



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Protecção e avaliação de marcadores do stress
foto-oxidativo em *Ceratonia siliqua* L. e
Tuberaria major (Willk) P. Silva & Rozeira sob
altas temperaturas e défice hídrico**

Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Ana Cristina dos Santos Vieira

Faro

2009



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Protecção e avaliação de marcadores do stress
foto-oxidativo em *Ceratonia siliqua* L. e
Tuberaria major (Willk) P. Silva & Rozeira sob
altas temperaturas e défice hídrico**

Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Ana Cristina dos Santos Vieira

Supervisor: Prof.^a Doutora Anabela Romano

Co-supervisor: Doutora Leonor Osório

Faro

2009

O documento apresentado é da inteira responsabilidade da autora.

Declaração

Na presente dissertação apresentam-se resultados que serão alvo de publicação em colaboração com A. Romano, L. Osório e J. Osório.

A autora declara que interveio na concepção e execução do trabalho experimental, na interpretação dos resultados e na redacção dos manuscritos enviados para publicação.

Faro, Novembro de 2009

Ana Cristina dos Santos Vieira

Agradecimentos

Chegado ao fim deste trabalho gostaria de expressar o meu reconhecimento a um conjunto de pessoas que contribuíram para a realização desta dissertação.

Agradeço à Prof.^a Doutora Anabela Romano, minha orientadora, de uma maneira especial pela oportunidade, condições e incentivo para a execução desta tese.

Agradeço também de uma forma especial à Doutora Leonor Osório, minha co-orientadora, com quem tive o grande prazer de trabalhar e receber ensinamentos durante a fase experimental e depois na redacção desta dissertação. Além do mais, muito obrigada por toda a ajuda, força e paciência em todos os momentos!

Não posso deixar de me lembrar do Prof. Doutor Júlio Osório que também me apoiou durante a realização deste trabalho, principalmente durante as medições dos parâmetros fisiológicos. Muito obrigada por tudo!

Agradeço a todos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal pelo acolhimento fantástico, nomeadamente à Sandra Gonçalves e à Neusa Martins pela disponibilidade e ajuda na realização do trabalho experimental. Sem elas não teria conseguido, muito obrigada!

Ao meu pai agradeço por todo o afecto e carinho, obrigada pelo sacrifício. À minha mãe agradeço de uma forma muito especial por tudo e é a quem dedico este trabalho. Muito obrigada!

À minha irmã agradeço pela sua paciência e compreensão em todas as ocasiões, pelo carinho e amizade que tantas vezes me transmitiu uma força e alegria para continuar! Não esquecendo o meu cunhado. Muito obrigada!

De uma forma geral, agradeço a toda a minha família pelas experiências vividas!

A todos os meus amigos obrigada por toda a amizade! À Telma, Patrícia, Diana e Carla obrigada pela infinita amizade, pelo companheirismo e por tornarem o meu mundo mais alegre e divertido!

A todos que directa e indirectamente me ajudaram a realizar este sonho o meu sincero “**OBRIGADO**”.

Lista de Símbolos e Abreviaturas

- A** - Área da amostra foliar
- Ant** - Antocianinas
- AOIs** - Áreas de interesse
- APX** - Ascorbato-peroxidase
- BSA** - Albumina bovina
- CAT** - Catalase
- CC** - Capacidade de campo
- CCD** - Câmara digital
- Cl *a*** - Clorofila *a*
- Cl *b*** - Clorofila *b*
- Crt** - Carotenóides totais
- Cl (*a+b*)** - Clorofila total
- CO₂** - Dióxido de Carbono
- DTT** - Ditionitrosito
- E** - Coeficiente de extinção
- EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- F_m** - Fluorescência máxima
- F'_m** - Fluorescência máxima à luz
- F_s** - Fluorescência da clorofila no estado estacionário
- F_v/F_m** - Eficiência quântica máxima do PSII
- F₀** - Fluorescência basal
- GR** - Redutase da glutatona
- g_s** - Condutância estomática
- HCl** - Ácido clorídrico
- H₂O** - Água
- H₂O₂** - Peróxido de hidrogénio
- K** - Potássio
- LMA** - Massa foliar por área

MDA - Dialdeído malónico

Na - Sódio

O₂ - Oxigénio

O₂⁻ - Radical superóxido

P_f - Peso fresco da amostra foliar

P_N - Taxa de fotossíntese líquida

PPFD - Densidade de fluxo fotónico fotossintético

P_s - Peso seco da amostra foliar

PSII - Fotossistema II

P_t - Peso túrgido da amostra foliar

PVPP - Polivinilpolipirrolidona

q_N - Coeficiente de extinção não fotoquímico

q_P - Coeficiente de extinção fotoquímico

ROS - Espécies reactivas de oxigénio

SLA - Área foliar específica

SOD - Dismutase do superóxido

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TBRAS - Substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico

TCA - Ácido tricloroacético

TRA - Teor relativo em água

φ_{NO} - Rendimento quântico da energia dissipada no PSII de um modo não regulado

φ_{NPQ} - Rendimento quântico da energia dissipada no PSII de um modo regulado

φ_{PSII} - Rendimento quântico do PSII

Ψ - Potencial hídrico foliar ao alvorecer

25 °C/CC - Plantas aclimatadas a 25/21 °C e regadas até à capacidade de campo

32 °C/CC - Plantas aclimatadas a 32/21 °C e regadas até à capacidade de campo

32 °C/SH - Plantas aclimatadas a 32/21 °C e submetidas a stress hídrico

32 °C/R - Plantas aclimatadas a 32/21 °C e recuperadas do stress hídrico

Resumo

No campo, as plantas estão frequentemente expostas à seca e temperatura elevada, simultaneamente. Estas condições ambientais podem tornar-se factores graves de stress num futuro próximo em consequência das alterações climáticas globais previstas. O conhecimento dos mecanismos fisiológicos e moleculares de adaptação/defesa das plantas aos stresses hídrico e temperatura elevada poderá ajudar a reduzir o impacto destes stresses na vegetação mediterrânica.

Os objectivos deste trabalho foram: estudar as respostas imediatas e as estratégias adaptativas da actividade fotossintética aos stresses hídrico e térmico, e avaliar a capacidade de resistência ao stress foto-oxidativo em duas espécies mediterrânicas, *Ceratonia siliqua* L. e *Tuberaria major* (Willk) P. Silva & Rozeira. Com esta finalidade, plantas em vaso foram crescidas em condições controladas de temperatura, luz e disponibilidade hídrica. Posteriormente foram expostas a temperatura elevada e a um défice hídrico lento e progressivo, seguido de recuperação. Verificou-se que o estado hídrico, em ambas as espécies, não foi afectado pela temperatura elevada, mas esta interagiu com o défice hídrico resultando num decréscimo acentuado do potencial hídrico foliar (Ψ) e do teor relativo em água (TRA), particularmente em *C. siliqua*. A baixa disponibilidade de água levou a uma depressão da taxa fotossintética, em grande parte devido ao fecho dos estomas. No entanto, os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* e respectivas imagens indicaram que a inibição da actividade fotossintética da *C. siliqua* originou danos fotoinibitórios (decréscimo da eficiência quântica máxima, F_v/F_m) e oxidativos (acréscimo dos teores em dialdeído malónico, MDA) nas folhas, apesar do aumento das concentrações de moléculas protectoras (carotenóides, antocianinas e prolina). Além disso, estes stresses originaram um decréscimo da actividade da catalase (CAT) e não alteraram a actividade da ascorbato-peroxidase (APX), o que indica que o sistema de eliminação de espécies reactivas de oxigénio, determinante da tolerância a stresses abióticos, não funcionou eficientemente em *C. siliqua*. Contrariamente, os efeitos da escassez de água disponível no solo e a temperatura elevada foram mínimos em *T. major*. Não foram detectados danos foto-oxidativos, embora a taxa fotossintética tenha sofrido uma redução devido ao défice hídrico. O teor de MDA não foi incrementado e o aumento na concentração de carotenóides e antocianinas parece ter sido suficiente para manter a integridade das membranas do sistema fotossintético.

Apesar de ambas as espécies terem conseguido recuperar a actividade fotossintética após irrigação, os mecanismos e a capacidade de resistência à seca sob temperatura elevada são diferentes nas duas espécies estudadas, apresentando a *C. siliqua*, aparentemente, menos tolerância ao stress hídrico comparativamente a *T. major*.

Palavras-chave: antocianinas; carotenóides; *Ceratonia siliqua*; enzimas antioxidantes; fluorescência da clorofila; fotossíntese; peroxidação lípidica; pigmentos fotossintéticos; prolina; temperatura elevada; *Tuberaria major*; seca.

Abstract

In the field, plants are often exposed simultaneously to drought and high temperature. These environmental conditions can become serious stress factors in the near future as a consequence of predicted global climate changes. The knowledge of physiological and molecular adaptation/defence mechanisms of plants to water stress and high temperature may help to reduce the impact of these stresses in Mediterranean vegetation.

The main objectives of this work were: to study the immediate responses and adaptative strategies of the photosynthetic activity to water and thermal stresses, and to evaluate the symptoms of photooxidative damage in two Mediterranean species, *Ceratonia siliqua* L. and *Tuberaria major* (Willk) P. Silva & Rozeira. Potted seedlings were grown in controlled environment chambers and exposed to water stress and high temperature. Water status and photosynthetic performance were negatively affected by high temperature when water was scarce. Water potential (Ψ) and relative water content (TRA) attained very low values, particularly in *C. siliqua*, which triggered the stomatal closure and consequently photosynthesis depression. Leaves of *C. siliqua* grown under low water conditions under high temperature, revealed signs of photoinhibition (decreases in maximum quantum efficiency of PSII, F_v/F_m) and of oxidative stress (increases in foliar malondialdehyde concentration, MDA). Nevertheless, these plants developed some defence mechanisms against oxidative stress, like the increase in carotenoids, proline and anthocyanins concentrations. Moreover, it seems that the scavenging function of catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) were impaired in these plants. Comparatively, *T. major* revealed a higher protection against photooxidative stress. Despite the reduction in photosynthetic rates, was not detected any photoinhibition or signs of oxidative stress. The F_v/F_m was not depressed by low water and MDA was not incremented.

So, the increase in carotenoids and anthocyanins concentrations seems to be adequate to maintained membrane integrity of photosynthetic system. Despite both species had recovered photosynthetic performance after irrigation, data collected in this work indicate that *C. Siliqua*, possibly, is less tolerant to water stress under high temperature than *T. major*.

Key-words: anthocyanin; carotenoids; *Ceratonia siliqua*; antioxidant enzymes; chlorophyll fluorescence; photosynthesis; lipid peroxidation; photosynthetic pigments; proline; high temperature; *Tuberaria major*; drought.

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Introdução geral | 1 |
| 1.1. Clima mediterrânico e alterações climáticas | 1 |
| 1.2. Alterações climáticas e seus efeitos nas plantas | 3 |
| 1.2.1. Introdução | 3 |
| 1.2.2. Estratégias para sobreviver ao défice hídrico e temperaturas elevadas | 4 |
| 1.2.3. Comportamento fisiológico, danos oxidativos e protecção antioxidativa..... | 5 |
| 1.3. Caracterização das espécies em estudo | 9 |
| 1.3.1. <i>Ceratonia siliqua</i> L..... | 10 |
| 1.3.2. <i>Tuberaria major</i> (Willk) P. Silva & Rozeira | 12 |
| 1.4. Objectivos | 13 |
| 2. Materiais e Métodos | 15 |
| 2.1. Condições experimentais | 15 |
| 2.2. Parâmetros fisiológicos | 17 |
| 2.2.1. Determinação do potencial hídrico e teor relativo em água e da massa foliar por área | 17 |
| 2.2.2. Medições das trocas gasosas | 18 |
| 2.2.3. Medições da fluorescência da clorofila <i>a</i> | 19 |
| 2.3. Parâmetros bioquímicos | 20 |
| 2.3.1. Quantificação dos pigmentos fotossintéticos | 20 |
| 2.3.2. Quantificação das antocianinas | 21 |
| 2.3.3. Quantificação da prolina | 21 |
| 2.3.4. Quantificação dialdeído malónico (MDA) | 22 |
| 2.3.5. Quantificação de enzimas antioxidantes | 22 |
| 2.3.6. Quantificação da proteína solúvel..... | 24 |
| 2.4. Análise estatística | 24 |
| 3. Resultados | 25 |
| 3.1. Parâmetros fisiológicos | 25 |
| 3.1.1. Caracterização do estado hídrico das plantas e massa foliar por área..... | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1.2. Trocas gasosas | 25 |
| 3.1.3. Fluorescência da clorofila <i>a</i> | 28 |
| 3.2. Parâmetros bioquímicos | 33 |
| 3.2.1. Pigmentos fotossintéticos | 33 |
| 3.2.2. Antocianinas..... | 33 |
| 3.2.3. Prolina | 35 |
| 3.2.4. Dialdeído malônico (MDA) | 36 |
| 3.2.5. Enzimas antioxidantes | 37 |
| 3.2.6. Proteína solúvel | 38 |
| 4. Discussão..... | 40 |
| 5. Conclusões e Perspectivas futuras..... | 47 |
| 6. Referências bibliográficas..... | 50 |

1. Introdução geral

1.1. Clima mediterrânico e alterações climáticas

A mudança climática global introduzirá definitivamente alterações nos ecossistemas naturais e agrícolas. Na realidade, o clima está a mudar devido à emissão de gases com efeitos de estufa para a atmosfera e às profundas alterações no uso dos solos, ambas provocadas pelas actividades humanas (Santos *et al.*, 2001). Segundo alguns autores a Bacia do Mediterrâneo será mais fortemente afectada pelas variações do clima global do que a maior parte das restantes regiões do planeta (Petit *et al.*, 2005). Em termos climáticos vastas zonas de Portugal e, em particular, a região algarvia, enquadram-se no clima tipo mediterrânico. Este tipo de clima caracteriza-se por chuvas pouco abundantes concentradas nos períodos mais frescos do ano, nomeadamente no Outono e na Primavera, alternando com períodos quentes e secos, e praticamente sem chuva no Verão (Pessoa *et al.*, 2004). Como se pode verificar pelos normais climatológicas referentes ao período 1971-2000 para o Algarve (Figuras 1.1, 1.2) fornecidos pelo Instituto de Meteorologia de Portugal, a temperatura média máxima nos meses mais quentes de Verão foi de 30 °C, enquanto a mínima foi de 18,4 °C. Por outro lado, a precipitação média nesses meses foi de 2,2 mm.

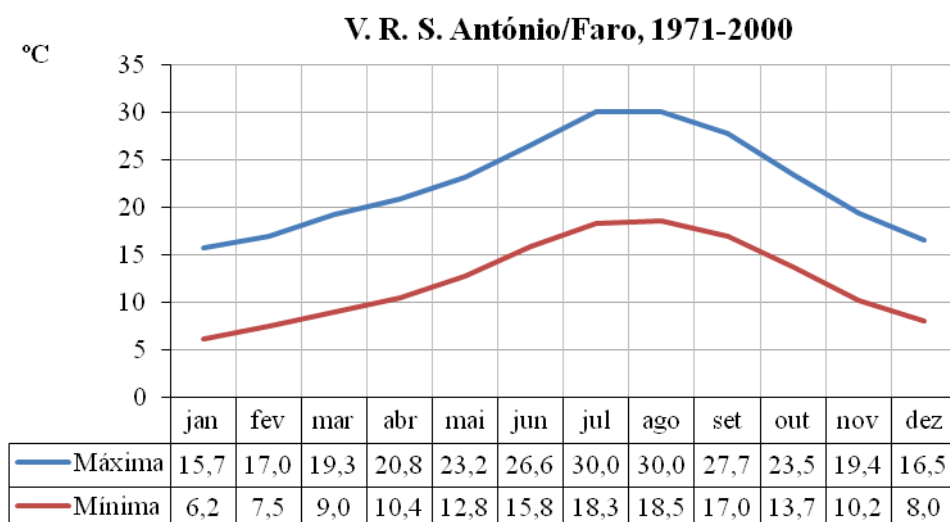


Figura 1.1. Valores médios mensais das temperaturas correspondentes ao período de 1971-2000 na região Algarvia (Fonte: Instituto de Meteorologia de Portugal).

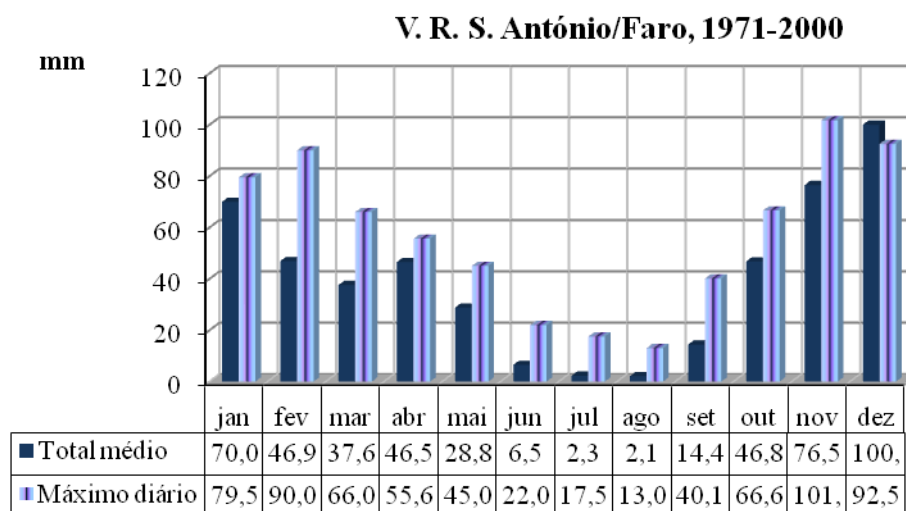


Figura 1.2. Valores médios mensais das precipitações correspondentes ao período de 1971-2000 na região Algarvia. (Fonte: Instituto de Meteorologia de Portugal).

No entanto, segundo as simulações obtidas com os modelos HadRM GCM (General Circulation Models) (Santos *et al.*, 2001), o cenário esperado para Portugal num futuro próximo, perspectiva um aumento da aridez devido a temperaturas mais elevadas (Figura 1.3) e um decréscimo, embora pequeno, das chuvas que serão mais concentradas no Inverno.

