

Isabel Maria Alves Barrote

**Efeitos *a posteriori* dos défices hídricos sobre a
actividade fotossintética**

Mecanismos de fotoprotecção e sistema enzimático
antioxidante

Universidade do Algarve
Faculdade de Engenharia dos Recursos Naturais
Faro, 2005

Isabel Maria Alves Barrote

**Efeitos *a posteriori* dos défices hídricos sobre a
actividade fotossintética**

Mecanismos de fotoprotecção e sistema enzimático
antioxidante

Dissertação apresentada à Universidade do Algarve
para obtenção do grau de Doutor

Universidade do Algarve
Faculdade de Engenharia dos Recursos Naturais
Faro, 2005

Índice

Agradecimentos	
Abstract	
Resumo	
Símbolos e abreviaturas	
1. Introdução	1
1.1 Referências bibliográficas	9
2. Material e métodos	17
2.1. Condições gerais dos ensaios	19
2.2. Instalação dos ensaios	20
<i>Ensaio Gir99 (Helianthus annuus, Maio a Julho de 1999)</i>	20
<i>Ensaio Lup01 (Lupinus albus, Março a Abril de 2001)</i>	21
<i>Ensaio Gir01 (Helianthus annuus, Setembro a Outubro de 2001)</i>	23
<i>Ensaio Gir02 (Helianthus annuus, Junho e Julho de 2002)</i>	25
2.3. Determinação do potencial hídrico e teor relativo em água foliares e da massa foliar específica	28
2.4. Medições de trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	28
a) Trocas gasosas em condições ambiente	28
b) Capacidade fotossintética	29
c) Fluorescência da clorofila <i>a</i>	30
2.5. Análises bioquímicas	32
a) Quantificação dos pigmentos fotossintéticos	32
b) Quantificação dos açúcares não estruturais	33
c) Quantificação da proteína solúvel total e da Rubisco (Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase)	35
d) Quantificação de produtos de peroxidação de lípidos	36
e) Extração e determinação da actividade das enzimas do sistema antioxidante	37
<i>Obtenção dos extractos foliares para medição da actividade das enzimas peroxidase do ascorbato (Apx), reductase do desidroascorbato (DHAR) e reductase do radical mono desidroascorbato (MDHAR)</i>	38
<i>Obtenção dos extractos foliares para medição da actividade das enzimas reductase da glutathiona (GR), catalase (Cat) e dismutase do superóxido (SOD)</i>	39
<i>Medição da actividade da peroxidase do ascorbato (Apx)</i>	39
<i>Medição da actividade da reductase do desidroascorbato (DHAR)</i>	40
<i>Medição da actividade da reductase do radical mono desidroascorbato (MDHAR)</i>	40
<i>Medição da actividade da reductase da glutathiona (GR)</i>	41
<i>Medição da actividade da catalase (Cat)</i>	41
<i>Medição da actividade da dismutase do superóxido (SOD)</i>	42
2.6. Análise estatística	43
2.7. Referências Bibliográficas	43

