Cell Environ., 13: 277-285
- Zhang, J. & Davies, W.J. (1991) Antitranspirant activity in xylem sap of maize plants. J. Exp. Bot., 42: 317-321
- Zhang, J., Schurr, U. & Davies, W.J. (1987) Control of stomatal behaviour by abscisic acid which apparently originates in the roots. J. Exp. Bot., 38: 1174-1181

AGRADECIMENTOS

Desejo começar por expressar o meu agradecimento a todos aqueles que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização deste trabalho, tanto na Universidade do Algarve, como no Instituto Superior de Agronomia de Lisboa e na Universidade de Lancaster.

Em particular, quero agradecer em primeiro lugar ao meu orientador, Professor João Santos Pereira, pelo apoio, orientação e encorajamento que me dispensou ao longo de todo o trabalho.

Desejo também agradecer ao Doutor William Davies, pela orientação e apoio dispensados durante a minha estadia na Universidade de Lancaster.

Um agradecimento muito especial à Manuela David, com quem partilhei muitos dos problemas surgidos no decurso deste trabalho, bem como à Doutora Manuela Chaves, Eng^a Maria Lucília Rodrigues, Leonor Osório, Júlio Osório, Doutor Carlos Arruda Pacheco e mais uma vez ao Professor João Santos Pereira, que comigo partilharam alvoradas e muitas horas de canícula no ensaio de campo em Santarém.

Testemunho também o meu apreço ao Doutor J. Zhang com quem aprendi a técnica de quantificação do ácido abcísico por cromatografia gasosa.

Gostaria ainda de expressar o meu agradecimento às seguintes instituições:

- À Universidade do Algarve, nomeadamente aos órgãos de direcção da Unidade de Ciências e Tecnologias Agrárias, por terem facilitado as condições de trabalho de modo a permitir a realização do presente trabalho.

- À Fundação Calouste Gulbenkian por ter financiado a minha estadia na Universidade de Lancaster.

- Ao extinto Instituto Nacional de Investigação Científica pela concessão de bolsa de Doutoramento que possibilitou a finalização deste trabalho.