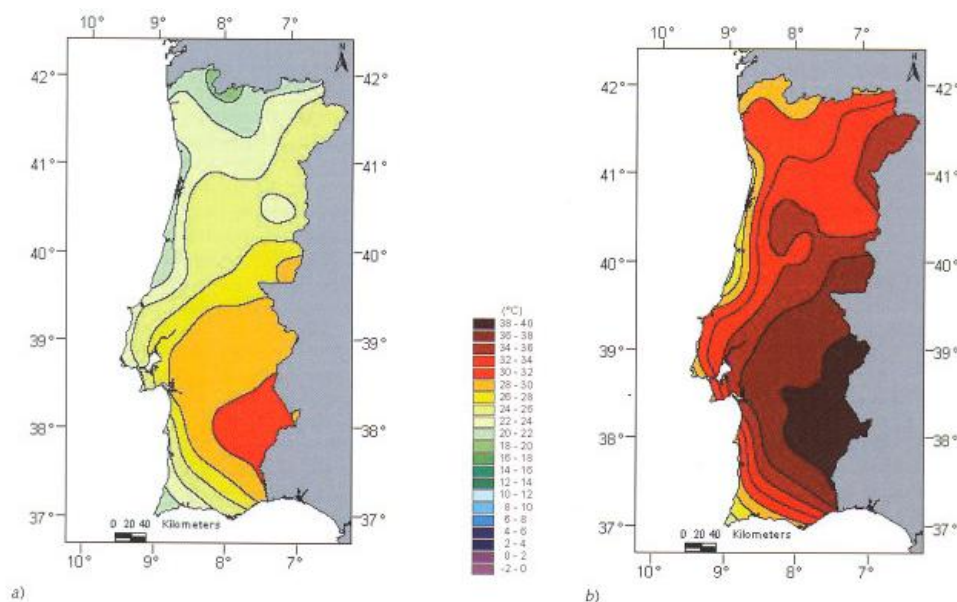


Figura 1.3. Temperatura máxima em Portugal Continental no Verão (Junho/Julho/Agosto) obtida com o modelo regional de clima HadRm para: a) simulação de controlo; b) simulação com aumento de CO₂, GGO₂ (no período 2080 - 2100) (Santos *et al.*, 2001).

De acordo com o IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) haverá uma subida da temperatura média em todas as regiões de Portugal de 1,7 a 4,0 °C até 2100 (IPCC, 2001). Além disso, a precipitação anual na região mediterrânica sofrerá um decréscimo de 5-20% até 2050 com maiores percentagens de redução durante o Verão (Ragab e Prudhomme, 2002), o que conduzirá a uma diminuição considerável da quantidade de água disponível no solo, particularmente na Primavera, Verão e Outono.

1.2. Alterações climáticas e seus efeitos nas plantas

1.2.1. Introdução

Perante a crescente inevitabilidade das alterações climáticas globais, é cada vez mais importante estudar os efeitos que essas alterações poderão provocar nas plantas, pois podem tornar-se factores de stress, uma vez que o stress pode ser considerado um desvio significativo e duradouro das condições favoráveis. De acordo com Larcher (2000), o stress é um estado funcional em que demandas anormais levam à desestabilização dos processos vitais e, simultaneamente, a uma restabilização e aclimação por mecanismos de protecção. A compreensão dos mecanismos de reacção/tolerância das plantas, nativas e cultivadas, a stresses ambientais é essencial para levar a cabo programas de melhoramento visando a redução do impacto do stress abiótico e a obtenção de culturas capazes de tolerar as futuras alterações climáticas. Por sua vez, a biotecnologia moderna oferece novas ferramentas para a melhoria da agricultura e sua sustentabilidade (Chaves e Oliveira, 2004), sendo uma aliada dos programas de melhoramento clássico, capaz de introduzir de uma maneira rápida e precisa novas características em plantas seleccionadas. Na maioria das vezes, as agressões do meio ambiente provocam na planta a acumulação de radicais livres, o que pode contribuir para a perda de produtividade. Assim, um melhor conhecimento dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos subjacentes à resposta à secura e às temperaturas elevadas poderá facilitar a identificação dos genes do metabolismo antioxidante activados, o que é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias de manipulação genética das plantas (Valliyodan e Nguyen, 2006).

Embora a região mediterrânica possua uma flora muito rica, apresenta uma grande susceptibilidade ambiental (Pessoa *et al.*, 2004). Face aos cenários climáticos apresentados, várias espécies endémicas e cultivadas nesta região poderão, num futuro

próximo, estar ameaçadas devido à sua susceptibilidade a danos provocados pelo déficit hídrico e temperaturas elevadas. Estes importantes factores ambientais restringem o crescimento e a fotossíntese e, a adaptação das plantas às novas condições climáticas, passará pela capacidade de resposta do aparelho fotossintético às alterações ambientais. Tem sido demonstrado que a combinação de potenciais factores de stress (temperatura alta ou baixa, humidade relativa baixa e luz alta), predispõem as plantas à fotoinibição ou a um processo de regulação negativa, ou seja, contribuem para a redução da assimilação de carbono com reflexos negativos no crescimento e sobrevivência das plantas (Chaves e Oliveira, 2004), podendo, em casos mais graves, levar à foto-oxidação e morte.

1.2.2. Estratégias para sobreviver ao déficit hídrico e temperaturas elevadas

A habilidade das plantas para sobreviverem às consequências de um stress designa-se por resistência e varia com o genótipo (Chaves *et al.*, 2002). De acordo com Reddy *et al.* (2004), os stresses afectam negativamente o crescimento, metabolismo e produção das plantas. Por outro lado, os vários tipos de stress podem interagir uns com os outros modificando as respostas da planta. Por exemplo, as temperaturas extremas podem interagir com a seca, agravando os efeitos negativos na produção e na qualidade das culturas (Ashraf e Foolad, 2007). Assim, as plantas para enfrentarem os diferentes stresses abióticos têm desenvolvido uma série de mecanismos para contornar potenciais efeitos prejudiciais (Reddy *et al.*, 2004). As estratégias da planta para controlar o estado hídrico e resistir à desidratação são numerosas. Classicamente a resistência à seca tem sido dividida nas seguintes estratégias: escapar, evitar ou tolerar a seca. As plantas podem:

i) *escapar* à desidratação encurtando o seu ciclo de vida de modo a completá-lo antes da ocorrência do déficit hídrico (Chaves e Oliveira, 2004);

ii) *evitar* a desidratação maximizando a entrada de água e minimizando as perdas de água, principalmente através do controlo estomático e da condutividade hidráulica. Esta estratégia é geralmente obtida através de alterações morfológicas na planta, tais como diminuição da área foliar, desenvolvimento extensivo do sistema radicular e aumentos na razão raiz/parte aérea, assim como reduções na condutância estomática. Assim, evitar a seca é a capacidade da planta manter elevado o conteúdo hídrico do tecido sob condições de escassez de água (Reddy *et al.*, 2004);

iii) *tolerar* a desidratação desenvolvendo mecanismos adaptativos incluindo mudanças nas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, que lhes permitem ultrapassar o stress abiótico ambiental. Assim, a tolerância à seca é a capacidade da planta manter as suas funções normais mesmo a potenciais hídricos baixos (Reddy *et al.*, 2004). A tolerância dos tecidos vegetais à desidratação grave não é comum na maioria das plantas superiores, mas surgem em espécies nativas de ambientes extremamente secos (Chaves e Oliveira, 2004). A tolerância a stresses abióticos é muito complicada em todas as plantas e a nível celular, devido à complexidade das interações entre factores de stress e os vários fenómenos moleculares, bioquímicos e fisiológicos que afectam o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Ashraf e Foolad, 2007).

No entanto, estas estratégias não são mutuamente exclusivas e, na prática, as plantas podem apresentar vários tipos de combinação de respostas (Ludlow, 1989). Segundo Valliyodan e Nguyen (2006), os tecidos vegetais podem manter a turgescência durante a seca evitando a desidratação ou tolerando a desidratação ou ambos os processos.

Em suma, a adaptação e resistência das plantas a stresses ambientais traduzem-se em alterações no metabolismo da célula vegetal, que por vezes em condições de stress intenso, e devido às moléculas alvo serem demasiado danificadas, pode resultar numa morte celular (Reddy *et al.*, 2004). Assim, segundo o mesmo autor, compreender as respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares, resultantes da exposição das plantas a stresses abióticos, é crucial para compreender os mecanismos de resistência das plantas a condições ambientais adversas.

1.2.3. Comportamento fisiológico, danos oxidativos e protecção antioxidativa

A seca conjugada com elevadas temperaturas é uma das maiores limitações à expansão de culturas (Chaves e Oliveira, 2004), pois inibe o crescimento da planta devido aos efeitos negativos sobre os principais processos fisiológicos e bioquímicos (Tatar e Gevrek, 2008). O tipo de respostas ao défice hídrico e temperatura elevada depende da espécie, do estágio de desenvolvimento, do estado metabólico e da capacidade protectora da planta, assim como da duração e da intensidade do stress (Reddy *et al.*, 2004; Simova-Stoilova *et al.*, 2008). Estas respostas podem incluir, entre outras, a diminuição da abertura estomática, a produção de proteínas específicas, o ajustamento osmótico e alterações nos níveis endógenos dos reguladores de crescimento

(Passioura, 1983). A nível celular pode ocorrer a perda de rigidez, mudanças na fluidez e composição da membrana, alterações nas concentrações de solutos, e interacções proteína-proteína e proteína-lípidos (Valliyodan e Nguyen, 2006). Embora a expansão celular seja um dos primeiros processos a ser afectado, a fotossíntese é um dos processos fisiológicos mais sensível ao défice hídrico e temperaturas elevadas (Chaves *et al.*, 2002). No caso de um défice hídrico moderado, o fecho dos estomas é parcial e a planta recupera rapidamente quando se restabelecem as condições hídricas favoráveis (Teixeira e Ricardo, 1983). O mesmo pode não acontecer quando o défice hídrico tem efeitos mais drásticos, conduzindo ao fecho completo dos estomas. Em tais condições, a planta leva vários dias a recuperar e, em casos extremos, a capacidade fotossintética original pode nunca chegar a ser restabelecida (Teixeira e Ricardo, 1983).

A limitação da assimilação do CO₂ em plantas sujeitas a défice hídrico e/ou temperaturas elevadas provoca uma sobre-redução da cadeia fotossintética de electrões e, se for excedida a capacidade de dissipar energia da radiação em excesso daquela que pode ser consumida, desencadeia-se o mecanismo de fotoinibição e a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Demmig-Adams e Adams, 1996). No entanto, as plantas possuem um sistema antioxidante complexo que lhes permite confrontarem-se com o ROS (Smirnoff, 1993). Contudo, quando a acumulação de ROS em condições de stress (hídrico, térmico, etc.) excede a capacidade de remoção do sistema antioxidante, aparecem os danos oxidativos, incluindo a oxidação celular dos lípidos e proteínas, destruição dos pigmentos fotossintéticos e inactivação das enzimas fotossintéticas (Smirnoff, 1993). Então, o desenvolvimento do stress oxidativo é um resultado do desequilíbrio entre a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e a sua desintoxicação (Simova-Stoilova *et al.*, 2008). Os radicais livres podem atacar directamente os ácidos gordos polinsaturados nas membranas e iniciar a peroxidação lipídica provocando danos nas membranas (Chen *et al.*, 2006). Como as membranas são os primeiros alvos de muitos stresses, designadamente o hídrico e o térmico, a manutenção da sua integridade e estabilidade é um importante componente da tolerância à seca e às altas temperaturas. Por sua vez a danificação das membranas leva a um decréscimo da actividade fotossintética. O aumento do nível de peroxidação dos lípidos das membranas resulta num aumento da concentração do dialdeído malónico (MDA), que é considerado como o principal parâmetro para avaliar a extensão da oxidação da membrana (Al-Ghamdi, 2009). O dialdeído malónico é formado através da auto-oxidação e degradação enzimática dos ácidos gordos polinsaturados nas células (Hodges

et al., 1999). A determinação do MDA ou de substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) tem sido amplamente utilizada desde os anos 1950 para estimar a peroxidação dos lípidos nas membranas e sistemas biológicos (Jiang e Huang, 2001; Correia *et al.*, 2006). A presença de MDA nos tecidos tem sido relacionada com a indução da expressão de genes que codificam para enzimas do sistema anti-ROS, como, por exemplo, a dismutase do superóxido (SOD) e a peroxidase do ascorbato (APX). Assim o aumento do teor foliar de MDA, para além de ser indicador do stress oxidativo, também pode contribuir para a indução de mecanismos protectores dos tecidos contra os stresses. De acordo com Smirnoff (1993), o decréscimo no conteúdo em clorofila também é um sintoma típico do stress oxidativo e pode resultar da sua degradação ou de deficiência na sua síntese juntamente com alterações da estrutura das membranas tilacoidais.

O stress oxidativo desenvolvido como um efeito secundário, é, pois, potencialmente muito danificador da maquinaria fotossintética e, portanto, a capacidade de resposta dos sistemas protectores é um aspecto relevante a considerar na aclimação a novas condições ambientais. Por isso a tolerância a condições ambientais também está relacionada com o aumento da capacidade de limpar ou desintoxicar espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Chen *et al.*, 2006).

Sabe-se hoje que existem processos de protecção que permitem não só dissipar o excesso de energia como também aumentar o catabolismo dos radicais livres de oxigénio. A energia da luz visível absorvida pelas folhas pode ser usada na fotoquímica (e ultimamente na assimilação do carbono), dissipada como calor ou reemitida como fluorescência (Baker, 2008). O stress abiótico afecta profundamente a proporção desses processos e a capacidade das plantas para enfrentar o stress está directamente relacionada com a sua capacidade de dissipação do excesso de energia.

O excesso de energia, não utilizada na fotossíntese, pode ser dissipado directamente nos complexos clorofila-carotenóides das antenas do sistema fotossintético II (PSII) através da activação do ciclo das xantofilas (Demmig-Adams e Adams, 1996). Estes mecanismos de dissipação de energia são indicados por declínios na fluorescência da clorofila *a*, traduzindo-se pelos coeficientes de extinção da fluorescência, (coeficiente de extinção fotoquímico, q_p e coeficiente de extinção não fotoquímico, q_N) mensuráveis com fluorímetros de luz modulada. Então, os efeitos dos factores climáticos ou regimes hídricos no desempenho fotossintético das plantas podem ser rapidamente avaliados pela medição da fluorescência da clorofila, que é um método não invasivo e não

destrutivo (Baker, 2008). Este método tem sido frequentemente usado como um potencial indicador de stress ambiental e como um método de selecção de plantas resistentes a esses stresses (Guo *et al.*, 2005). Os rendimentos quânticos: i) do PSII (ϕ_{PSII}), ii) da dissipação de energia regulada (ϕ_{NPQ}), e iii) da dissipação de energia não regulada (ϕ_{NO}), que descrevem o destino da energia no PSII, dão indicações sobre a capacidade das plantas se defrontarem com o excesso de energia de excitação (Klughammer e Schreiber, 2008). Outras vias metabólicas como a fotorrespiração e a reacção de Mehler também funcionam como sumidouros importantes dos electrões resultantes de energia em excesso nos cloroplastos, em plantas submetidas a défice hídrico e/ou temperaturas elevadas. Contudo a fotorrespiração tem como produto final o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e a reacção de Mehler o radical superóxido (O_2^-), ambas espécies reactivas de oxigénio.

A capacidade das plantas superiores em eliminar estas espécies reactivas de oxigénio tóxicas parece ser um factor primordial na tolerância ao stress ambiental. Se não forem eliminados, os ROS acima mencionados podem ser convertidos em radicais hidroxilos altamente tóxicos que podem danificar membranas celulares, proteínas e ácidos nucleicos. A protecção de antioxidantes nas células vegetais é complexa e altamente compartimentada, compreendendo compostos enzimáticos e não-enzimáticos (Simova-Stoilova *et al.*, 2008) que desempenham um papel importante a fim de evitar efeitos nocivos dos radicais livres (Tatar e Gevrek, 2008). Do sistema de enzimas antioxidantes fazem parte a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase do ascorbato (APX) e a redutase da glutathione (GR). A SOD é responsável pela eliminação do radical O_2^- , nomeadamente nos cloroplastos (Bowler *et al.*, 1992). A catalase degrada H_2O_2 a H_2O e O_2 nos peroxisomas e mitocôndrias (Scandalios, 1994). As peroxidases usam o ascorbato ou compostos fenólicos para remover o H_2O_2 de vários compartimentos subcelulares (Castillo, 1992). Entre os outros antioxidantes fisiológicos não enzimáticos, que também contribuem para a dissipação dos radicais livres de oxigénio, contam-se o ascorbato e a glutathione. O ascorbato é o principal antioxidante primário que reage directamente com radicais hidroxilo, radicais de anião superóxido e singletos de oxigénio e a glutathione é um tampão redox e um substrato que mantém o ascorbato na forma reduzida por via de ascorbato-glutathione (Simova-Stoilova *et al.*, 2008).

A acumulação de alguns solutos orgânicos compatíveis, denominados osmoprotectores ou osmólitos (Reddy *et al.*, 2004; Ashraf e Foolad, 2007), como sejam os açúcares, as betaínas e a prolina, é também uma reacção das plantas ao stress hídrico e térmico. Geralmente, estes solutos protegem as plantas da seca contribuindo para o ajuste osmótico celular, desintoxicação/eliminação de espécies reactivas de oxigénio e protecção da integridade/estabilidade da membrana e de proteínas (Ashraf e Foolad, 2007) e são degradados após o alívio do stress (Valliyodan e Nguyen, 2006). Devido à limitação hídrica no solo à volta da raiz, alguns compostos como a prolina criam nas células condições adequadas para o acesso à água (Tatar e Gevrek, 2008). Segundo este autor, a prolina é um agente osmoprotector, e também está envolvida na redução dos danos oxidativos por eliminação e/ou redução de radicais livres. Embora haja um consenso de que a maioria dos factores de stress incrementam a acumulação de prolina nas plantas, ainda não é claro se este composto estará ou não envolvido no mecanismo de tolerância (Tatar e Gevrek, 2008).

O teor de antocianinas existentes nas folhas também tem sido correlacionado com a resistência a vários agentes bióticos ou abióticos (Close *et al.*, 2004). Manetas *et al.* (2003) já comprovava que os parâmetros ambientais como frio, seca, deficiência mineral induziam acumulação de antocianinas, e levantara a hipótese de que as antocianinas poderiam ser uma protecção contra a fotoinibição. Folhas de plantas que contêm níveis elevados de antocianinas muitas vezes têm valores de áreas foliares específicas (SLA) baixos. O SLA baixo é reconhecido como uma estratégia da planta para resistência à seca e à geada através do aumento da concentração osmótica do suco celular (Close *et al.*, 2004).

No geral, diferentes factores de stress abióticos podem provocar stress osmótico, stress oxidativo e desnaturação de proteínas nas plantas, que levam a respostas celulares adaptativas semelhantes, como a acumulação de solutos compatíveis e aceleração de sistemas de eliminação de espécies reactivas de oxigénio (Ashraf e Foolad, 2007).

1.3. Caracterização das espécies em estudo

Para este estudo seleccionaram-se duas espécies que exibem características potencialmente interessantes relativamente ao factor temperatura e stress hídrico: *Ceratonia siliqua* L. e *Tuberaria major* (Willk.) Pinto da Silva & Rozeira. Ambas são espécies bem adaptadas ao clima mediterrânico, mas enquanto a primeira é uma espécie

arbórea de grande porte originária da região mediterrânica oriental e introduzida pelos árabes no sul de Portugal (Figura 1.4), a segunda é uma espécie arbustiva de tamanho pequeno, endémica do Algarve (Figura 1.5).

1.3.1. *Ceratonia siliqua* L.