3.	Efeitos da idade da folha na recuperação da fotossíntese de <i>Helianthus annuus</i> L. após um ciclo de desidratação e rehidratação	47
3.1.	Introdução	49
3.2.	Material e métodos	52
3.3.	Resultados	53
	<i>Caracterização do estado hídrico das plantas e massa foliar específica</i>	53
	<i>Trocas gasosas</i>	55
	<i>Proteína solúvel, pigmentos e fluorescência da clorofila a</i>	58
	<i>Hidratos de carbono</i>	64
	<i>Peroxidação de lípidos (teor em dialdeído malónico ou MDA)</i>	68
3.4.	Discussão	69
3.5.	Referências bibliográficas	78
4.	Efeitos da diminuição temporária da intensidade luminosa na resposta ao déficit hídrico e na capacidade de recuperação da fotossíntese durante a rehidratação de plantas de <i>Helianthus annuus</i> L.	85
4.1.	Introdução	87
4.2.	Material e métodos	89
4.3.	Resultados	90
	<i>Caracterização do estado hídrico das plantas e massa foliar específica</i>	90
	<i>Trocas gasosas</i>	91
	<i>Fluorescência da clorofila a, pigmentos do ciclo das xantofilas e pigmentos fotossintéticos</i>	93
	<i>Peroxidação de lípidos (teor em dialdeído malónico ou MDA)</i>	97
	<i>Hidratos de carbono</i>	98
4.4.	Discussão	100
4.5.	Referências bibliográficas	106
5.	Efeitos do déficit hídrico e da rehidratação na actividade fotossintética e nos mecanismos de fotoprotecção de <i>Helianthus annuus</i> L. e de <i>Lupinus albus</i> L.	113
5.1.	Introdução	115
5.2.	Material e métodos	117
5.3.	Resultados	119
	<i>Caracterização do estado hídrico das plantas</i>	119
	<i>Trocas gasosas</i>	120
	<i>Teor foliar em Rubisco</i>	122
	<i>Fluorescência da clorofila a</i>	123
	<i>Teor foliar em pigmentos fotossintéticos e pigmentos do ciclo das xantofilas</i>	124
	<i>Enzimas do sistema antioxidante e teor em dialdeído malónico (MDA)</i>	127
5.4.	Discussão	129
5.5.	Referências bibliográficas	135
6.	Considerações finais	141
6.1	Referências bibliográficas	147

Anexos

ANEXO I - Composição das soluções de rega para *Lupinus albus*

ANEXO II - Composição das soluções de rega para *Helianthus annuus*

Agradecimentos:

Terminado este trabalho, é com um especial prazer que tenho o privilégio de poder agradecer a todos os que, das mais diversas formas, contribuíram para a sua concretização. Obrigada especialmente:

À Professora Doutora Manuela David, pela forma próxima e disponível com que sempre orientou este trabalho, proporcionando-me sempre as melhores condições para a sua execução e os incentivos necessários a uma constante motivação.

À Professora Doutora Maria João Correia pela coordenação de alguns dos projectos essenciais à realização dos ensaios e por toda a disponibilidade e amizade que sempre demonstrou.

A todo o grupo de Fisiologia Vegetal, Manuela David, Maria João Correia, Filomena Fonseca, Júlio Osório, Leonor Osório e Ana Cavaco pela ajuda, companheirismo e paciência que sempre tiveram.

Ao laboratório do Departamento de Nutrição Vegetal da Estación Experimental de Aula Dei em Saragoça, particularmente à Doutora A. Abadia, pela disponibilidade manifestada no processamento das amostras para pigmentos, mas sobretudo pela forma amável como me acolheram.

Ao laboratório de Fisiologia Vegetal da Estação Agronómica Nacional, nas pessoas do Doutor F. Lidon e Engenheira M. Pinto, pela disponibilidade com que me receberam e pela forma empenhada como me proporcionaram treino na determinação da actividade das enzimas do sistema antioxidante.

Ao João Silva, que tantas horas de ensaios de campo e de laboratório partilhou comigo.

À Celeste, à Paula, à Dulce e à Mónica, pelas horas de ajuda e companhia preciosas que me deram.

A todos os funcionários da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais pela sua amizade e porque sempre estiveram disponíveis para me apoiar e ajudar em tudo o que precisei.

Aos meus alunos, que em vários momentos foram tão gentis comigo.

A todos os meus amigos. Foram e serão sempre essenciais.

Às minhas filhas, Beatriz e Matilde, porque são as melhores.

Aos avós da Beatriz e da Matilde a quem sempre pude pedir todo o apoio.

Aos meus pais porque a eles devo tudo o que sou.

Ao João, por todo o apoio, ajuda, paciência, compreensão, amizade e amor que sempre me soube dar.

Este trabalho foi realizado ao abrigo do programa de formação avançada PRODEP 5.2 e 5.3 e teve apoio dos projectos PBIC/AGR/22.92/95, 3/3.2/Hort/2169/95 e POCTI/1999/Agr/36145.