Ceratonia siliqua L. é uma espécie de crescimento lento pertencente à família *Fabaceae* conhecida por alfarrobeira. A família *Fabaceae* é uma das mais amplas famílias do reino vegetal, que inclui 650 géneros e 18000 espécies, e é extremamente variável em termos de morfologia e ecologia (Battle e Tous, 1997). Taxonomicamente, o género *Ceratonia* é considerado como um dos mais arcaicos das “*Leguminosas*”, completamente isolado de todas os outros géneros da sua família (Barracosa *et al.*, 2007). A classificação taxonómica actual é a apresentada na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Classificação taxonómica de *C. siliqua*.

| | |
|----------------|--------------------------|
| Reino | Plantae |
| Classe | Magnoliopsida |
| Ordem | Fabales |
| Família | Fabaceae |
| Género | <i>Ceratonia</i> |
| Espécie | <i>Ceratonia siliqua</i> |

A alfarrobeira é uma árvore característica da associação mediterrânica *Oleo-Ceratonion siliquae* que ocorre no litoral e barrocal do Algarve, podendo atingir 15 m de altura. Tem copa larga, densa, tocando normalmente o solo. Floresce de Setembro a Janeiro. As flores são pequenas e esverdeadas, e os frutos são vagens de polpa adocicada, as alfarrobas, que podem atingir 20 cm de comprimento (Pessoa *et al.*, 2004). A alfarrobeira é uma árvore perene de crescimento lento e de grande longevidade que surge em locais moderadamente secos a secos e em solos pobres, ocorrendo o seu cultivo predominantemente em solos calcários das regiões mediterrânicas (Battle e Tous, 1997). Devido às suas interessantes características agroecológicas, como resistência à seca e salinidade, adaptação a solos pobres, e a exigências mínimas culturais, tem sido comumente cultivada em toda a região mediterrânica (Osório *et al.*, 2007) sendo uma das árvores mais características desta região (Barracosa *et al.*,

2008). Tem importância económica significativa no Algarve, onde estão localizadas algumas indústrias de transformação primária e secundária, que são responsáveis por 14% da produção mundial anual e com tendência a aumentar devido ao número elevado de árvores plantadas nos últimos 10 anos. Além da importância económica esta espécie tem uma crescente importância ecológica, pois pode ser usada na reflorestação de áreas áridas e degradadas, crescendo bem em solos marginais onde outras espécies agrícolas não se adaptaram (Barracosa *et al.*, 2007). Interessantemente, segundo Barracosa *et al.* (2008) em 2003-2004 árvores de alfarrobeira foram responsáveis por limitar a propagação de um fogo na região do Algarve. O crescente risco do desaparecimento de alfarrobeiras, devido ao desenvolvimento urbanístico ou factores ambientais diversos (elevadas temperaturas, secas, etc.) torna urgente estudar a sua capacidade de resistência a factores de risco como os decorrentes do aquecimento global.

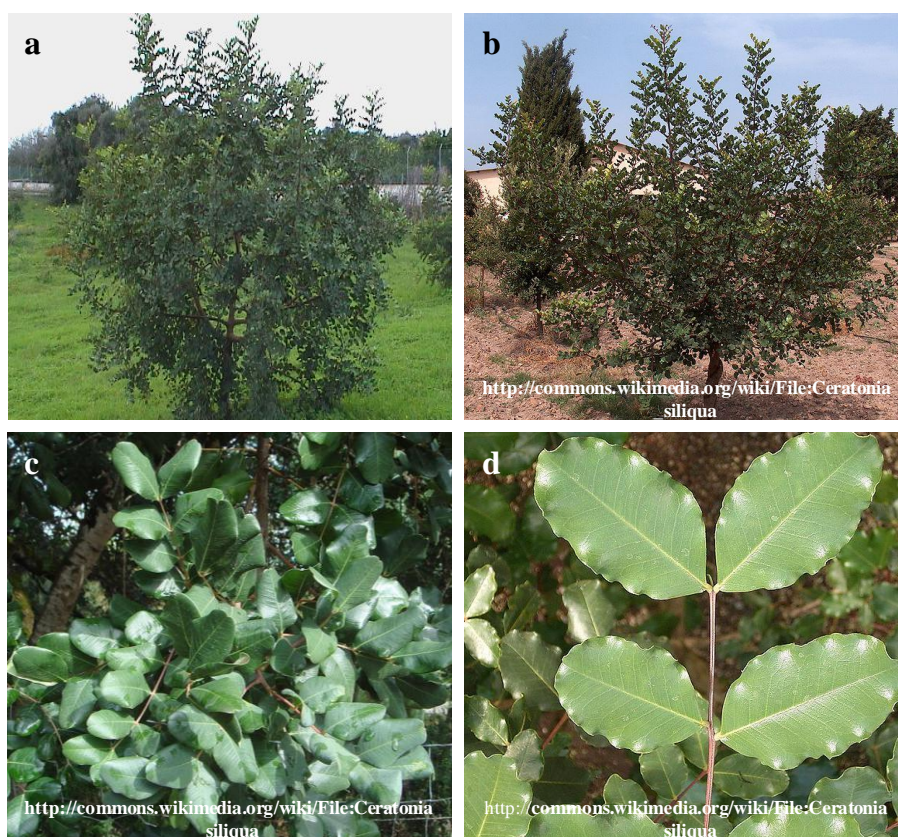


Figura 1.4. *Ceratonia siliqua*. [a e b - árvores de alfarrobeira no campo; c e d - folhas de árvores de alfarrobeira]

1.3.2. *Tuberaria major* (Willk) P. Silva & Rozeira

A *Tuberaria major* (Willk) P. Silva & Rozeira, por vezes referida como *Xolantha globulariifolia* (Wilk) Pinto Gomes, é uma espécie pertencente à família *Cistaceae*. A família *Cistaceae* é composta por 9 géneros com um total de 200 espécies e distribui-se especialmente pela região mediterrânica, mais especificamente na sua parte ocidental (Thanos *et al.*, 1992). *T. major* é vulgarmente conhecida por Alcar-do-Algarve devido a ser um endemismo lusitano, e está integrada na associação endémica de Portugal *Tuberario majoris-Stauracanthetum boivinii* Br.-Bl., P. Silva & Rozeira. A classificação taxonómica actual é a apresentada na Tabela 1.2.

Tabela 1.2. Classificação taxonómica de *T. major*.

| | |
|------------------|------------------------|
| Reino | Plantae |
| Subclasse | Dilleniidae |
| Ordem | Violales |
| Família | Cistaceae |
| Género | <i>Tuberaria</i> |
| Espécie | <i>Tuberaria major</i> |

As populações mais densas e extensas desta planta localizam-se no litoral, nos solos arenosos do limite poente da ria Formosa (Algarve). A espécie *T. major* é descrita como um hemicriptófito (planta com as gemas de renovo situadas na superfície do solo, muitas vezes envolvidas por folhas em forma de roseta), com toija lenhosa ramificada, com floração e frutificação de Março a Maio, e ocorre em solos arenosos ácidos, sobretudo nas clareiras de matos xerófilos (matos adaptados a condições de secura). É uma planta vivaz de pequenas dimensões, podendo atingir cerca de 40 cm, com as folhas dispostas na base do caule, e flores amarelas dispostas em cimeiras terminais. Esta espécie responde favoravelmente a fogos, atingindo densidades invulgares em situações pós-fogo, mesmo em locais onde era escassa, o que permite supor a existência de um extenso banco de sementes nos solos. A *T. major* apresenta elevado risco de extinção e a crescente pressão urbano-turística, com destruição e/ou fragmentação do habitat, constitui o principal factor de ameaça (ICN, 2006). Além disso, é importante avaliar se os mecanismos de resistência à secura e de fotoprotecção, que permitem à *T.*

major resistir às actuais condições adversas de Verão, serão eficazes face às futuras alterações climáticas.

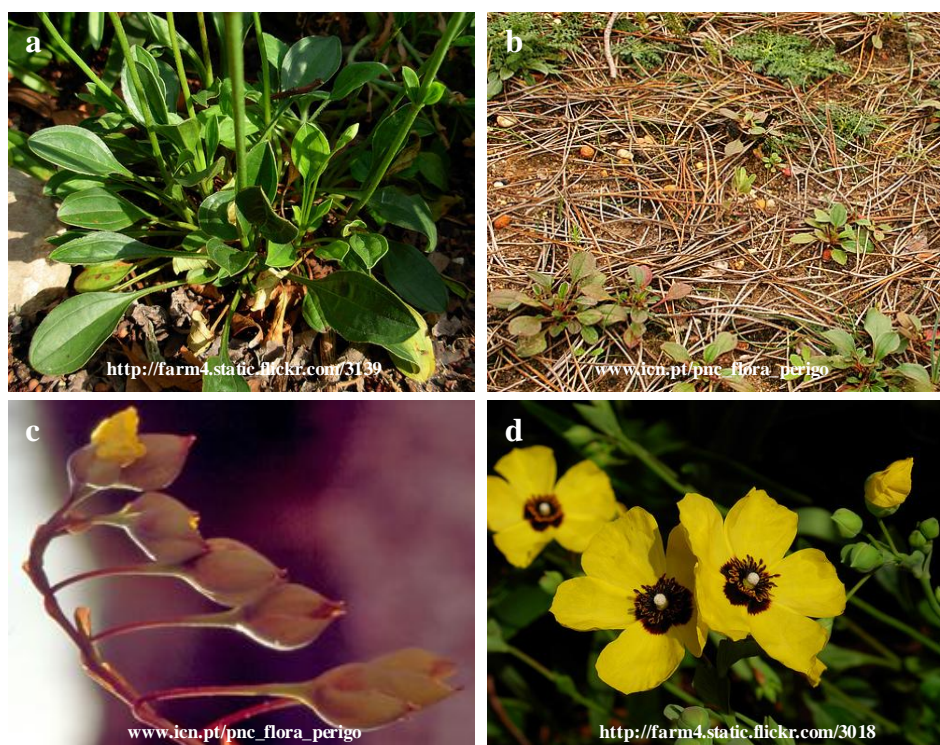


Figura 1.5. *Tuberaria major*. [a - planta adulta envasada; b - plântulas a germinarem após um incêndio; c e d - plantas na fase de floração]

1.4. Objectivos

A redução da disponibilidade hídrica e o aumento da temperatura antecipado pelos cenários das alterações climáticas à escala global irá, inevitavelmente, agravar o problema da escassez de água em toda a região mediterrânica. Uma vez que a *C. siliqua* é uma das principais culturas na região algarvia e a *T. major* é um endemismo em perigo de extinção nesta região, é fundamental analisar como é que estas espécies poderão ser afectadas por uma reduzida disponibilidade hídrica e/ou temperatura elevada. A melhoria da performance destas espécies não pode ser conseguida sem que os mecanismos de resistência à seca sejam claramente identificados. Tal não é possível sem que haja uma completa compreensão das limitações e dos danos induzidos por um fornecimento de água insuficiente e/ou temperatura elevada. Apesar destas espécies possuírem importantes atributos que lhes permitem sobreviver e reproduzir em ambientes áridos, muitos aspectos importantes da resistência à seca ainda não foram

abordados e são poucos os estudos científicos que documentam a sua adaptação ao défice hídrico e temperatura elevada.

Tendo em conta todos estes factos, os objectivos deste trabalho foram:

i) estudar as respostas imediatas e as estratégias adaptativas das espécies *C. siliqua* e *T. major* aos stresses hídrico e térmico em condições controladas, utilizando a fotossíntese como metabolismo integrador das respostas da planta;

ii) avaliar os sintomas de stress foto-oxidativo e identificar potenciais mecanismos de fotoprotecção induzidos pela baixa disponibilidade hídrica e/ou temperatura elevada, através da metodologia da fluorescência da clorofila *a* por imagem e análises bioquímicas;

iii) contribuir para a possibilidade de uma futura implementação de práticas culturais apropriadas para a redução do impacto dos stresses abióticos e para a obtenção de culturas capazes de tolerar as futuras alterações climáticas através do melhoramento genético.

2. Materiais e Métodos

2.1. Condições experimentais

Utilizaram-se folhas de plantas com cerca de um ano de uma cultivar portuguesa de *Ceratonia siliqua* designada por “Mulata” e da espécie endémica do Algarve *Tuberaria major*. As plantas de *C. siliqua* foram obtidas a partir da germinação de sementes fornecidas pelos viveiros florestais da Direcção Geral de Agricultura do Algarve. Após embebição das sementes numa solução diluída de ácido clorídrico e lavagem em água corrente, a germinação foi levada a cabo em perlite e, posteriormente, os germinantes foram transferidos para vasos maiores (3 dm³) contendo uma mistura de substrato fertilizado (SIRO Plant) com solo natural na proporção 2:1 (v/v). As plantas de *T. major* foram obtidas germinando *in vitro* sementes recolhidas em duas populações naturais desta espécie localizadas no *Campus* de Gambelas (Gonçalves *et al.*, 2009a) e posterior micropropagação (Gonçalves *et al.*, 2009b). Depois de aclimatizadas as plantas foram transferidas para vasos maiores com um substrato de perlite/vermiculite na proporção 3:1 (v/v).

As plantas desenvolveram-se numa estufa, tendo o crescimento ocorrido sob as condições naturais de temperatura, irradiância e humidade. Após cerca de um ano, foi seleccionado um lote de 24 plantas de *C. siliqua* e um lote de 20 plantas de *T. major* que se colocaram numa câmara de crescimento “walk-in” (Fitoclima 16000 EHVP, Aralab, Portugal) com controlo de irradiância, fotoperíodo, temperatura e humidade relativa. Durante as primeiras 4 semanas as plantas foram aclimatadas às novas condições ambientais: temperatura do ar 25/18 °C (dia/noite), humidade relativa 60%, densidade de fluxo fotónico fotossintético (PPFD) máximo de 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e um fotoperíodo de 12/12 h (dia/noite). No primeiro dia os vasos foram regados até o solo ficar completamente embebido e deixado a percolar durante a noite. No dia seguinte os vasos foram pesados, considerando-se esse peso como sendo o correspondente à capacidade de campo (CC). Todos os vasos foram regados até à CC: de dois em dois dias, com água e, semanalmente, com solução nutritiva (Complexal 12-4-6, Bayer). Nos dias de rega, os vasos foram rodados na bancada de modo a evitar possíveis interferências causadas por variações microambientais dentro da câmara (luz, temperatura e humidade). Após este período de aclimação, foram sorteadas 4/5 plantas de cada espécie em que foram feitas as medições de parâmetros fisiológicos e recolhidas amostras foliares para

posterior determinação de parâmetros bioquímicos. Este grupo de plantas, em que a água perdida por evapotranspiração (determinada por pesagem dos vasos) foi repostada até à capacidade de campo e que se desenvolveram em condições térmicas similares às médias primaveris no Algarve, foi designado como (25 °C/CC). Este tratamento foi considerado como controlo, em relação ao qual se avaliaram os efeitos causados pelos stresses térmico e hídrico. Posteriormente, o regime térmico da câmara de crescimento foi alterado para 32/21 °C (dia/noite), condições térmicas similares às previstas para o Verão na região Algarvia num futuro próximo. Após 2 semanas de aclimação ao novo regime térmico, durante as quais todos os vasos foram regados até à CC de um modo similar ao tratamento anterior, foram seleccionados aleatoriamente 4/5 vasos para os três tratamentos:

- 1) 32 °C/CC: plantas aclimatadas a 32/21 °C e regadas até à capacidade de campo;
- 2) 32 °C/SH: plantas aclimatadas a 32/21 °C e submetidas a stress hídrico;
- 3) 32 °C/R: plantas aclimatadas a 32/21 °C e recuperadas do stress hídrico, 24 ou 36 h após a rega.

Nas plantas representadas por 32 °C/CC a água foi sempre repostada na totalidade do peso perdido. O défice hídrico foi imposto por suspensão da rega durante 13 dias para a *C. siliqua* e 6 dias para a *T. major* (Figura 2.1). No dia das medições das plantas em stress hídrico (32 °C/SH) o substrato encontrava-se a 27% da capacidade de campo para *C. siliqua* e a 40% da CC para a *T. major*. A recuperação do stress hídrico foi feita com o volume de água necessário à reposição do peso perdido por evapotranspiração durante o desenvolvimento do stress, tendo como referência o peso dos vasos quando regados à capacidade de campo. Estas plantas em recuperação (32 °C/R) foram amostradas 36 horas no caso da *C. siliqua* e 24 horas no caso da *T. major*, após o início do alívio do stress.

Em cada amostragem mediu-se o potencial hídrico ao alvorecer (isto é antes de as luzes se acenderem), numa folha completamente expandida e não senescente. Cerca de 3 horas depois das luzes terem sido ligadas procedeu-se à medição, na folha jovem completamente expandida e previamente marcada, das trocas gasosas e fluorescência da clorofila nas condições ambientais da câmara. Imediatamente a seguir a estas medições, foram retiradas amostras para a determinação do teor relativo em água foliar (TRA) e massa foliar por área (LMA). Também foram colhidas amostras foliares para a determinação dos teores em pigmentos (clorofilas, carotenóides e antocianinas), prolina, quantificação do teor em dialdeído malónico (MDA) e enzimas antioxidantes. Depois de

colhido, o material vegetal foi imediatamente congelado em azoto líquido e armazenado a -80 °C até à realização das análises bioquímicas.

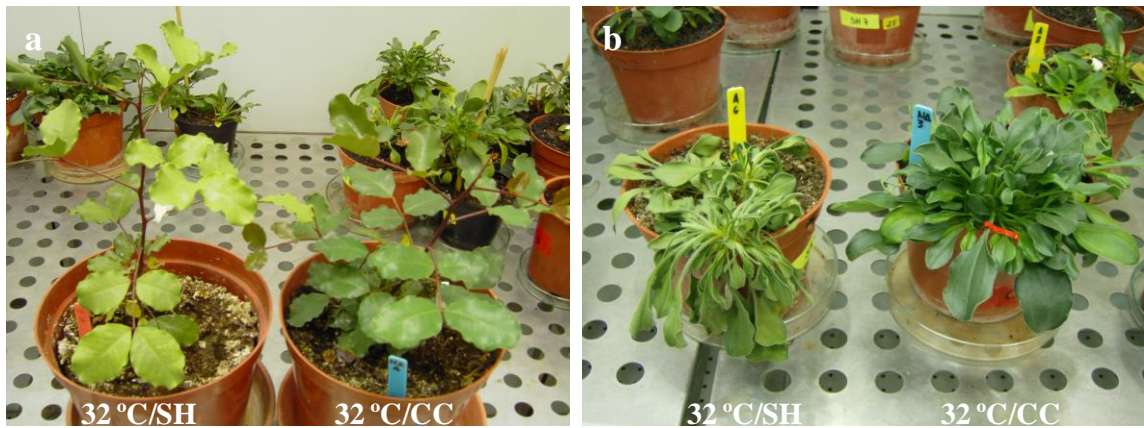


Figura 2.1. Plantas de estudo na câmara de crescimento “walk-in”. [a – *C. siliqua* e b – *T. major* dos tratamentos stress hídrico e térmico]

2.2. Parâmetros fisiológicos

2.2.1. Determinação do potencial hídrico e teor relativo em água e da massa foliar por área

O estado hídrico da planta foi caracterizado através da medição do potencial hídrico foliar (Ψ) no final do período escuro (madrugada) e do teor relativo em água na folha (TRA) realizado a meio do período luminoso. As medições do potencial hídrico foram feitas com uma câmara de pressão (PMS Instruments, Corvallis, OR) de acordo com Scholander *et al.* (1964) em folhas destacadas. O teor relativo em água foi determinado em discos foliares (3 discos com um diâmetro de 0,78 cm). O TRA reflecte a percentagem de água existente num tecido em dado instante ($P_f - P_s$) relativamente à sua água máxima ($P_t - P_s$) e foi calculado pela fórmula:

$$\text{TRA (\%)} = [(P_f - P_s) / (P_t - P_s)] \times 100$$

onde P_f corresponde ao peso fresco dos discos no momento da colheita, P_t ao peso túrgido, isto é, peso dos discos no estado de máxima hidratação (determinado após os discos terem estado mergulhados em água destilada durante 3-4 h a 5 °C no escuro) e P_s o peso seco da amostra (determinado após secagem dos discos em estufa própria durante 48 h a 80 °C).

A massa foliar por área (LMA), que dá uma indicação da espessura das folhas, foi calculada pela expressão:

$$\text{LMA (g m}^{-2}\text{)} = P_s / A$$

onde P_s corresponde ao peso seco da amostra (discos foliares) e A à área da mesma amostra.

2.2.2. Medições das trocas gasosas

As trocas gasosas foram medidas com um sistema aberto, portátil, de minicuvete (HCM 1000-Walz, Effeltrich, Alemanha). Este sistema permite medições rápidas das trocas gasosas em condições ambientais e funciona associado a um analisador de gases por infravermelhos (IRGA) de dois canais permitindo a medição diferencial $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$. O HCM 1000 é controlado por um computador que executa a aquisição de dados e os cálculos da condutância estomática (g_s) e da taxa de fotossíntese líquida (P_N), de acordo com von Caemmerer e Farquhar (1981). Nestas medições foram utilizadas folhas recém expandidas intactas e não destacadas, tendo as medições sido feitas às condições ambientais da câmara de crescimento (Figura 2.2).



Figura 2.2. Medição das trocas gasosas em *C. siliqua*.

2.2.3. Medições da fluorescência da clorofila *a*

Os valores dos parâmetros da fluorescência da clorofila *a* e respectivas imagens foram obtidos com um fluorímetro portátil de pulso modulado, IMAGING-PAM-MIN/B (Walz, Effeltrich, Alemanha), especialmente desenvolvido para o estudo de heterogeneidades bidimensionais da actividade fotossintética (Figura 2.3). Foi aplicado o método de pulsos saturantes, meio não destrutivo de análise do desempenho fotossintético das plantas. Isto permite determinar o rendimento quântico da conversão de energia nos centros de reacção do sistema fotossintético II (PSII), que pode ser afectado por vários factores intrínsecos e ambientais. A câmara digital (CCD) utilizada tinha uma resolução de 640×480 pixéis e foram captadas imagens da fluorescência da clorofila em função do tempo, fontes de luz e irradiâncias. Os valores de pixel das imagens foram exibidos com a ajuda de uma escala de cores falsa variando do preto (0,000) até ao vermelho, e passando pelo amarelo, verde, azul e rosa (terminando no 1,000). A fim de avaliar a heterogeneidade espacial e temporal seleccionaram-se quatro áreas de interesse (AOIs, círculos de diâmetro 3 mm) nas mesmas folhas em que se mediram as trocas gasosas: duas ao longo da nervura central (1 e 3) e as outras duas nas zonas periféricas (2 e 4). Após adaptação das folhas ao escuro durante 15 min, foi aplicado um pulso de luz modulada a 1 Hz e de fraca intensidade ($0,1 \text{ mmol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), o que permitiu obter imagens da fluorescência basal (F_0). As imagens da fluorescência máxima (F_m) foram obtidas pela aplicação de um pulso de luz saturante ($10000 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ PPF) modulada a 10 Hz. A eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m) foi calculada com base nos valores de F_0 e F_m : $F_v/F_m = F_m - F_0 / F_m$. Seguidamente, foi ligada a iluminação actínica ($249 \text{ } \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e, durante 5 min, a cada 20 s de intervalo foram aplicados pulsos saturantes para a determinação da fluorescência máxima à luz (F'_m) e da fluorescência da clorofila no estado estacionário (F_s). Para cada intervalo, foram registados as imagens e os valores dos vários parâmetros da fluorescência da clorofila. No estado de adaptação à luz (estado estacionário), o rendimento quântico do fotossistema PSII, ϕ_{PSII} , foi calculado de acordo com Genty *et al.* (1989) pela seguinte fórmula: $(F'_m - F_s) / F'_m$. Os rendimentos quânticos da energia dissipada no PSII, de um modo regulado (ϕ_{NPQ}) e de um modo não regulado (ϕ_{NO}), foram calculados de acordo com Kramer *et al.* (2004) pelas equações $\phi_{\text{NPQ}} = 1 - \phi_{\text{PSII}} - 1 / (\text{NPQ} + 1 + q_L(F_m/F_0 - 1))$ e $\phi_{\text{NO}} = 1 / ((\text{NPQ} + 1 + q_L)(F_m/F_0 - 1))$.



Figura 2.3. Medição da fluorescência da clorofila *a* em *T. major*.

2.3. Parâmetros bioquímicos

2.3.1. Quantificação dos pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos, clorofilas e carotenóides, foram quantificados espectrofotometricamente em extractos foliares. Os extractos foliares foram obtidos por maceração de discos foliares (1,43 cm²) em 4 mL de acetona a 100%, a 4 °C e no escuro. Foi recolhido 1,5 mL do homogeneizado para um tubo eppendorf e centrifugado a 13000 rpm durante 2 minutos. Foi retirado o sobrenadante da suspensão e feita a leitura das absorvâncias nos seguintes comprimentos de onda: 661,6 nm e 644,8 nm para a clorofila *a* e clorofila *b*, respectivamente, e 470,0 nm para os carotenóides, usando um espectrofotómetro Shimadzu UV-160 (Kyoto, Japão). Os teores de Cl *a*, Cl *b* e carotenóides totais (xantofilas e carotenos) foram estimados segundo Lichtenthaler (1987) pelas seguintes equações:

$$\text{Cl } a \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 11,24 \times A_{661,6} - 2,04 \times A_{644,8}$$

$$\text{Cl } b \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 20,13 \times A_{644,8} - 4,19 \times A_{661,6}$$

$$\text{Cl } (a+b) \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 7,05 \times A_{661,6} + 18,09 \times A_{644,8}$$

$$\text{Crt (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = (1000 \times A_{470} - 1,90 \times \text{Cl } a - 63,14 \times \text{Cl } b)/214$$

2.3.2. Quantificação das antocianinas

Os discos foliares (1,43 cm²) foram macerados num almofariz e homogeneizados em 1 mL de metanol acidificado (HCl a 1%). A fim de evitar a degradação de clorofilas, cujos produtos podem interferir na absorvância das antocianinas, manteve-se a suspensão a 4 °C durante as 4 h de incubação. Posteriormente, procedeu-se à remoção de partículas por centrifugação a 11000 rpm durante 20 min. Após a recolha do sobrenadante efectuou-se a leitura da absorvância das antocianinas nos picos 530 nm e 653 nm, num espectrofotómetro Shimadzu UV-160 (Kyoto, Japão). O conteúdo de antocianinas presente nos discos foliares foi determinado como descreveu Mancinelli (1984) usando a expressão:

$$\text{Ant } (\mu\text{g mL}^{-1}) = (A_{530} - 0,24 \times A_{653}) / E$$

sendo E o coeficiente de extinção (30 mL μmol^{-1}), com um peso molecular de 445 g mol⁻¹. A₅₃₀ devido às antocianinas foi normalizada para a A₅₃₀ subtraindo 24% da absorvância máxima da clorofila a A₆₅₃ da A₅₃₀.

2.3.3. Quantificação da prolina

Para a determinação do teor intracelular de prolina foi realizada uma extracção a partir do material vegetal (500 mg peso fresco macerado num almofariz, em azoto líquido) em 1,5 mL de etanol a 80%, seguida de uma centrifugação a 10000 rpm durante 5 min. O extracto sólido foi branqueado com carvão activado a fim de evitar interferências na leitura da absorvância. A quantificação de prolina foi determinada contra uma curva padrão (0 a 750 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com L-prolina (Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Alemanha) segundo o método de Magné e Larher (1992). Foi usada uma solução stock de prolina a 5mM e etanol a 80%. Foram adicionados 400 μL de solução de ninidrina a 1% (usando como solvente ácido acético: água, na proporção de 60:40) a cada 100 μL de extracto ou solução de prolina e a mistura foi incubada durante 1 h a 100 °C. Após arrefecimento a temperatura ambiente (5 min), foi adicionado 1 mL de tolueno a cada amostra ou solução de prolina, seguida de uma agitação vigorosa durante 15 s. A fim de se obter a separação da fase orgânica e inorgânica centrifugou-se a 3000 rpm durante 5 min. A fase orgânica (superior, avermelhada) foi recolhida e feita a leitura da absorvância a 520 nm, usando um espectrofotómetro Shimadzu UV-160 (Kyoto, Japão).

2.3.4. Quantificação dialdeído malónico (MDA)

Os danos provocados aos lípidos por espécies reactivas de oxigénio (ROS) foram estimados pela determinação do teor de dialdeído malónico (MDA) através do método de Hodges *et al.* (1999). O material vegetal (5,73 – 6,50 cm²) foi macerado num almofariz, em azoto líquido, e suspenso em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 20% (p/v). Após homogeneização, as suspensões foram centrifugadas a frio e a 4000 rpm durante 12 min (Heraeus Megafuge 1.0R, rotor de ângulo variável 3360, Alemanha). Para cada amostra foram feitos uma réplica e um branco. As amostras e respectivas réplicas foram obtidas pela adição de 500 µL de sobrenadante a 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) feita em TCA (TBA a 5% em TCA a 20%, v/v). No caso dos brancos, estes continham 500 µL de sobrenadante e 1,5 mL de TCA a 20%. Todas as amostras/réplicas e brancos foram incubados a 100 °C durante 25 min e depois arrefecidos em gelo durante 15 min, e novamente centrifugados a 11000 rpm durante 10 min. Após a recolha do sobrenadante, procedeu-se à leitura das absorvâncias nos comprimentos de onda 600, 532 e 440 nm usando um espectrofotómetro Shimadzu UV-160 (Kyoto, Japão). Os equivalentes de MDA foram calculados do seguinte modo:

$$\text{Eq MDA (nmol mL}^{-1}\text{)} = [(A - B)/157000] \times 10^6$$

$$A = (A_{532+\text{TBA}} - A_{600+\text{TBA}}) - (A_{532-\text{TBA}} - A_{600-\text{TBA}})$$

$$B = (A_{440+\text{TBA}} - A_{600+\text{TBA}}) \times 0,0571.$$

em que: $A_{532+\text{TBA}}$, $A_{600+\text{TBA}}$ e $A_{440+\text{TBA}}$ representam as absorvâncias das amostras nos comprimentos de onda 532, 600 e 440 nm, e $A_{532-\text{TBA}}$ e $A_{600-\text{TBA}}$ representam as absorvâncias dos brancos nos comprimentos de onda 532 e 600 nm. As concentrações de MDA foram determinadas usando o coeficiente de extinção de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ para MDA a 532 nm. As absorvâncias medidas a 600 e 440 nm permitiram ter em conta interferências como absorção não específica devido à turbidez e hidratos de carbono, respectivamente.

2.3.5. Quantificação de enzimas antioxidantes

Nas plantas em condições fisiológicas normais várias espécies reactivas de oxigénio (ROS) estão continuamente a ser removidas por diversos mecanismos enzimáticos, que incluem, entre outras, a catalase (EC 1.11.1.6) e a ascorbato-peroxidase (EC 1.11.1.11),

cujas actividades foram avaliadas neste estudo. A actividade das enzimas foi medida em extractos foliares obtidos a partir de folhas maduras e não senescentes. Depois de colhido, o material vegetal foi imediatamente congelado em azoto líquido e armazenado a -80 °C até à extracção das enzimas. As extracções e as leituras foram sempre realizadas no mesmo dia. As leituras de absorvância foram levadas a cabo num espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 (China).

a) Extracção e medição da actividade da catalase (CAT)

Para obtenção dos extractos foliares, o material vegetal (100 mg peso fresco) foi macerado em 980 mL de tampão fosfato de Na e K 50 mM pH 7, 20 µL de Triton X-100, 5 µL de Ditionitrosito (DTT), 15 mg de polivinilpirrolidona (PVPP) insolúvel e 4 µL de ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) 0,05 M. Todas as etapas necessárias ao processo de extracção foram executadas à temperatura de 4 °C. Seguidamente, as suspensões homogeneizadas foram centrifugadas a 14000 rpm durante 30 s, e o sobrenadante resultante, mantido no gelo, foi usado para a determinação da actividade da CAT.

A actividade da CAT foi determinada pelo consumo de H₂O₂ medido como o decréscimo na absorvância a 240 nm de acordo com o método de Aebi (1983). As leituras de absorvância foram realizadas de 1 em 1 s durante 2,5 min e à temperatura ambiente (25 °C). O branco foi preparado com 920 µL de tampão fosfato de Na e K 50 mM pH7 e 80 µL de H₂O₂ 500 mM. As amostras foram preparadas de modo similar, mas em que 20 µL de tampão foram substituídos por extracto. A actividade da CAT foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar 39,4 mM⁻¹ cm⁻¹ depois de se subtrair a taxa do controlo. Uma unidade de CAT é equivalente à quantidade de proteína necessária para decompor 1 µmol de H₂O₂ por minuto.

b) Extracção e medição da actividade da ascorbato-peroxidase (APX)

A extracção enzimática da APX foi realizada em 880 µL de tampão fosfato de Na e K 50 mM pH 7, 20 µL de Triton X-100, 5 µL de DTT, 15 mg de PVPP insolúvel, 4 µL de EDTA 50 mM e 100 µL de ascorbato 50 mM. Após homogeneização as suspensões foram centrifugadas a 14000 rpm durante 30 s e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da actividade da APX.

A actividade da APX foi determinada seguindo o consumo do ascorbato medido como o decréscimo da absorvância a 290 nm, de acordo com o método de Nakano e

Asada (1981). As leituras de absorvâncias foram realizadas de 1 em 1 s durante 2,5 min e à temperatura ambiente (25 °C). O branco foi preparado com 976 µL de tampão fosfato de Na e K 50 mM pH 7, 4 µL de EDTA 0,05 M, 5 µL de ascorbato 50 mM e 5 µL de H₂O₂ 50 mM. As amostras foram preparadas de modo similar, mas em que 10 µL de tampão foram substituídos por volume equivalente de extracto. A actividade foi calculada com base no coeficiente de extinção molar 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ após subtracção da taxa de controlo. Uma unidade de APX é equivalente à quantidade de proteína necessária para catalisar a oxidação de 1 µmol de ascorbato por minuto.

2.3.6. Quantificação da proteína solúvel

A proteína solúvel foi quantificada nos extractos preparados para a quantificação das enzimas antioxidantes. O doseamento das proteínas foi efectuado pelo método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando um reagente comercial (reagente de Bradford) e albumina bovina (BSA) como padrão. Primeiramente prepararam-se as soluções padrão de proteína BSA em solução de tampão fosfato de Na e K 50 mM pH 7. A uma microplaca de 92 poços foram adicionados, por poço, 5 µL de tampão (branco), 5 µL de cada solução padrão de BSA (com concentrações de 0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 mg L⁻¹) e 5 µL de cada amostra. Foram adicionados 250 µL de reagente Bradford a cada poço e a placa foi agitada durante 30 s. Após incubação do complexo corante-proteína durante 30 min à temperatura ambiente, procedeu-se à leitura das absorvâncias a 595 nm num espectrofotómetro Infinite M-200 (TECAN, Grödig, Áustria). Todas as misturas foram analisadas em triplicado.

2.4. Análise estatística

Os dados referentes aos diferentes tratamentos foram submetidos a análises de variância a um critério (ANOVA) ($\alpha = 0,05$) depois de testados para a distribuição normal e homogeneidade da variância. Sempre que se obteve um F significativo ($p \leq 0,05$), o nível de significância foi avaliado pelo teste de Dunnett, comparando as médias de cada um dos tratamentos com a média do controlo. A análise estatística e a representação gráfica dos dados foram realizadas com os “software” SPSS[®] (Versão 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL) e SigmaPlot[®] (Versão 10.00, Systat Software, Inc. San Jose, CA, USA), respectivamente.

3. Resultados

3.1. Parâmetros fisiológicos

3.1.1. Caracterização do estado hídrico das plantas e massa foliar por área

Os resultados das alterações no estado hídrico das espécies *C. siliqua* e *T. major* estão representados na Tabela 3.1. Na *C. siliqua* não se observaram diferenças significativas no potencial hídrico (Ψ) e no teor relativo em água (TRA) nas plantas bem regadas a temperatura alta (32 °C/CC) relativamente ao controlo (25 °C/CC). A aplicação gradual do stress hídrico a temperatura elevada (32 °C/SH) resultou num decréscimo significativo ($p \leq 0,05$) do potencial hídrico, cerca de 1,6 MPa. Este decréscimo de Ψ foi acompanhado por uma diminuição significativa do teor relativo em água, que atingiu valores aproximadamente iguais a 64%. No entanto, 36 horas após rehidratação a recuperação destes parâmetros foi completa. Na *T. major*, os parâmetros TRA e Ψ sofreram igualmente um decréscimo significativo ($p \leq 0,05$) depois da exposição das plantas à temperatura elevada e seca (32 °C/SH), embora menos acentuado que na *C. siliqua*. O declínio no potencial hídrico foliar foi apenas de 0,9 MPa e do teor relativo em água de 5%. Nestas plantas 24 horas após a rega a recuperação também foi total, tendo o TRA atingido valores superiores aos encontrados em plantas 25 °C/CC. Nos restantes tratamentos não se observaram diferenças significativas.

A massa foliar por área (LMA) não variou significativamente para nenhum dos tratamentos em ambas as espécies (Tabela 3.1), o que indicia que a espessura das folhas não sofreu alterações significativas.

3.1.2. Trocas gasosas

O défice hídrico aplicado a plantas crescidas a temperatura elevada induziu uma diminuição significativa na taxa fotossintética líquida (P_N) e na condutância foliar para o vapor de água (g_s) nas folhas de *C. siliqua* e *T. major* (Figuras 3.1, 3.2). O valor de P_N em folhas controlo de *C. siliqua* foi de 4,83 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$) para 1,05 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ em folhas 32 °C/SH, tendo recuperado completamente após a rega (Figura 3.1).

Tabela 3.1. Potencial hídrico foliar ao alvorecer (Ψ), teor relativo em água (TRA) e massa foliar por área (LMA) determinados em folhas de *C. siliqua* e *T. major* controle (25 °C/CC), crescidas a 32/21 °C e bem regadas (32 °C/CC), em déficit hídrico (32 °C/SH) e rehidratadas (32 °C/R).

| | <i>Ceratonia siliqua</i> | | | | <i>Tuberaria major</i> | | | |
|--|--------------------------|---------------|--------------|---------------|------------------------|---------------|--------------|---------------|
| | 25 °C/CC | 32 °C/CC | 32 °C/SH | 32 °C/R | 25 °C/CC | 32 °C/CC | 32 °C/SH | 32 °C/R |
| Ψ (MPa) | -0,33±0,057 | -0,35±0,028ns | -1,88±0,086* | -0,53±0,049ns | -0,24±0,026 | -0,29±0,019ns | -1,18±0,181* | -0,40±0,055ns |
| TRA (%) | 94,9±1,08 | 93,5±0,76ns | 63,8±4,29* | 92,9±0,06ns | 90,2±0,91 | 91,8±0,78ns | 86,0±1,16* | 94,5±0,85* |
| LMA (g_{ps} m⁻²) | 142,1±19,21 | 128,8±7,50ns | 113,1±5,15ns | 125,0±11,07ns | 86,5±5,68 | 109,9±9,52ns | 78,8±5,36ns | 115,0±20,46ns |

Os valores representam média \pm EP (N= 4 ou 5). Efectuou-se uma análise de variância a um critério seguida do teste Dunnett para estabelecer as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e o controlo (25 °C/CC) para uma $p \leq 0,05$. * indica diferenças significativas e **ns** diferenças não significativas.