Abstract

The response of the photosynthetic mechanisms to drought length and intensity was investigated in potted *Helianthus annuus* L. and *Lupinus albus* L. plants. Different drought intensities were achieved through watering manipulation. Young and mature *H. annuus* leaves were comparatively analysed. The effect of a temporary light reduction was evaluated in young leaves, both during drought and rehydration. The effects of drought and rehydration on photosynthesis were comparatively assessed on leaves of *H. annuus* (drought tolerant) and *L. albus* (drought avoider). Our results indicate that, whereas the photosynthetic rates have diminished as a response to drought, no chronic photoinhibition nor leaf senescence were induced in the sampled *H. annuus* leaves. In these plants, metabolic limitations to the photosynthetic activity were observed during drought, which may have included the activation of the Mehler reaction and the onset of photorespiration. Young leaves revealed the ability to strengthen their antioxidant protection as a response to drought, namely through the increase on leaf carotenoids. However, the differences recorded between young and mature leaves during drought had no reflection on the photosynthetic recovery after rehydration, being similar for both leaf ages. Data showed that the non-photochemical quenching increase is not inevitably linked to an increase in the de-epoxidation index of the xanthophyll cycle and confirmed that both parameters are quite dependent on the photon flux density. The absence of oxidative stress on plants transferred to low light during drought may have led to failure in the internal signalling process, while the apparent stimulation of photoassimilates exportation may have caused growth inhibition. No advantages were therefore observed for the drought and rehydration processes to occur under low light conditions. The maintenance of high leaf sucrose in plants rehydrated under high light did not prevent them from failing to fully recover their photosynthetic activity. Drought induced leaf senescence in *L. albus*, which may have resulted from oxidative stress, due to the impairment of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase activities. The results showed that drought, on its own, is capable of inducing responses usually associated with the co-occurrence of drought and high light, such as oxidative stress and leaf carotenoids increase.

Resumo

A resposta dos mecanismos fotossintéticos à duração e intensidade do défice hídrico e posterior rehidratação foi investigada em plantas envasadas de *Helianthus annuus* L. e *Lupinus albus* L. A rega foi manipulada de modo a induzir diferentes intensidades de défice hídrico e posterior rehidratação. Nas plantas de *H. annuus* foram analisadas comparativamente folhas jovens e folhas maduras, tendo-se também avaliado nas folhas jovens o efeito da diminuição temporária da intensidade luminosa nas plantas em défice hídrico e rehidratação. Foram também avaliados comparativamente os efeitos dos défices hídricos e da rehidratação na actividade fotossintética e no sistema antioxidante em folhas de *H. annuus* e *L. albus*, espécies com estratégias diferentes perante o défice hídrico (*H. annuus* é tolerante ao défice hídrico e *L. albus* evita o défice hídrico). Os resultados obtidos indicam que, apesar de as taxas de fotossíntese terem diminuído em resposta ao défice hídrico, não ocorreu fotoinibição crónica nem foi induzida senescência foliar nas folhas de *H. annuus* amostradas. Nestas plantas, em situação de défice hídrico, ocorreram limitações metabólicas à actividade fotossintética, que nas folhas maduras podem ter incluído a activação da reacção de Mehler e da fotorrespiração. As folhas jovens revelaram possuir a capacidade de reforçar a sua protecção antioxidante em resposta ao défice hídrico, através do aumento do teor foliar em carotenóides. No entanto, as diferenças registadas entre as folhas jovens e as folhas maduras nas plantas em défice hídrico não se repercutiram na sua capacidade de recuperação da actividade fotossintética após rehidratação, que foi semelhante. Os dados obtidos mostraram que o aumento do 'quenching' não fotoquímico nem sempre está directamente relacionado com o aumento do índice de desepoxidação do ciclo das xantofilas e confirmaram a relação de dependência entre ambos os parâmetros e a densidade de fluxo quântico. Nas plantas em défice hídrico transferidas para intensidade luminosa baixa, a ausência de stresse oxidativo pode ter implicado falhas na sinalização interna das plantas, enquanto o estímulo aparente da exportação de fotoassimilados durante a rehidratação pode ter conduzido à inibição do crescimento, pelo que não se observaram vantagens na imposição do défice hídrico e da rehidratação a baixas densidades de fluxo quântico. A manutenção de altos teores foliares de sacarose nas plantas rehidratadas sob irradiância alta não evitou que estas não recuperassem completamente a actividade fotossintética. O défice hídrico induziu senescência foliar em *L. albus*. Esta pode ter resultado do stresse oxidativo induzido nas plantas em défice hídrico, aparentemente devido ao desequilíbrio entre as actividades da dismutase do superóxido e da peroxidase do ascorbato. Os resultados mostram que o défice hídrico pode, por si só, induzir respostas normalmente