A taxa fotossintética líquida da *T. major* a 32/21 °C sofreu igualmente uma redução significativa ($p \leq 0,05$) de aproximadamente 68% por imposição do stress hídrico, mas contrariamente à *C. siliqua*, não recuperou 24 horas depois da rega.

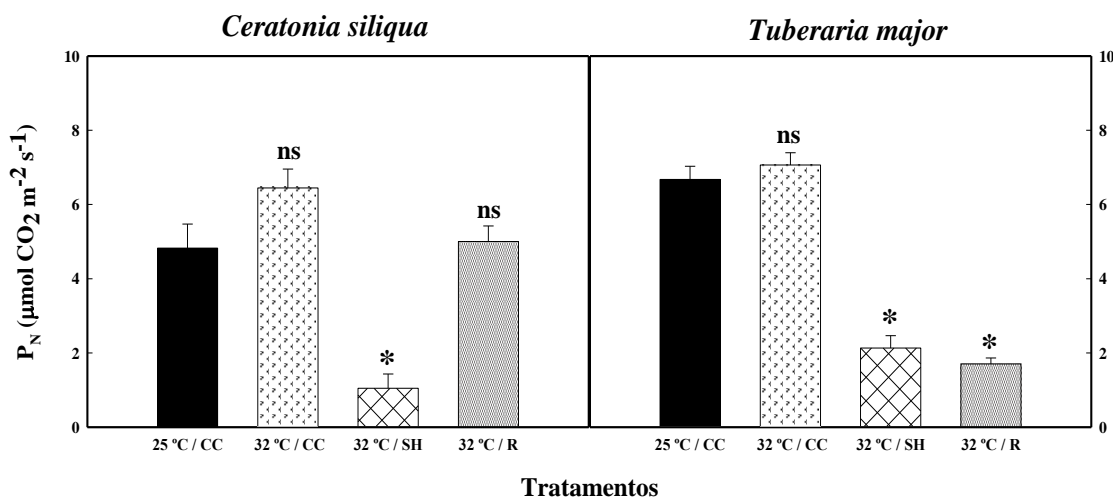


Figura 3.1. Taxa de fotossíntese líquida (P_N) determinada em folhas de *C. siliqua* e de *T. major* controlo (25 °C/CC), crescidas a 32/21 °C e bem regadas (32 °C/CC), em défice hídrico (32 °C/SH) e rehidratadas (32 °C/R). Os valores representam média \pm EP (N= 4 ou 5). Efectuou-se uma análise de variância a um critério seguida do teste Dunnett para estabelecer as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e o controlo (25 °C/CC) para uma $p \leq 0,05$. * indica diferenças significativas e **ns** diferenças não significativas.

A condutância estomática para o vapor de água em folhas de *C. siliqua* a 25 °C/CC diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$), cerca de 84%, no tratamento 32 °C/SH (Figura 3.2). Nos restantes tratamentos não se observaram alterações significativas.

As folhas de *T. major* a 32 °C/CC apresentaram valores de g_s muito significativamente superiores ($p \leq 0,05$) aos de folhas de plantas 25 °C/CC (Figura 3.2). Verificou-se um aumento dos valores de g_s até 256,4 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Nos restantes tratamentos não se observaram diferenças significativas entre plantas de controlo e plantas em stress, mas relativamente às plantas bem regadas a 32/21 °C o stress hídrico induziu um acentuado fecho dos estomas.

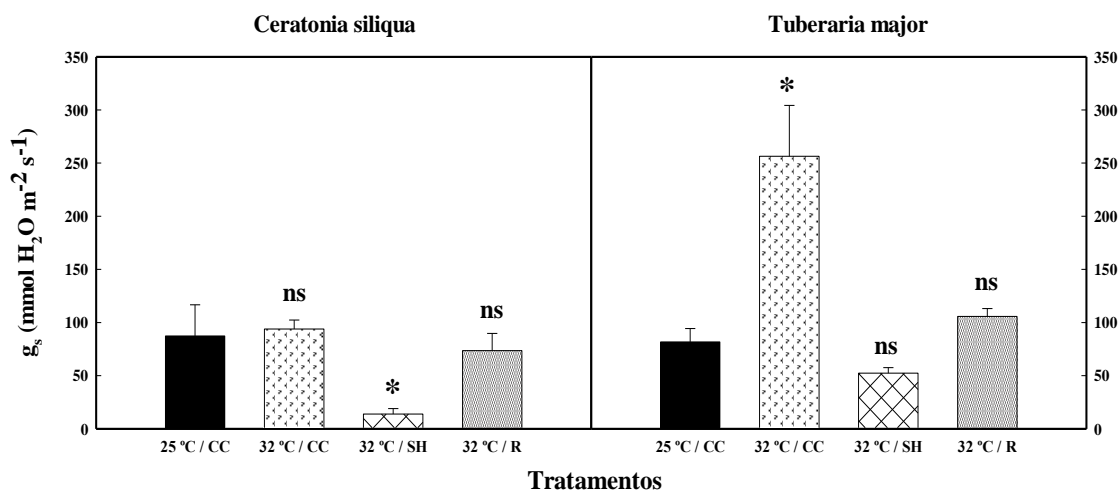


Figura 3.2. Taxa de condutância estomática (g_s) determinada em folhas de *C. siliqua* e de *T. major* controlo (25 °C/CC), crescidas a 32/21 °C e bem regadas (32 °C/CC), em défice hídrico (32 °C/SH) e rehidratadas (32 °C/R). Os valores representam média \pm EP (N= 4 ou 5). Efectuou-se uma análise de variância a um critério seguida do teste Dunnett para estabelecer as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e o controlo (25 °C/CC) para uma $p \leq 0,05$. * indica diferenças significativas e **ns** diferenças não significativas.

3.1.3. Fluorescência da clorofila *a*

As imagens da fluorescência da clorofila *a* revelaram alterações espaciais e quantitativas nos vários parâmetros medidos em folhas de plantas de *C. siliqua* sujeitas a uma secagem lenta e progressiva do solo, seguida de rehidratação. De facto, estas imagens mostraram um padrão da utilização de energia e da actividade fotossintética mais heterogéneo em folhas de plantas a 32 °C/SH e a 32 °C/R do que em plantas bem regadas dos dois regimes térmicos (Figura 3.4). Na Figura 3.3 estão representados os valores médios dos parâmetros medidos para cada AOI de cada tratamento que foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) a um critério, seguida do teste SNK para uma $p \leq 0,05$. Como se pode ver nas Figuras 3.3 e 3.4, folhas bem regadas de ambos os regimes térmicos e subsequentemente rehidratadas a 32/21 °C, apresentaram valores de eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m) próximos de 0,8 (zona do azul), ao contrário de plantas submetidas ao stress hídrico (32 °C/SH) que apresentaram valores de F_v/F_m próximos de 0,6 (zona do azul-esverdeado). A ANOVA efectuada às áreas de interesse (AOIs) do parâmetro F_v/F_m e para cada tratamento, revelou heterogeneidade significativa ($p \leq 0,05$) entre AOIs de plantas a 32 °C/SH. Nos restantes tratamentos, embora seja visível alguma heterogeneidade, as diferenças não foram

significativas. Relativamente ao rendimento quântico actual do fotossistema PSII (ϕ_{PSII}) obtiveram-se resultados semelhantes aos de F_v/F_m , com a excepção de que os valores do parâmetro ϕ_{PSII} foram mais baixos (zona do verde) devido a uma certa percentagem dos centros activos estarem no estado reduzido (Figuras 3.3, 3.4). A análise estatística efectuada ao parâmetro ϕ_{PSII} mostrou não haver heterogeneidade significativa entre AOIs para os tratamentos 25 °C/CC, 32 °C/SH e 32 °C/R, com a excepção do tratamento 32 °C/CC. Do mesmo modo, não se observaram diferenças significativas entre as AOIs para cada tratamento nos rendimentos quânticos da energia dissipada no PSII de um modo regulado (ϕ_{NPQ}) e de um modo não regulado (ϕ_{NO}), mas os valores de ϕ_{NO} foram superiores aos de ϕ_{NPQ} . Os resultados apresentados na Figura 3.3 também mostram claramente que a eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m) e o rendimento quântico actual do fotossistema PSII (ϕ_{PSII}) foram negativamente afectados pela imposição do stress hídrico, tendo recuperado quase completamente após a rega.

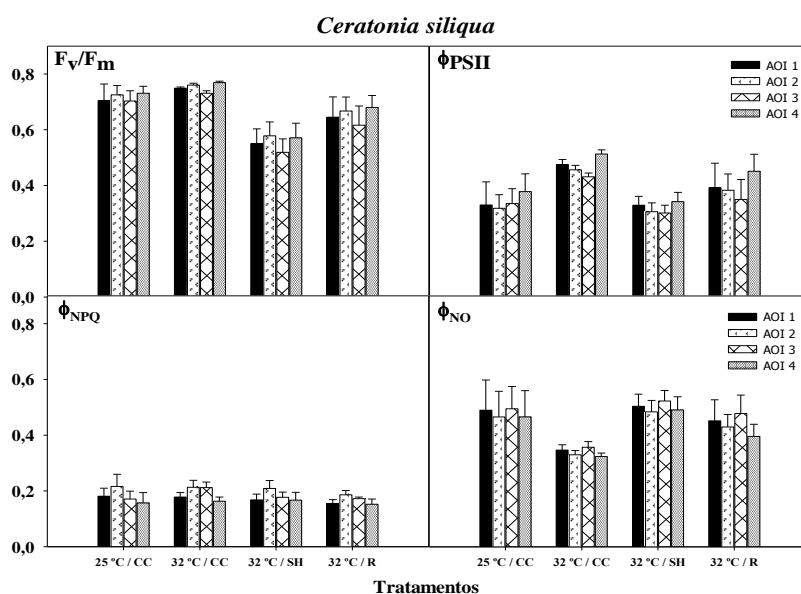


Figura 3.3. Eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), eficiência quântica do fotossistema PSII (ϕ_{PSII}), rendimento quântico da energia dissipada no PSII de um modo regulado (ϕ_{NPQ}) e de um modo não regulado (ϕ_{NO}) determinados em folhas de *C. siliqua* controlo (25 °C/CC), crescidas a 32/21 °C e bem regadas (32 °C/CC), em défice hídrico (32 °C/SH) e rehidratadas (32 °C/R).

Na *T. major*, as imagens de fluorescência de clorofila *a* revelaram uma coloração praticamente homogénea em todos os tratamentos (Figura 3.6). De facto, observando-se a Figura 3.6 nota-se que a tonalidade em folhas 32 °C/CC e 32 °C/R é diferente da tonalidade em folhas 25 °C/CC e 32 °C/SH.

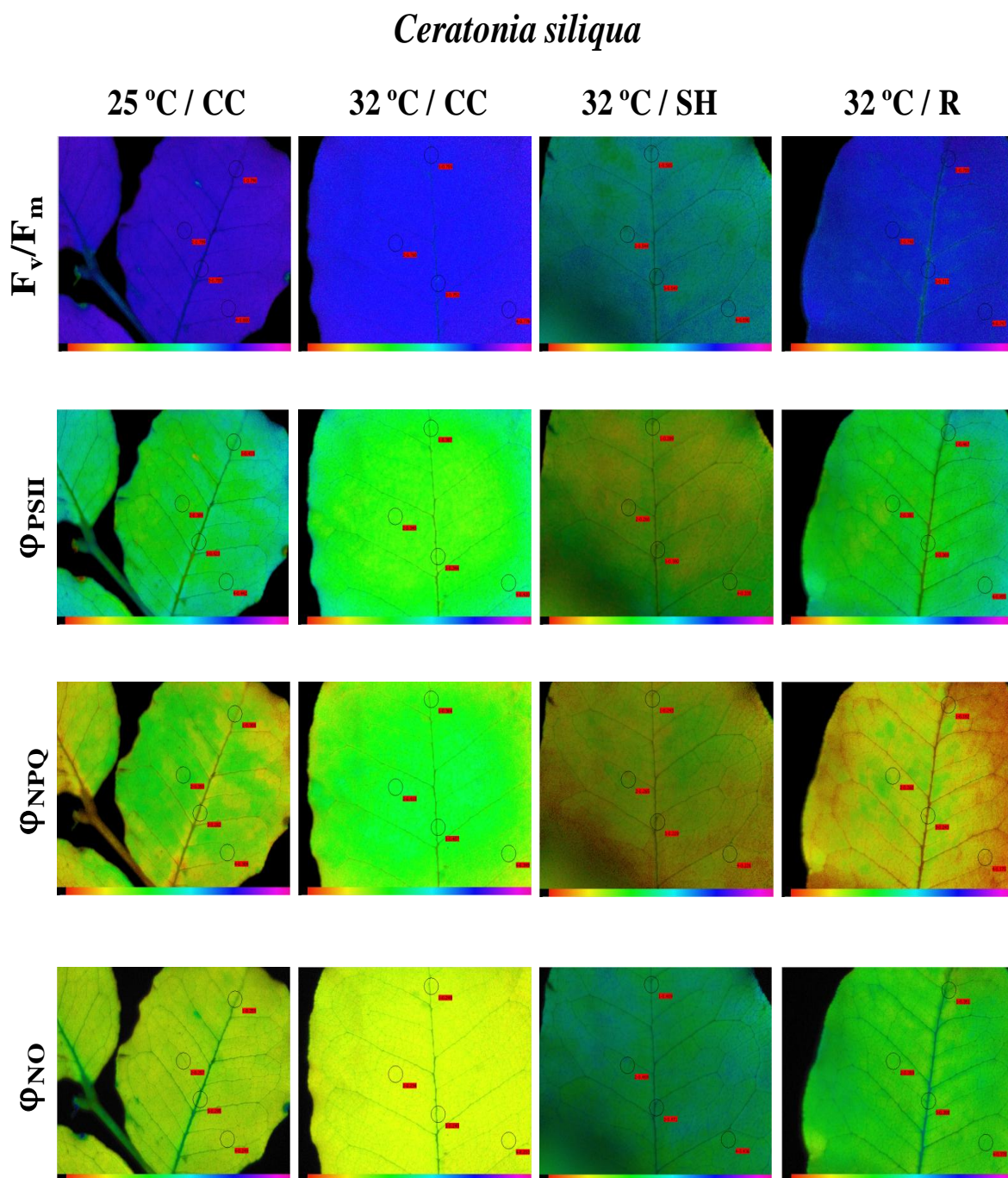


Figura 3.4. Imagens da fluorescência da clorofila: eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), rendimento quântico actual do PSII (ϕ_{PSII}), da energia dissipada no PSII de um modo regulado (ϕ_{NPQ}) e de um modo não regulado (ϕ_{NO}) determinadas em folhas de *C. siliqua* controlo (25 °C/CC), crescidas a 32/21 °C e bem regadas (32 °C/CC), em défice hídrico (32 °C/SH) e rehidratadas (32 °C/R). A escala de cores na parte inferior de cada imagem varia entre 0,000 (preto) até 1,000 (rosa). Os quatro pequenos círculos em cada imagem são as áreas de interesse (AOI) seleccionadas acompanhados por uma pequena caixa vermelha que mostra a média dos valores dos parâmetros de fluorescência dessas mesmas áreas.

Uma análise de variância a um critério seguida do teste SNK para uma $p \leq 0,05$ nestas plantas demonstrou heterogeneidade significativa ($p \leq 0,05$) entre AOIs do parâmetro F_v/F_m em plantas a 32 °C/SH, não se observando o mesmo nos restantes tratamentos. A eficiência quântica do fotossistema PSII (ϕ_{PSII}) apresentou resultados semelhantes entre os tratamentos, mas as plantas a 32 °C/CC exibiram valores ligeiramente superiores (Figuras 3.5, 3.6). Os resultados obtidos para o rendimento quântico da energia dissipada no PSII de um modo regulado (ϕ_{NPQ}) demonstraram que foi em plantas a 32 °C/CC que se obtiveram valores mais baixos, como mostra a Figura 3.5 e que está em concordância com a respectiva imagem da Figura 3.6. O rendimento quântico da energia dissipada no PSII de um modo não regulado (ϕ_{NO}) apresentou valores similares entre os tratamentos (Figuras 3.5, 3.6). A análise estatística efectuada aos parâmetros ϕ_{PSII} , ϕ_{NPQ} e ϕ_{NO} revelou que não existiram diferenças significativas entre as diferentes AOIs para cada tratamento. Os resultados apresentados na Figura 3.5 também mostram que a razão F_v/F_m e o ϕ_{PSII} aumentaram significativamente em plantas a 32 °C/CC e a 32 °C/R, ao contrário do ϕ_{NPQ} que diminuiu significativamente em folhas 32 °C/CC. No rendimento quântico da energia dissipada no PSII de um modo não regulado (ϕ_{NO}) não se observaram diferenças significativas entre os tratamentos.

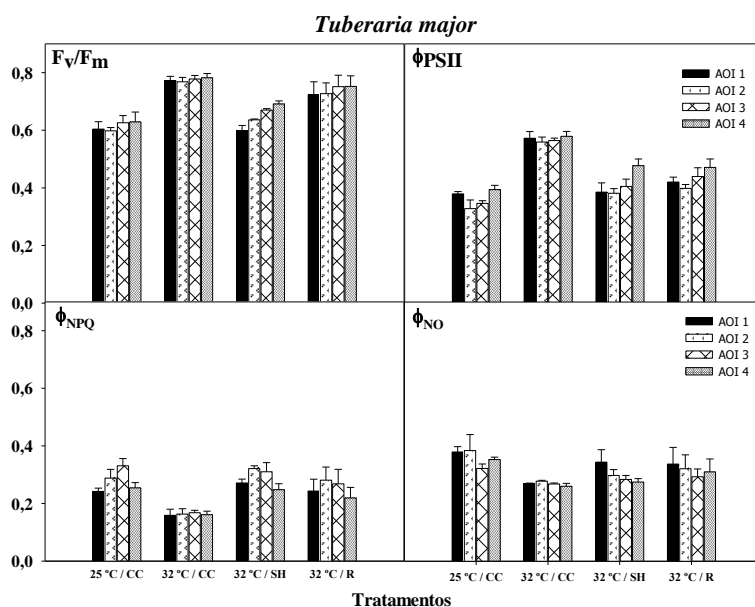


Figura 3.5. Eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), eficiência quântica do fotossistema PSII (ϕ_{PSII}), rendimento quântico da energia dissipada no PSII de um modo regulado (ϕ_{NPQ}) e de um modo não regulado (ϕ_{NO}) determinados em folhas de *T. major* controlo (25 °C/CC), crescidas a 32/21 °C e bem regadas (32 °C/CC), em défice hídrico (32 °C/SH) e rehidratadas (32 °C/R).