associadas à ocorrência conjunta de déficit hídrico e intensidade luminosa alta, tais como o stresse oxidativo e o aumento no teor foliar em pigmentos antioxidantes.

Símbolos e abreviaturas

$(A+Z)/(V+A+Z)$	índice de desepoxidação das xantofilas
$^1\text{Chl}^*$	singleto da clorofila
$^1\text{O}_2^*$	singleto do oxigénio
$^3\text{Chl}^*$	tripleto da clorofila
A	anteraxantina
AAO	oxidase do ascorbato
A_{max}	capacidade fotossintética
ANOVA	análise de variância
Apx	peroxidase do ascorbato
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albumina bovina
C	controlo
Car	carotenóides totais
Cat	catalase
Chl <i>a</i>	clorofila <i>a</i>
Chl <i>a+b</i>	clorofila total
Chl <i>b</i>	clorofila <i>b</i>
C_i	pressão parcial do CO_2 nos espaços intercelulares
DH	défice hídrico
DHAR	redutase do desidroascorbato
DHL	défice hídrico ligeiro
DHm	défice hídrico moderado
DHs	défice hídrico severo
DNA	ácido desoxirribonucleico
ETR	taxa de transporte de electrões dependente do fotossistema II
F'_0	fluorescência basal após adaptação à luz
F'_m	fluorescência máxima após adaptação à luz
F'_v	fluorescência variável após adaptação à luz
F'_v / F'_m	eficiência fotoquímica dos centros de reacção abertos
F_0	fluorescência basal após adaptação ao escuro
F_m	fluorescência máxima após adaptação ao escuro
F_t	fluorescência em “steady-state” em folhas adaptadas à luz
F_v	fluorescência variável após adaptação ao escuro
F_v / F_m	rendimento quântico potencial do fotossistema II
g	condutância estomática para o vapor de água
Gir01	ensaio realizado em 2001 com plantas de <i>Helianthus annuus</i>
Gir02	ensaio realizado em 2002 com plantas de <i>Helianthus annuus</i>
Gir99	ensaio realizado em 1999 com plantas de <i>Helianthus annuus</i>
GR	redutase da glutathiona
INT	violeta de p-iodonitrotetrazolio
J	folha jovem
Lup01	ensaio realizado em 2001 com plantas de <i>Lupinus albus</i>
M	folha madura
MDA	dialdeído malónico
MDHA	monodesidroascorbato
MDHAR	redutase do monodesidroascorbato
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida)
NADP^+	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reduzida)

NP	taxa fotossintética líquida
NPQ	“quenching” não fotoquímico
O_2^-	superóxido
OH^\bullet	radical hidroxilo
PSI	fotossistema um
PSII	fotossistema dois
q0	“quenching” do F_0
Q_A	quinona A
Q_B	quinona B
qE	“quenching” dependente da energia
qI	“quenching” relacionado com a fotoinibição
qP	“quenching” fotoquímico
qT	“quenching” dependente da transição de estado
R24	24 horas depois da rehidratação do substrato
R48	48 horas depois da rehidratação do substrato
R72	72 horas depois da rehidratação do substrato
ROS	espécies reactivas de oxigénio
Rubisco	ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase
RuBP	ribulose bifosfato
SLM	massa foliar específica
SOD	dismutase do superóxido
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARs	substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TRA	teor relativo em água
V	violoxantina
Vde	deseoxidase da violoxantina
Z	zeaxantina
Ψ	potencial hídrico foliar
Ψ_{md}	potencial hídrico foliar a meio do dia
Ψ_{pd}	potencial hídrico foliar de madrugada
Φ_{PSII}	rendimento quântico do fotossistema II em folhas adaptadas à luz

Errata

Como separador decimal, onde está ponto (.) deve ler-se vírgula (,).

Capítulo 1

Introdução geral

1. Introdução geral

O défice hídrico é um dos tipos de stresse abiótico que mais limita a produtividade das culturas no mundo inteiro, sobretudo nas regiões em que a precipitação é baixa e distribuída de um modo irregular ao longo do ano. Em termos climáticos, vastas zonas de Portugal, e o Algarve em particular, enquadram-se no clima do tipo mediterrâneo. Este tipo de clima caracteriza-se por uma temperatura média anual elevada e uma precipitação média anual inferior a 700 mm, com uma distribuição intra-anual e inter-anual muito irregular, centrada essencialmente nos meses de Inverno (Daveau 1988). É também caracterizado por irradiâncias e evapotranspiração muito elevadas, principalmente entre Abril e Setembro, sendo comuns as situações de secura. Alterações rápidas nas condições ambientais, como a subida repentina na temperatura do ar e o decréscimo da humidade relativa, frequentemente associadas a ventos quentes e secos, fazem com que a rapidez e adequação das respostas fisiológicas e bioquímicas sejam essenciais para a sobrevivência das plantas, tanto quando se instala uma situação de secura, como quando as plantas são rehidratadas, quer por rega quer pela chuva. Ao nível da planta, o défice hídrico tem efeitos importantes na fenologia e nos processos de desenvolvimento, crescimento, assimilação do carbono, partição dos assimilados e reprodução, que se repercutem na produtividade global das culturas sob défice hídrico.

O tipo de respostas ao défice hídrico depende das espécies e também da duração e intensidade do stresse e pode incluir, entre outras, a diminuição da abertura estomática, a alteração das taxas de 'turnover' de algumas proteínas, a produção de proteínas específicas como as 'heat shock proteins' e desidrinas, o ajustamento osmótico e ainda alterações nos níveis endógenos dos reguladores de crescimento (Passioura 1996). A expansão celular é um dos primeiros processos a ser afectado (Hsiao 1973), com influência negativa no desenvolvimento do sistema radicular e da canópia (Tardieu 1996). Sabe-se também que a fotossíntese é um dos processos fisiológicos mais atingidos pelo défice hídrico (Chaves 1991, Cornic 1994).

A influência do défice hídrico na actividade fotossintética tem sido bastante estudada, mas a controvérsia sobre a importância relativa das limitações estomáticas e metabólicas persiste. Alguns autores suportam que, em plantas sujeitas a défice hídrico moderado, o decréscimo das taxas fotossintéticas se deve principalmente à limitação da difusão do CO₂ imposta pelo fecho dos estomas (Dreesmann *et al.* 1994, Cornic e Massacci 1996, Cornic 2000, Cornic e Fresnau 2002). Porém, os resultados obtidos em trabalhos nos quais se procurou eliminar ou minimizar o efeito dos estomas, quer utilizando algas (Davison e Pearson 1996, Kawamitsu *et al.* 2000), quer utilizando cloroplastos isolados (Boyer e Bowen 1970), indicaram