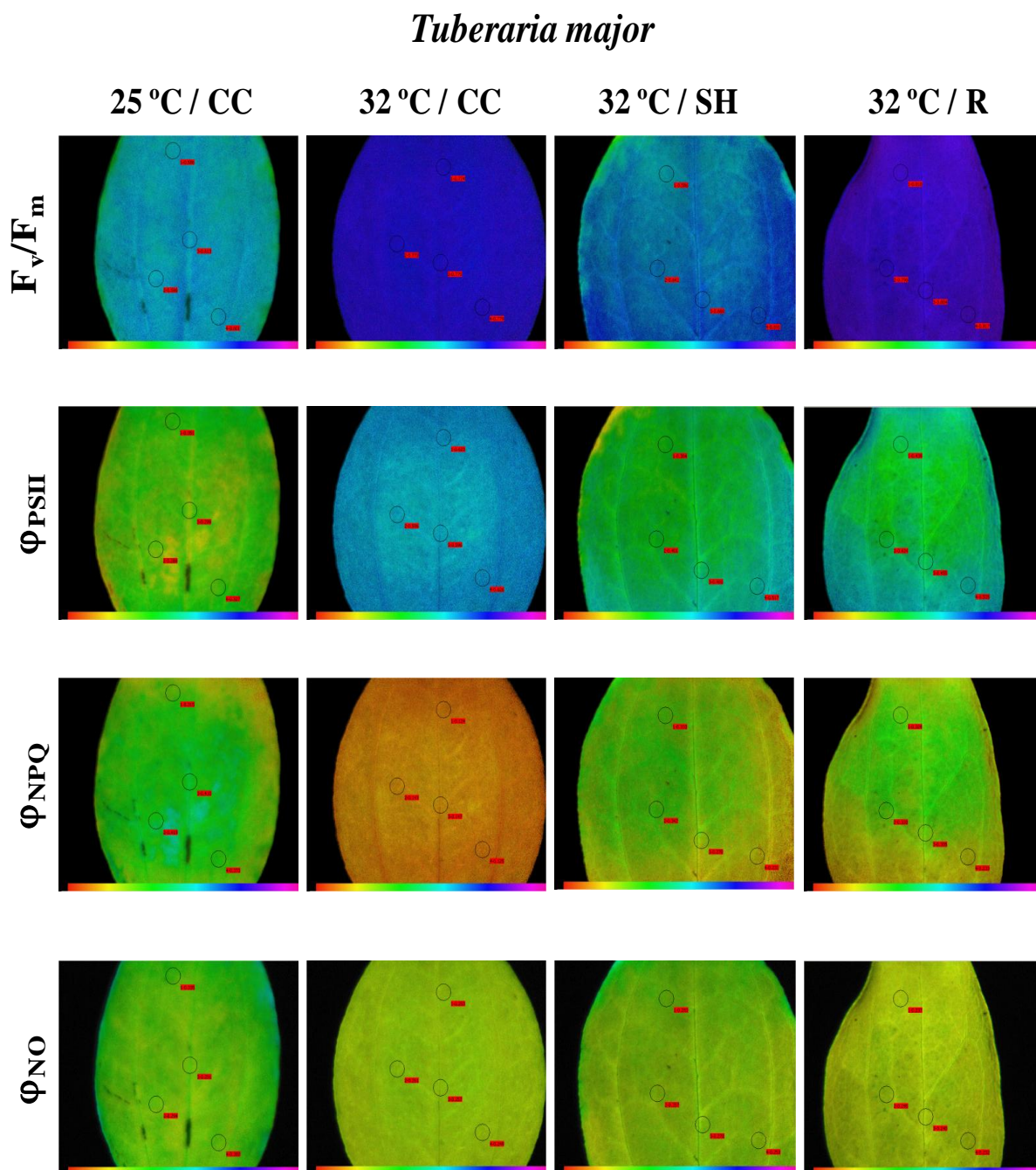


Figura 3.6. Imagens da fluorescência da clorofila da eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), eficiência quântica do PSII (Φ_{PSII}), rendimento quântico da energia dissipada no PSII de um modo regulado (Φ_{NPQ}) e de um modo não regulado (Φ_{NO}) determinadas em folhas de *T. major* controlo (25 °C/CC), crescidas a 32/21 °C e bem regadas (32 °C/CC), em défice hídrico (32 °C/SH) e rehidratadas (32 °C/R). A escala de cores na parte inferior de cada imagem varia entre 0,000 (preto) até 1,000 (rosa). Os quatro pequenos círculos em cada imagem são as áreas de interesse (AOI) seleccionadas acompanhados por uma pequena caixa vermelha que mostra a média dos valores dos parâmetros de fluorescência dessas mesmas áreas.

3.2. Parâmetros bioquímicos

3.2.1. Pigmentos fotossintéticos

O teor de clorofila *a*, clorofila *b*, assim como o de clorofila total em plantas de *C. siliqua* permaneceu constante ao longo dos diferentes tratamentos (Tabela 3.2), não se observando diferenças significativas entre plantas controlo e plantas em stress. Ao contrário dos carotenóides que sofreram um aumento significativo ($p \leq 0,05$) em folhas de regime térmico elevado e de stress hídrico (32 °C/SH). Na Tabela 3.2 também se pode observar que a razão Cl (*a+b*)/Crt diminuiu de forma significativa ($p \leq 0,05$) em plantas a 32 °C/R, ao contrário da razão Cl *a*/Cl *b* que não apresentou diferenças significativas entre plantas controlo e plantas em stress. Como mostra a Tabela 3.2, na *T. major* o teor de Cl *a* em plantas a 32 °C/CC atingiu valores significativamente mais elevados ($p \leq 0,05$) que em plantas a 25 °C/CC. No conteúdo de Cl *b* e Cl (*a+b*) não se observaram diferenças significativas entre plantas controlo e plantas em stress. A aplicação do regime térmico elevado, paragem de irrigação e posteriormente rehidratação, nas plantas teve efeitos nos carotenóides, pois as suas concentrações aumentaram significativamente ($p \leq 0,05$). Nesta espécie a razão Cl *a*/Cl *b* aumentou significativamente ($p \leq 0,05$) em plantas em stress (Tabela 3.2), contrariamente à razão Cl (*a+b*)/Crt, que diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$).

3.2.2. Antocianinas

Os tratamentos realizados nas duas espécies em estudo mostraram ter efeitos sobre o conteúdo de antocianinas presentes nas folhas, como mostra a Figura 3.7. Na *C. siliqua*, observa-se que o conteúdo de antocianinas em plantas de qualquer dos tratamentos foi significativamente superior ($p \leq 0,05$) relativamente às plantas controlo (25 °C/CC). As plantas a 32 °C/SH foram as que apresentaram maior quantidade de antocianinas, cerca de 39% superior a plantas a 25 °C/CC (Figura 3.7). Do mesmo modo, em *T. major* as folhas a 25 °C/CC foram as que apresentaram conteúdos de antocianinas mais baixos. A aplicação dos tratamentos 32 °C/CC e 32 °C/SH teve efeitos sobre as antocianinas presentes nas folhas, pois observou-se um aumento significativo ($p \leq 0,05$) de antocianinas nestas folhas (Figura 3.7).

Tabela 3.2. Teores de clorofila *a* (Cl *a*), clorofila *b* (Cl *b*), clorofila total (Cl (*a+b*)) e carotenóides totais (Crt) determinados em folhas de *C. siliqua* e *T. major* controlo (25 °C/CC), crescidas a 32/21 °C e bem regadas (32 °C/CC), em défice hídrico (32 °C/SH) e rehidratadas (32 °C/R).

| | <i>Ceratonia siliqua</i> | | | | <i>Tuberaria major</i> | | | |
|--|--------------------------|----------------|----------------|----------------|------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | 25 °C / CC | 32 °C / CC | 32 °C / SH | 32 °C / R | 25 °C / CC | 32 °C / CC | 32 °C / SH | 32 °C / R |
| Cl <i>a</i> (g m ⁻²) | 0,279±0,0152 | 0,292±0,0149ns | 0,302±0,0068ns | 0,239±0,0249ns | 0,258±0,0076 | 0,311±0,0107* | 0,292±0,0179ns | 0,298±0,0122ns |
| Cl <i>b</i> (g m ⁻²) | 0,187±0,0284 | 0,185±0,0183ns | 0,157±0,0166ns | 0,129±0,0224ns | 0,214±0,0177 | 0,188±0,0182ns | 0,151±0,0196ns | 0,150±0,0167ns |
| Cl (<i>a+b</i>) (g m ⁻²) | 0,466±0,0424 | 0,477±0,0321ns | 0,431±0,0443ns | 0,368±0,0357ns | 0,472±0,0194 | 0,499±0,0274ns | 0,444±0,0370ns | 0,448±0,0284ns |
| Crt (g m ⁻²) | 0,060±0,0026 | 0,065±0,0030ns | 0,073±0,0023* | 0,068±0,0041ns | 0,047±0,0054 | 0,072±0,0027* | 0,077±0,0030* | 0,079±0,0021* |
| Cl <i>a</i> / Cl <i>b</i> | 1,598±0,2462 | 1,613±0,1023ns | 1,753±0,0938ns | 2,129±0,4122ns | 1,242±0,1162 | 1,693±0,1154* | 1,998±0,1282* | 2,050±0,1306* |
| Cl total / Crt | 7,851±0,7602 | 7,390±0,6603ns | 6,524±0,2910ns | 5,507±0,4842* | 10,739±1,6626 | 6,922±0,4757* | 5,291±0,1983* | 5,636±0,3065* |

Os valores representam média ± EP (N= 4 ou 5). Efectuou-se uma análise de variância a um critério seguida do teste Dunnett para estabelecer as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e o controlo (25 °C/CC) para uma $p \leq 0,05$. * indica diferenças significativas e ns diferenças não significativas.

As plantas que foram submetidas a uma recuperação do stress hídrico, por irrigação até à sua CC, apresentaram valores de antocianinas superiores às plantas de controlo, mas não de forma significativa.

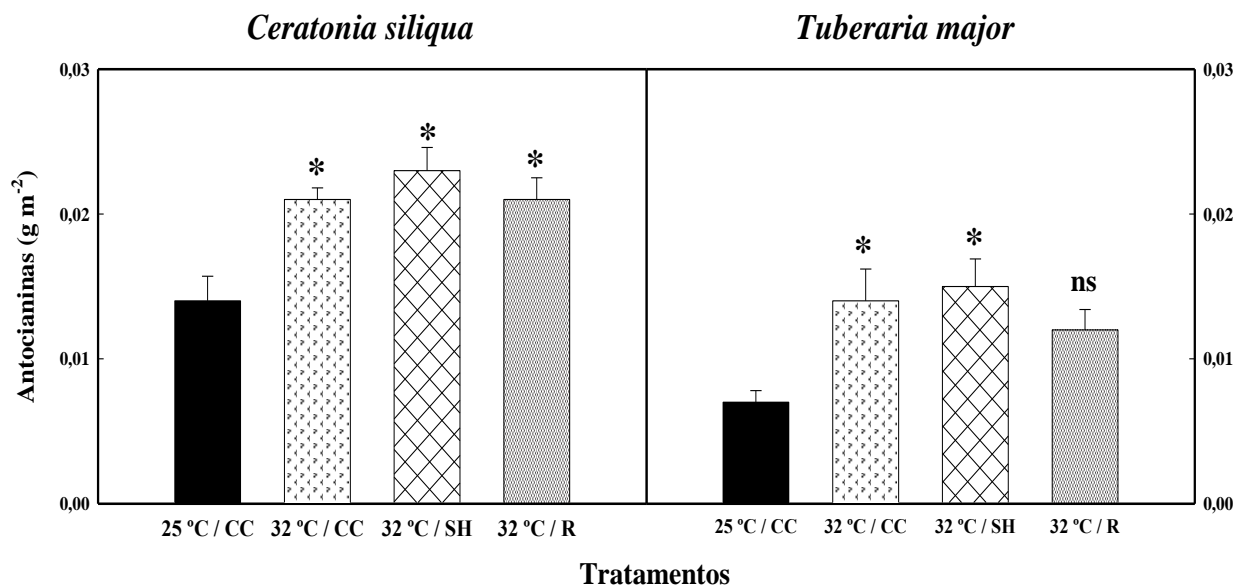


Figura 3.7. Teor de antocianinas determinado em folhas de *C. siliqua* e de *T. major* controlo (25 °C/CC), crescidas a 32/21 °C e bem regadas (32 °C/CC), em défice hídrico (32 °C/SH) e rehidratadas (32 °C/R). Os valores representam média \pm EP (N= 4 ou 5). Efectuou-se uma análise de variância a um critério seguida do teste Dunnett para estabelecer as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e o controlo (25 °C/CC) para uma $p \leq 0,05$. * indica diferenças significativas e ns diferenças não significativas.

3.2.3. Prolina

Os tratamentos realizados nas espécies *C. siliqua* e *T. major* mostraram ter efeitos diferentes no teor de prolina, como se pode visualizar na Figura 3.8. Na *C. siliqua*, a concentração de prolina aumentou muito significativamente ($p \leq 0,05$) em plantas a 32 °C/SH, observando-se um aumento de 5,22 $\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{PF}}$ (Figura 3.8). Nos restantes tratamentos não se observaram alterações significativas. Na *T. major*, o teor de prolina apresentou concentrações muito baixas em folhas 32 °C/CC e 32 °C/SH (Figura 3.8), e não foi mesmo detectável em folhas 25 °C/CC e 32 °C/R.

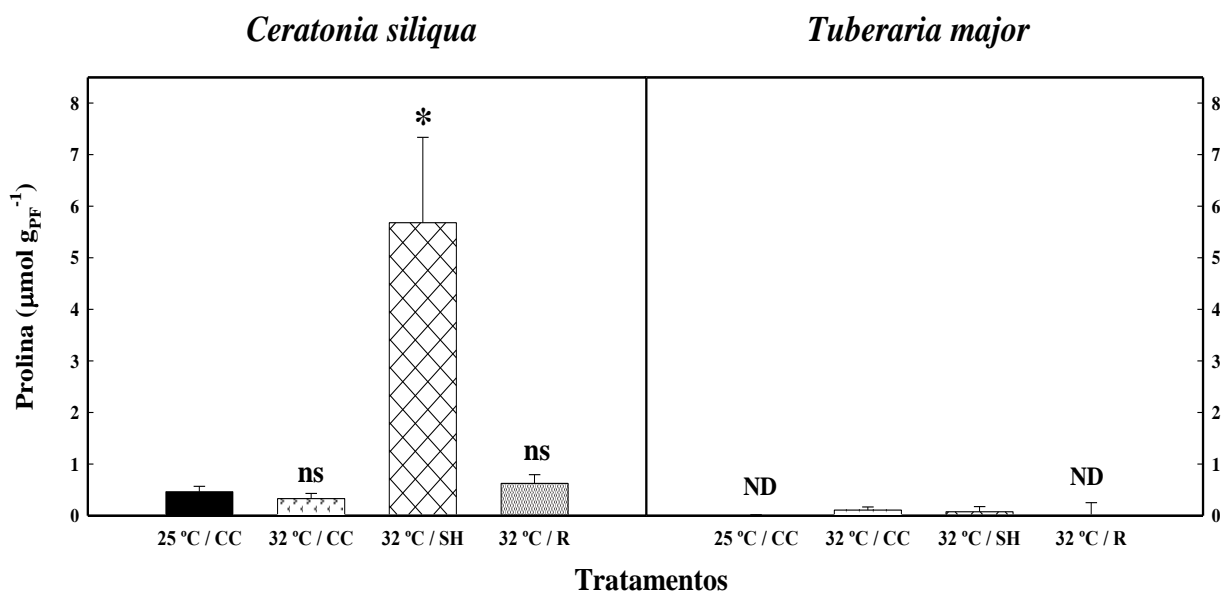


Figura 3.8. Teor de prolina determinado em folhas de *C. siliqua* e de *T. major* controlo (25 °C/CC), crescidas a 32/21 °C e bem regadas (32 °C/CC), em défice hídrico (32 °C/SH) e rehidratadas (32 °C/R). Os valores representam média \pm EP (N= 4 ou 5). Efectuou-se uma análise de variância a um critério seguida do teste Dunnett para estabelecer as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e o controlo (25 °C/CC) para uma $p \leq 0,05$. * indica diferenças significativas e **ns** diferenças não significativas.

3.2.4. Dialdeído malónico (MDA)

A peroxidação dos lípidos nas membranas foi estimada pela determinação do teor de dialdeído malónico (Figura 3.9). Em folhas de *C. siliqua* o teor de MDA aumentou significativamente ($p \leq 0,05$) com aplicação de stress hídrico e regime térmico elevado (32 °C/SH) às plantas, verificando-se um aumento significativo até 41,7 nmol g⁻¹_{PF} (Figura 3.9). Na recuperação do stress hídrico, os níveis de MDA atingiram valores inferiores aos encontrados em folhas controlo, mas não de forma significativa. Na *T. major*, o teor de MDA determinado nos vários tratamentos apresentou variações, no entanto não se observaram diferenças significativas entre plantas controlo e plantas em stress (Figura 3.9). As plantas submetidas à recuperação do stress hídrico à temperatura elevada apresentaram valores de MDA mais baixos que em plantas a 25 °C/CC, mas não significativamente diferentes.

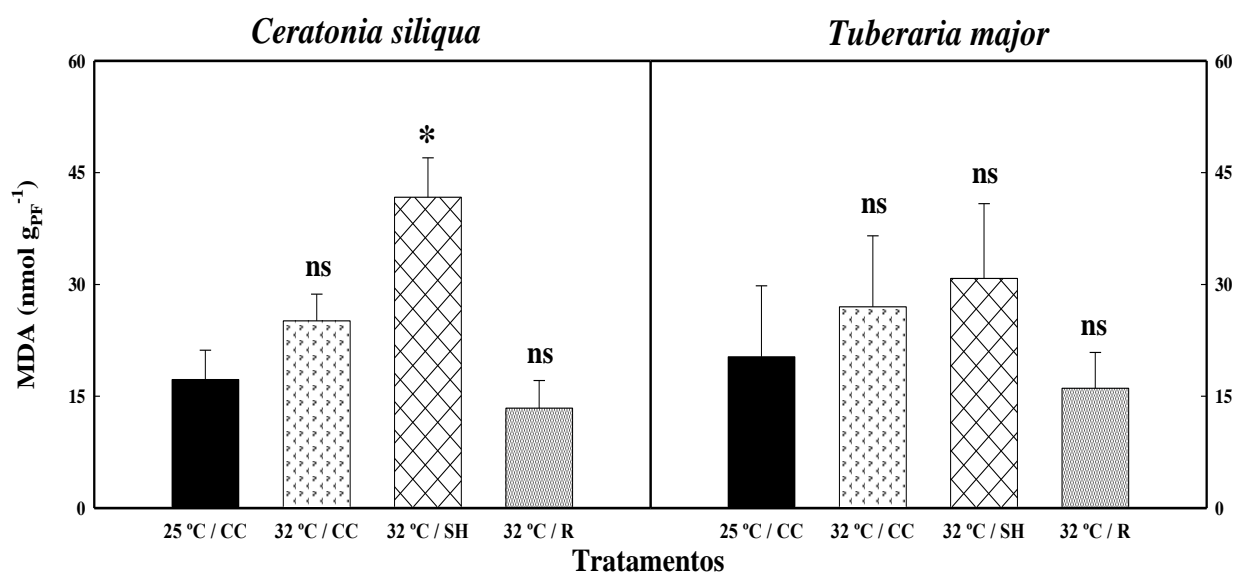


Figura 3.9. Teor de MDA determinado em folhas de *C. siliqua* e de *T. major* controlo (25 °C/CC), crescidas a 32/21 °C e bem regadas (32 °C/CC), em défice hídrico (32 °C/SH) e rehidratadas (32 °C/R). Os valores representam média \pm EP (N= 4 ou 5). Efectuou-se uma análise de variância a um critério seguida do teste Dunnett para estabelecer as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e o controlo (25 °C/CC) para uma $p \leq 0,05$. * indica diferenças significativas e **ns** diferenças não significativas.

3.2.5. Enzimas antioxidantes

Na Figura 3.10 estão representadas as actividades das enzimas antioxidantes, CAT e APX, presentes na *C. siliqua* e as suas alterações decorridas durante os tratamentos. A actividade da CAT diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$) em plantas a 32 °C/CC, a 32 °C/SH e a 32 °C/R relativamente às plantas controlo (25 °C/CC), mas o stress hídrico não induziu diferenças significativas relativamente às plantas bem regadas à mesma temperatura (Figura 3.10). Na actividade da APX não se observaram diferenças significativas entre plantas controlo e plantas em stress (Figura 3.10). No entanto, observa-se que em folhas rehidratadas a actividade da APX toma valores mais baixos e em folhas de stress hídrico toma valores ligeiramente mais altos.

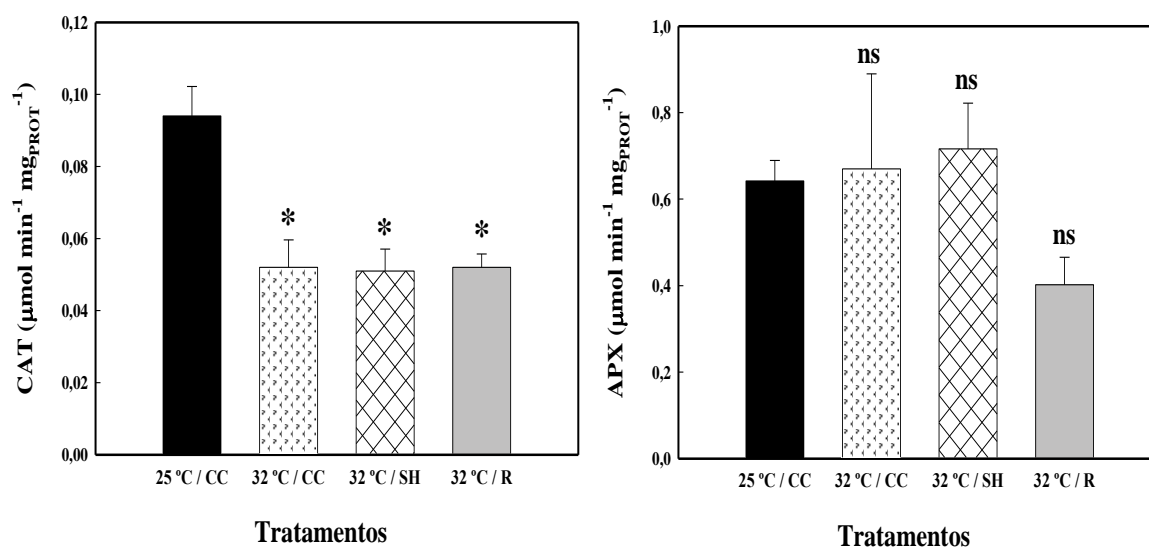


Figura 3.10. Actividades das enzimas antioxidantes, Catalase (CAT) e Ascorbato-peroxidase (APX), determinadas em folhas de *Ceratonia siliqua* controlo (25 °C/CC), crescidas a 32/21 °C e bem regadas (32 °C/CC), em défice hídrico (32 °C/SH) e reidratadas (32 °C/R). Os valores representam média \pm EP (N= 4 ou 5). Efectuou-se uma análise de variância a um critério seguida do teste Dunnett para estabelecer as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e o controlo (25 °C/CC) para uma $p \leq 0,05$. * indica diferenças significativas e ns diferenças não significativas.

3.2.6. Proteína solúvel

O teor de proteína solúvel, quantificada a partir dos extractos obtidos para a quantificação de enzimas antioxidantes, pode ser visualizado na Figura 3.11. Na *C. siliqua*, as concentrações de proteína foram diferentes nos tratamentos efectuados às plantas, verificando-se que aumentava após a aplicação de stress hídrico e regime térmico. No entanto, este aumento não foi significativo entre plantas controlo e plantas em stress.

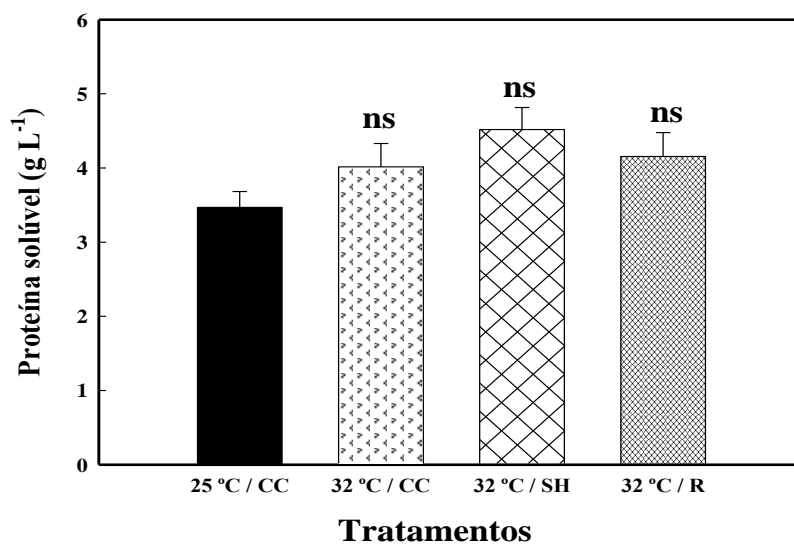


Figura 3.11. Proteína solúvel total (g L^{-1}) determinada em folhas de *Ceratonia siliqua* controlo (25 °C/CC), crescidas a $32/21\text{ °C}$ e bem regadas (32 °C/CC), em défice hídrico (32 °C/SH) e rehidratadas (32 °C/R). Os valores representam média \pm EP ($N= 4$ ou 5). Efectuou-se uma análise de variância a um critério seguida do teste Dunnett para estabelecer as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e o controlo (25 °C/CC) para uma $p \leq 0,05$. * indica diferenças significativas e **ns** diferenças não significativas.

4. Discussão

Os resultados deste trabalho mostraram que a imposição do stress hídrico a uma temperatura elevada afectou negativamente a actividade fotossintética das espécies *Ceratonia siliqua* e *Tuberaria major*. No entanto, há evidências que suportam a hipótese de que as respostas e os mecanismos de resistência ao stress hídrico são diferentes nas duas espécies.

Em *C. siliqua*, o estado hídrico das plantas submetidas ao regime térmico elevado não apresentou alterações relativamente ao controlo (25 °C/CC), ao contrário das plantas submetidas à secagem do solo durante 13 dias à mesma temperatura (Tabela 3.1). Nestas plantas (32 °C/SH) observou-se uma diminuição significativa do potencial hídrico foliar (Ψ) alcançando valores próximos de -1,90 MPa e do teor relativo em água (TRA) que atingiu valores inferiores a 70%, indicando que as plantas se encontravam sob um défice hídrico acentuado. Nogués e Baker (2000) também sugerem que períodos de seca severa durante o Verão afectam negativamente o teor relativo em água e o potencial hídrico nas folhas, e consequentemente a actividade fotossintética da vegetação mediterrânica. Por outro lado, esta espécie mostrou ser capaz de reverter esta situação com uma recuperação rápida do estado hídrico após a rehidratação, verificando-se um aumento no TRA (para aproximadamente 93%). O decréscimo no TRA só foi detectável quando a água disponível no solo atingiu valores mínimos. Isto sugere que a alfarrobeira é uma planta que, para ultrapassar os efeitos da seca, investe os recursos no desenvolvimento do sistema radicular para explorar níveis do solo onde a água esteja mais disponível. Esta conclusão está de acordo com Lo Gullo e Salleo (1988), que mostrou que *C. siliqua* é uma espécie que consegue evitar a seca, por uma estratégia de consumo de água mantendo TRA elevados para baixos valores de Ψ . Alguns autores, Rhizopoulou e Davies (1991), reforçam esta ideia com o facto de que a penetração profunda de raízes de plantas de *C. siliqua* pode abastecer a parte aérea da planta de uma quantidade de água considerável. No entanto, neste estudo verificou-se que esta estratégia não foi suficiente, provavelmente devido à baixa percentagem de água no solo (27%) e pelo facto da expansão radicular ser limitada em vasos.

Como se pode constatar nas Figuras 3.1 e 3.2 o declínio acentuado do TRA foi, acompanhado por decréscimos nas taxas fotossintéticas (P_N), em grande parte devido ao fecho dos estomas traduzido numa diminuição dos valores da condutância estomática

(g_s). Resultados similares foram obtidos por Ramalho *et al.* (2000), que concluíram que uma redução na condutância estomática pode diminuir o consumo de água através da transpiração e contribuir para a retenção de água na folha, podendo este ser um factor chave para evitar efeitos drásticos da seca no crescimento e fotossíntese. Valliyodan e Nguyen (2006), também afirmaram que a redução da actividade fotossintética pode resultar do fecho dos estomas. No entanto, a diminuição de g_s observada com um baixo valor de TRA (64%), poderá também indicar que o fecho parcial dos estomas não foi suficiente para evitar a perda de água. Falhando esta defesa de primeira linha (fecho dos estomas) a diminuição de P_N pode estar relacionada com alterações nas estruturas dos cloroplastos, pois segundo Dekov *et al.* (2000), os stresses hídrico e temperatura elevada influenciam muitos processos celulares, e os cloroplastos e suas membranas estão entre os principais alvos.

A inibição da fotossíntese detectada em plantas desidratadas a temperatura elevada foi acompanhada pela alteração de vários parâmetros de fluorescência da clorofila *a* que estão relacionados com a eficiência fotossintética. As imagens da fluorescência da clorofila mostraram as alterações espaciais que ocorreram no processo fotossintético devido a aplicação dos stresses, seca e temperatura elevada. Na *C. siliqua*, o stress hídrico acompanhado de temperatura elevada afectou negativamente a eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), e este parâmetro apresentou heterogeneidade significativa através da lâmina foliar (Figuras 3.3, 3.4). Tal heterogeneidade pode ser consequência do fecho dos estomas ser desigual e/ou falência de partes do mesófilo (Nogués e Baker, 2000). No entanto, a imposição de um regime térmico elevado não provocou alterações na razão F_v/F_m , mantendo esta razão perto de 0,8 (valor óptimo segundo Chaves *et al.*, 2002) em plantas bem regadas, sugerindo que a temperatura elevada não induziu danos nos centros de reacção do PSII. Contrariamente, as plantas a 32 °C/SH provavelmente sofreram danos nos centros de reacção do PSII (diminuição da razão F_v/F_m para próximo de 0,6). Embora a maquinaria fotossintética seja muito resistente ao stress hídrico e em condições de temperatura óptima só seja afectada para TRA menores que 60%, quando a temperatura se eleva pode ser afectada para TRA mais elevados (Chaves *et al.*, 2002). Segundo Dekov *et al.* (2000), o aparelho fotossintético é muito sensível a diferentes stresses e um dos primeiros sítios de lesão é o centro de reacção do fotossistema PSII, e a inibição da actividade fotossintética sob seca é, parcialmente, devido à inactivação do PSII. Estas alterações nos parâmetros da fluorescência da clorofila podem sugerir a ocorrência de alguma fotoinibição, e que o

fotossistema PSII é um alvo importante sob seca a temperatura elevada. O rendimento quântico actual do fotossistema PSII (ϕ_{PSII}) também apresentou algumas alterações com a imposição do stress hídrico, que juntamente com os valores elevados (aproximadamente 0,5) do rendimento quântico da energia dissipada no PSII de um modo não regulado (ϕ_{NO}), também podem sugerir a ocorrência de fotoinibição e, conseqüentemente, a produção de algumas espécies reactivas de oxigénio (ROS). Estes resultados, conjuntamente com a ocorrência de baixos valores de ϕ_{NPQ} também podem indicar que as plantas não foram capazes de se protegerem contra danos oxidativos e excessos de radiância, através da dissipação do excesso de energia, via ciclo das xantofilas. Contudo, outras vias, como a reacção de Mehler peroxidase e a fotorrespiração podem funcionar como sumidouros de electrões resultantes do excesso de energia quando há baixa disponibilidade de CO_2 nos cloroplastos. Estes processos estariam envolvidos na protecção do aparelho fotossintético de danos foto-oxidativos. Ambas as vias, reacção de Mehler e fotorrespiração, implicam um aumento na produção de espécies de O_2 tóxicas, como O_2^- e H_2O_2 (Schwanz *et al.*, 1996). No entanto, observou-se uma recuperação razoável da eficiência fotoquímica após a rehidratação das plantas, indicando que os danos oxidativos causados pelos stresses não foram irreversíveis.

Outra indicação da ocorrência do stress oxidativo poderá ser a degradação das clorofilas, contudo as concentrações das clorofilas *a* e *b* na *C. siliqua* não sofreram alterações significativas com a imposição da seca e temperatura elevada (Tabela 3.2). Reddy *et al.* (2004) sugere que a seca provoca perda dramática de pigmentos, porém esta perda não foi observada neste estudo. No entanto, os carotenóides aumentaram significativamente em plantas submetidas ao défice hídrico (Tabela 3.2). Estes resultados podem indicar que estes pigmentos tiveram um papel importante na protecção do PSII contra danos oxidativos, pois segundo Reddy *et al.* (2004) estes pigmentos estão envolvidos na eliminação de espécies reactivas de oxigénio que causam danos oxidativos.

O aumento dos carotenóides foi acompanhado pelo aumento das antocianinas (Figura 3.7) que, presumivelmente, também ofereceram protecção contra os danos oxidativos. Segundo Manetas *et al.* (2003) os parâmetros ambientais, como seca, induzem a acumulação de antocianinas, levando à hipótese de que as antocianinas podem proteger a planta da fotoinibição através das suas propriedades antioxidantes. O aumento da

concentração de antocianinas foliar também pode indicar resistência à seca (Close *et al.*, 2004).

Em resposta à seca as plantas também são conhecidas por sintetizarem solutos compatíveis (por exemplo, a prolina), que de uma forma geral estabilizam as membranas e mantêm a conformação das proteínas em potenciais hídricos foliares baixos (Reddy *et al.*, 2004). De facto, a acumulação de prolina ocorre em plantas submetidas ao stress hídrico, por exemplo, em plantas de arroz submetidas ao défice hídrico, a concentração de prolina aumentou nas folhas (Ashraf e Foolad, 2007). Em concordância, na *C. siliqua* observou-se um aumento significativo do teor de prolina em plantas de stress hídrico (Figura 3.8). Este resultado pode sugerir que a acumulação de prolina teve importância na protecção dos compostos celulares de danos resultantes da desidratação, funcionando como um osmoprotector (Ashraf e Foolad, 2007). Contudo, a prolina é também conhecida por estar envolvida na redução de danos oxidativos por eliminação e/ou redução de radicais livres (Tatar e Gevrek, 2008). Esta acumulação de prolina em plantas de stress hídrico decaiu quando as plantas foram rehidratadas, o que pode significar a diluição do seu conteúdo em consequência do aumento de água nos tecidos. Por outro lado, e de acordo com Ashraf e Foolad (2007), uma rápida degradação de prolina no alívio do stress pode fornecer suficientemente agentes redutores que suportam a fosforilação oxidativa mitocondrial, e a produção de ATPs para a recuperação do stress e a reparação de danos induzidos pelo stress.

Os resultados deste estudo também mostraram que a acumulação de prolina foi acompanhada pelo aumento do teor de dialdeído malónico (Figura 3.9). A acumulação de MDA é muitas vezes usada como um indicador da peroxidação lipídica (Smirnov, 1993). O aumento do teor foliar de MDA, pode estar relacionado com a redução das actividades das enzimas antioxidantes e do TRA depois de um stress hídrico prolongado ou de stresses combinados (Jiang e Huang, 2001).

Se a *C. siliqua* fosse uma espécie tolerante ao stress hídrico, seria de esperar que as defesas antioxidantes, designadamente as enzimas do sistema antioxidante, aumentassem para fornecerem protecção essencial contra danos oxidativos observados nas membranas celulares. Contudo, os stresses impostos às plantas resultaram, aparentemente, num decréscimo das defesas antioxidativas em vez do aumento (Figura 3.10). Neste estudo, a actividade da CAT diminuiu com a imposição dos stresses e a actividade da APX praticamente não sofreu alterações. Os autores Kubo *et al.* (1999) sugerem que, em plantas superiores, a capacidade de eliminação de espécies reactivas

de oxigénio seria um determinante muito importante da tolerância das plantas a ambientes de stress. E de acordo com Schwanz *et al.* (1996), plantas com baixa capacidade antioxidativa têm menor tolerância ao stress do que plantas com capacidade antioxidativa elevada. Assim, depreende-se que a *C. siliqua* não apresenta mecanismos antioxidantes enzimáticos que lhe poderiam conferir tolerância à seca e temperatura elevada. Nesta espécie, não se observaram alterações na proteína solúvel, indicando que o stress hídrico e temperatura não teriam induzido a produção de proteínas específicas (Figura 3.11).

Os resultados obtidos em *T. major* evidenciaram respostas diferentes à imposição dos stresses (seca e temperatura elevada) em relação à *C. siliqua*, com excepção das respostas observadas nos parâmetros hídricos. De facto, na *T. major* os parâmetros hídricos (Ψ e TRA) também foram afectados negativamente com a aplicação de stress hídrico (Tabela 3.1). No entanto, o declínio destes parâmetros nesta espécie não foi tão acentuado, assim como a recuperação do défice hídrico foi mais eficaz (Tabela 3.1). Assim, subentende-se que o fecho parcial dos estomas foi importante para evitar a perda de água (valor de TRA perto de 90%) e que as plantas conseguiram lidar/escapar melhor à seca. Aliás, as plantas recuperadas apresentaram valores de teor relativo em água bastante elevados (aproximadamente 95%). Em adição, tal como na *C. siliqua*, estes resultados também indicam que as alterações significativas nos parâmetros hídricos foram agravadas com a imposição do regime térmico elevado. Resultados similares de resposta à seca durante o verão foram também observados na espécie *Cistus albidus* L. (Cistaceae) (Jubany-Marí *et al.*, 2008), sugerindo os autores que esta espécie consegue tolerar o stress.

A *T. major* respondeu de maneira diferente da *C. siliqua* em relação às trocas gasosas efectuadas sob condições de stress, pois a aplicação dos stresses ambientais (seca e temperatura elevada) pareceu ter efeitos na taxa de fotossíntese líquida (P_N), mas não na condutância estomática (g_s), relativamente ao controlo a 25/18 °C (Figuras 3.1, 3.2). A redução na P_N observada pode ser atribuída a limitações estomáticas, onde o fecho dos estomas ocorre geralmente antes da inibição da fotossíntese e restringe a disponibilidade de CO₂ nos locais de assimilação nos cloroplastos (Hassan, 2006). No entanto, a condutância estomática foi apenas afectada pelo regime térmico elevado, aumentando significativamente (Figura 3.2). Esta evidência pode indicar que a temperatura elevada induziu a abertura dos estomas, aumentando a capacidade da fotossíntese. Porém, segundo Xu e Zhou (2006) um aumento da condutância estomática sob temperaturas

altas nem sempre leva a um aumento da capacidade da fotossíntese. Os resultados obtidos das trocas gasosas também podem sugerir que a imposição de ambos os stresses (seca e temperatura) são mais prejudiciais à *T. major* do que apenas a imposição de temperatura elevada. As plantas submetidas à recuperação do stress hídrico também apresentaram valores inferiores de P_N (Figura 3.1), indicando que estas não conseguiram recuperar eficientemente a taxa de fotossíntese.

Os resultados obtidos a partir das medições da fluorescência da clorofila *a* destacaram uma diferença interessante entre as duas espécies na resposta do aparelho fotossintético à seca e temperatura elevada (Figuras 3.5, 3.6). A partir das respectivas imagens da fluorescência da clorofila na *T. major* observa-se um aumento significativo em F_v/F_m e em ϕ_{PSII} , concomitantemente com decréscimos em ϕ_{NPQ} e ϕ_{NO} , quando se aplicou um regime térmico elevado às plantas. A partir deste resultado, subentende-se que a temperatura elevada pode ser benéfica para esta espécie, aumentando o rendimento quântico do PSII e diminuindo a necessidade de mecanismos protectores. Em contra partida, estes efeitos positivos da temperatura elevada foram atenuados pela acção do stress hídrico, de tal modo que os valores observados deixaram de ser significativamente diferentes do tratamento tomado como controlo (25 °C/CC). Estudos efectuados em *Tuberaria guttata* (L.) Fourr. (Cistaceae) por Fernández-Baco *et al.* (1998) indicaram que plântulas desta espécie são sensíveis às condições ambientais, extremos de temperatura e seca, e que não conseguem manter um fluxo de electrões consistente durante o dia.

O facto de a temperatura elevada não ter efeitos prejudiciais na *T. major* pode ser deduzido a partir das alterações ocorridas nos pigmentos fotossintéticos (Tabela 3.2). A concentração de clorofila *a* aumentou significativamente em plantas de regime térmico elevado, resultando num aumento da razão $Cl\ a/Cl\ b$. Este aumento sugere que ocorreram mudanças na composição dos pigmentos do aparelho fotossintético (Camejo *et al.*, 2005). A razão $Cl\ (a+b)/Crt$, pelo contrário, diminuiu ao longo dos tratamentos, pois observou-se que a concentração de carotenóides presentes nas folhas aumentou durante os tratamentos. Assim, nesta espécie a temperatura elevada levou a um tipo de resposta de tolerância dos pigmentos fotossintéticos. Resultados similares foram encontrados por Camejo *et al.* (2005). Estes autores também sugerem que os carotenóides não só desempenham um papel de pigmento acessório na absorção/captação da luz, mas também protegem os sistemas fotossintéticos contra espécies reactivas de oxigénio.

Tal como na *C. siliqua*, o aumento da concentração dos carotenóides na *T. major* também foi acompanhado pelo aumento de teores de antocianinas em plantas em stress, indicando que estas actuaram como protectores da fotoinibição. Outro destaque de resposta destas plantas à seca e temperatura elevada foi o ténue aumento do teor de prolina, relativamente às plantas controlo em que não se detectaram quantidades de prolina mensuráveis (Figura 3.8).

Analogamente, também se observou um ligeiro aumento, não significativo, nos teores de MDA em plantas de stress (Figura 3.9). Assim, estes resultados sugerem que o défice hídrico e a temperatura elevada não provocaram danos oxidativos nas membranas e que o aparecimento de antocianinas teve como finalidade a redução do risco de fotoinibição.

Deste modo, a preservação da integridade estrutural da membrana pode indicar que a *T. major* tem capacidade para tolerar os stresses hídrico e temperatura elevada.

5. Conclusões e Perspectivas futuras

Os resultados deste trabalho permitiram tirar conclusões acerca dos mecanismos de protecção foto-oxidativa e identificar alguns parâmetros indicadores de resistências nas espécies *Ceratonia siliqua* e *Tuberaria major*, a condições de défice hídrico e temperatura elevada que poderão surgir num futuro próximo em zonas mediterrânicas.

Os resultados dos parâmetros hídricos sugerem que a imposição do défice hídrico a temperatura elevada, afectou negativamente o estado hídrico da *C. siliqua* e da *T. major*, mas o impacto foi maior em *C. siliqua* do que em *T. major*, pois esta última apresentou TRA e Ψ mais elevados. Assim, pode concluir-se que a *T. major* consegue lidar melhor com a redução da água disponível no solo. No entanto, ambas as espécies mostraram capacidade de recuperar rapidamente e de um modo eficiente do stress hídrico após irrigação.

Em relação ao desempenho fotossintético, as duas espécies responderam de maneira diferente à combinação dos stresses ambientais. Enquanto em *C. siliqua* a temperatura elevada não alterou nem a taxa de fotossíntese (P_N) nem a eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), em *T. major*, ocorreram alterações mínimas na actividade fotossintética, mas a eficiência quântica máxima do PSII aumentou significativamente. Isto sugere um melhor desempenho fotossintético da *T. major* a temperatura elevada, desde que haja água disponível no solo em quantidade suficiente. A imposição do stress hídrico em *T. major* fez baixar esses parâmetros para valores similares aos do controlo, enquanto em *C. siliqua* foram atingidos valores significativamente menores, resultantes quer do fecho estomático quer de alterações a nível do mesófilo, que indiciam fotoinibição. No seu conjunto, estes factos apontam para uma maior capacidade de resistência à seca em *T. major* do que *C. siliqua*.

Com base nestes resultados, conclui-se que o stress hídrico e regime térmico elevado provocaram alterações na actividade fotossintética da *C. siliqua*, evidenciando que, nas condições experimentais impostas, esta espécie não conseguiu evitar a seca, resultando em danos oxidativos. Apesar das plantas de *C. siliqua* crescidas com baixa disponibilidade de água terem desenvolvido alguns mecanismos de defesa antioxidativa, como o aumento das concentrações de prolina, antocianinas e carotenoides, os níveis elevados de MDA, sugerem que os mecanismos contra o stress oxidativo não foram suficientes como estratégia de tolerância à seca. As funções de limpeza do ROS,

normalmente atribuídas às enzimas antioxidantes, CAT e APX, foram prejudicadas pelo stress hídrico, pois as suas actividades decresceram ou mantiveram-se constantes, respectivamente.

Os elevados teores foliares em carotenóides observados em *T. major* podem indicar que esta espécie possui uma elevada capacidade de evitar o stress foto-oxidativo, hipótese que é sustentada pelos dados relativos à concentração foliar em dialdeído malónico (MDA), que não se alterou durante a imposição dos stresses.

Em conclusão, os resultados obtidos na *C. siliqua* permitem concluir que a temperatura, agravando os efeitos negativos da escassez de água no estado hídrico das plantas, desencadeia fenómenos de foto-oxidação nesta espécie quais não possui capacidade de resistência suficiente e, por conseguinte o desempenho fotossintético é grandemente afectado, ao contrário da *T. major*. Contudo, e apesar dos resultados obtidos, as duas espécies apresentaram grande capacidade de recuperação após irrigação. Este efeito é muito importante, pois sugere que a irrigação pode ter um papel importante no futuro, indicando que é essencial para estas espécies lidarem com as condições ambientais típicas de zonas áridas e semi-áridas.

As técnicas utilizadas neste estudo mostraram-se apropriadas para uma compreensão das reacções, limitações e danos, induzidas pela exposição das espécies *Ceratonia siliqua* e *Tuberaria major* ao défice hídrico e/ou temperatura elevada. Porém, para explicar melhor estes mecanismos seria necessário desenvolver mais estudos a nível molecular, tais como: a determinação de espécies reactivas de oxigénio (por exemplo, H_2O_2 e O_2^-) sob as condições ambientais aqui estudadas, assim como a determinação de mais enzimas antioxidantes importantes (por exemplo, SOD e GPX) e de antioxidantes não enzimáticos (por exemplo α -tocoferol e glutathiona). Estes estudos poderiam auxiliar na compreensão do equilíbrio produção/remoção de ROS que pode ser perturbado pela acção de vários factores ambientais. Em adição, é também necessário otimizar os métodos experimentais de determinação dos mecanismos antioxidantes enzimáticos, nomeadamente no que diz respeito à *T. major*, visto que os métodos usados na *C. siliqua* não funcionaram para esta espécie.

Contudo, muitos outros estudos poderiam ajudar na compreensão de resistência das plantas aos stresses abióticos, como a avaliação do desenvolvimento do sistema radicular, a determinação da produção de proteínas específicas (por exemplo, proteínas de choque térmico), e uma avaliação específica das alterações na composição

membranar como resposta ao stress. Também seria importante avaliar os genes envolvidos na resistência aos stresses, permitindo um melhoramento genético e, por conseguinte, a obtenção de culturas capazes de tolerar as futuras alterações climáticas.

6. Referências bibliográficas

- Aebi H. (1983) Catalase *in vitro*. In: Methods of Enzymatic Analysis. H. Bergmeyer (Ed.), Weinheim: Germany, Verlag Chemie, 3: 273-277.
- Al-Ghamdi A.A. (2009) Evaluation of oxidative stress tolerance in two wheat (*Triticum aestivum*) cultivars in response to drought. International Journal of Agriculture and Biology 11: 7-12.
- Ashraf M., Foolad M.R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany 59: 206-216.
- Baker N.R. (2008) Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. Annual Review of Plant Biology 59: 89-113.
- Battle I., Tous J. (1997) Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy.
- Barracosa P., Osório J., Cravador A. (2007) Evaluation of fruit and seed diversity and characterization of carob (*Ceratonia siliqua* L.) cultivars in Algarve region. Scientia Horticulturae 114: 250-257.
- Barracosa P., Lima M.B., Cravador A. (2008) Analysis of genetic diversity in Portuguese *Ceratonia siliqua* L. cultivars using RAPD and AFLP markers. Scientia Horticulturae 118: 189-199.
- Bowler C., Van Montagu M., Inzé D. (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 43: 83-116.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Camejo D., Rodríguez P., Morales M.A., Dell'Amico J.M., Torrecillas A., Alarcón J.J. (2005) High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. Journal of Plant Physiology 162: 281-289.

- Castillo F.J. (1992) Peroxidases and stress. In Plant Peroxidases. Penei C., Gaspar T., Greppin H. (Ed.). Genova: University of Genova, pp.187-203.
- Chaves M.M., Pereira J.S., Maroco J., Rodrigues M.L., Ricardo C.P.P., Osório M.L., Carvalho I., Faria T., Pinheiro C. (2002) How Plants Cope with Water Stress in the Field. Photosynthesis and Growth. *Annals of Botany* 89: 907-916.
- Chaves M.M., Oliveira M.M. (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* 55 (407): 2365-2384.
- Chen Y., Zhang M., Chen T., Zhang Y., An L. (2006) The relationship between seasonal changes in anti-oxidative system and freezing tolerance in the leaves of evergreen woody plants of *Sabina*. *South African Journal of Botany* 72: 272-279.
- Close D.C., Beadle C.L., Battaglia M. (2004) Foliar anthocyanin accumulation may be a useful indicator of hardiness in eucalypt seedlings. *Forest Ecology and Management* 198: 169-181.
- Correia M.J., Osório M.L., Osório J., Barrote I., Martins M., David M.M. (2006) Influence of transient shade periods on the effects of drought on photosynthesis, carbohydrate accumulation and lipid peroxidation in sunflower leaves. *Environmental and Experimental Botany* 58: 75-84.
- Demmig-Adams B., Adams W.W. III. (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1: 21-26.
- Dekov I., Tsonev T., Yordanov I. (2000) Effects of water stress and high-temperature stress on the structure and activity of photosynthetic apparatus of *Zea mays* and *Helianthus annuus*. *Photosynthetica* 38 (3): 361-366.
- Fernández-Baco L., Figueroa M.E., Luque T., Davy A.J. (1998) Diurnal and seasonal variations in chlorophyll *a* fluorescence in two Mediterranean-grassland species under field conditions. *Photosynthetica* 35: 535-544.
- Genty B., Briantais J.M., Baker N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica Biophysica Acta* 99: 87-92.

- Gonçalves S., Fernandes L., Pérez-García F., González-Benito M.E., Romano A. (2009a) Germination requirements and cryopreservation tolerance of seeds of the endangered species *Tuberaria major*. *Seed Science and Technology* 37 (5): 480-484.
- Gonçalves S., Fernandes L., Romano A. (2009b) High frequency *in vitro* propagation of the endangered species *Tuberaria major*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (em impressão).
- Guo D-P., Guo Y-P., Zhao J-P., Liu H., Peng Y., Wang Q-M., Chen J-S., Rao G-Z. (2005) Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after turnip mosaic virus infection. *Plant Science* 168: 57-63.
- Hassan I.A. (2006) Effects of water stress and high temperature on gas exchange and chlorophyll fluorescence in *Triticum aestivum* L. *Photosynthetica* 44 (2): 312-315.
- Hodges D., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K. (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 20: 604-611.
- IPCC (2001) *Climate Change 2001: Impacts, Adaptation and Vulnerability*. Mc Arthy J.J., Canziani O.F., Leary N.A., Dokken D.J., White K.S. (Eds.). Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- ICN (2006) Instituto da Conservação da Natureza Plano Sectorial da Rede Natura 2000, Flora. www.icn.pt/psrn2000/caracterizacao_valores_naturais/flora/Tuberaria%20major.pdf.
- Jiang Y., Huang B. (2001) Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Science* 41: 436-442.
- Jubany-Marí T., Munné-Bosch S., López-Carbonell M., Alegre L. (2008) Hydrogen peroxide is involved in the acclimation of the Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L., to summer drought. *Journal of Experimental Botany* 1-13.
- Klughammer C., Schreiber U. (2008) Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Application Notes* 1: 27-35.

- Kramer D.M., Johnson G., Kiirats O., Edwards G.E. (2004) New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research* 79: 209-218.
- Kubo A., Aono M., Nakajima N., Saji H. (1999) Differential Responses in Activity of Antioxidant Enzymes to Different Environmental Stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* 112: 279-290.
- Larcher W. (2000) Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. *Plant Biosystems* 134 (3): 279-295.
- Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods of Enzymology* 148: 350-382.
- Lo Gullo M.A., Salleo S. (1988) Different strategies of drought resistance in three Mediterranean sclerophyllous trees growing in the same environmental conditions. *New Phytologist* 108: 267-276.
- Ludlow M.M. (1989) Strategies of response to water stress. In: *Structural and Functional Responses to Environmental Stresses*. Kreeb K.H., Richter H., Hinckley T.M. (Eds.), SPB Academic Publishing, The Hague, pp. 269–281.
- Magné C., Larher F. (1992) Higher sugar content of extracts interferes with the colorimetric determination of amino acids and free proline. *Analytical Biochemistry* 200: 115-118.
- Mancinelli A.L. (1984) Photoregulation of Anthocyanin Synthesis: VIII. Effects of light pretreatments. *Plant Physiology* 75: 447-453.
- Manetas Y., Petropoulou Y., Psaras G.K., Drinia A. (2003) Exposed red (anthocyanic) leaves of *Quercus coccifera* display shade characteristics. *Functional Plant Biology* 30: 265-270.
- Nakano Y., Asada K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Environment* 22: 867-880.
- Nogués S., Baker N.R. (2000) Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *Journal of Experimental Botany* 51 (348): 1309-1317.

- Osório M.L., Osório J., David M.M., Romano A. (2007) Field Performance of Seedlings and Micropropagated Plantlets of Carob Tree. *Acta Horticulturae* 748.
- Passioura J.B. (1983) Roots and drought resistance. *Agricultural Water Management* 7: 265-280.
- Pessoa F.S., Pinto J.R., Alexandre J.R. (2004) Plantas do Algarve com interesse ornamental. Edições Afrontamento. Lisboa, Portugal.
- Petit R.J., Hampe A., Cheddadir R. (2005) Climate Changes and Tree Phylogeography in the Mediterranean. *Taxon* 54 (4): 877-885.
- Ragab R., Prudhomme C. (2002) Climate change and water resources management in arid and semi-arid regions: prospective and challenges for the 21st century. *Biosystems Engineering* 81: 3-34.
- Ramalho J.C., Lauriano J.A., Nunes M.A. (2000) Changes in photosynthetic performance of *Ceratonia siliqua* in summer. *Photosynthetica* 38 (3): 393-396.
- Reddy A. R., Chaitanya K. V., Vivekanandan M. (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 161: 1189-1202.
- Rhizopoulou S., Davies W.J. (1991) Influence of soil drying on root development, water relations and leaf growth of *Ceratonia siliqua* L. *Oecologia* 88: 41-47.
- Santos F. D., Forbes K. (2001) Mudança climática em Portugal. Cenários, Impactes e Medidas de Adaptação - SIAM. Sumário executivo e Conclusões. Moita R. (Eds). Gradiva. Lisboa, Portugal.
- Scandalios J.G. (1994) Regulation and properties of plant catalases. In *Photooxidative stresses in Plants: Causes and Amelioration*. Foyer C., Mullineaux P. (Eds). Boca Raton: CRC Press , Inc, pp.275-315.
- Schwanz P., Picon C., Vivin P., Dreyer E., Guehl J-M., Polle A. (1996) Responses of Antioxidative Systems to Drought Stress in Pendunculate Oak and Maritime Pine as Modulated by Elevated CO₂. *Plant Physiology* 110: 393-402.
- 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 species. *Proceedings of Natural Academy of Science of U.S.A.* 52: 119-125.

- Simova-Stoilova L., Demirevska K., Petrova T., Tsenov N., Feller U. (2008) Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. *Plant, Soil and Environment* 54: 529-536.
- Smirnoff N. (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125: 27-58.
- Tatar Ö., Gevrek M.N. (2008) Influence of Water Stress on Proline Accumulation, Lipid Peroxidation and Water Content of Wheat. *Asian Journal of Plant Sciences* 1682-3974.
- Thanos C. A., Georghiuo K., Kadis C., Pantazi C. (1992) Cistaceae: a plant family with hard seeds *Israel Journal of Botany* 41: 251-263.
- Teixeira A.R.N., Ricardo C.P.P. (1983) *Fotossíntese*. Didáctica Editora. Lisboa, Portugal.
- Valliyodan B., Nguyen H. T. (2006) Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 189-195.
- von Caemmerer S., Farquhar G.D. (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376-387.
- Xu Z.Z., Zhou G.S. (2006) Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*. *Planta* 224: 1080-1090.