a existência de outras limitações à fotossíntese para além das estomáticas. Outros trabalhos revelaram que, em plantas em défice hídrico, para além da diminuição da condutância do mesófilo para o CO₂ (Chaves *et al.* 2003) e do aumento da susceptibilidade à ocorrência de fotoinibição (Lu e Zhang 1998), ocorre também a inibição em 'feedback' da fotossíntese, devida à acumulação de açúcares solúveis (Azcón-Bieto 1983), a redução da actividade da Rubisco (Pankovic *et al.* 1999), a inibição da síntese da RuBP (Gunasekera e Berkowitz 1993, Tezara *et al.* 1999, Pankovic *et al.* 1999, Lawlor 2002) atribuída ao decréscimo da síntese de ATP (Tezara *et al.* 1999, Lawlor 2002) e ainda a diminuição do transporte acíclico de electrões e estímulo do transporte cíclico (Golding e Johnson 2003), para além do estímulo da fotorrespiração (Wingler *et al.* 1999), da reacção de Mehler (Biehler e Fock 1996, Polle 2001) e do stresse oxidativo (Irigoyen *et al.* 1992, Moran *et al.* 1994, Zhang e Kirkham 1996, Krieger-Liskay 2005).

Os resultados atrás referidos provém de trabalhos em que foram utilizadas plantas ou tecidos vegetais provenientes de diversas espécies e estados fisiológicos e nem sempre é claro o nível de stresse a que foram sujeitas. Flexas e Medrano (2002) analisaram conjuntamente os resultados obtidos por diversos autores e, tendo estabelecido a condutância estomática como factor de avaliação do nível de stresse hídrico, propuseram que os efeitos do défice hídrico sobre a actividade fotossintética dependem da intensidade do stresse. Os mesmos autores indicaram o fecho dos estomas como uma das primeiras respostas e principal limitação à fotossíntese em plantas sob stresse ligeiro a moderado, enquanto em plantas sob stresse severo ocorrerá a regulação negativa e/ou inibição de processos metabólicos. O facto de a diminuição da abertura estomática consistir numa das primeiras respostas ao défice hídrico e também o de poder ser controlada por sinais químicos enviados pelas raízes cujas células tenham perdido turgidez (Davies e Zhang 1991), sugere que possa haver limitações à aquisição de CO₂ logo que haja défices hídricos no solo, ainda que os potenciais hídricos foliares permaneçam altos. Estas limitações à aquisição de CO₂ verificadas em plantas em défice hídrico, ao implicar o decréscimo das taxas fotossintéticas, podem conduzir a que a taxa de absorção de fotões exceda a taxa de utilização de energia de excitação no transporte fotossintético de electrões. Neste caso, os aceitadores de electrões permanecerão reduzidos (Demmig-Adams 1990, Krieger-Liskay 2005) e não estarão disponíveis para aceitar os electrões provenientes da clorofila excitada pela luz, a qual em vez de regressar ao seu estado não excitado, permanecerá excitada com a consequente formação de tripletos da clorofila ($^3\text{Chl}^*$) nas antenas do fotossistema II (Demmig-Adams 1990, Foyer e Harbinson 1999, Krieger-Liskay 2005). O $^3\text{Chl}^*$ reage com o oxigénio molecular formando-se o singlete de

oxigénio ($^1\text{O}_2^*$), espécie excitada de oxigénio que destrói proteínas, pigmentos e lípidos e parece ainda ser a espécie reactiva de oxigénio responsável pela degradação da proteína D1 nos complexos pigmento-proteína do PSII (Trebst *et al.* 2002, Krieger-Liskay 2005). Os carotenóides das antenas constituem uma primeira linha de defesa contra estas espécies reactivas geradas junto ao PSII (e potenciadoras do stresse oxidativo) (Krieger-Liskay 2005) quer através da activação do ciclo das xantofilas, regulada pela acidificação do lúmen dos tilacóides (Demmig-Adams e Adams 1996), através do qual é sequestrado o $^1\text{Chl}^*$, minimizando a formação de $^3\text{Chl}^*$ e de $^1\text{O}_2^*$ (Demmig-Adams e Adams 1996, Niyogi *et al.* 1998), quer por acção directa de carotenóides, constitutiva e não regulada (Foyer e Harbinson 1999), como o β -caroteno (Foyer e Harbinson 1999, Choudhury e Behera 2001, Krieger-Liskay 2005), a neoxantina (Jung 2004) e a luteína (Pogson *et al.* 1998, Niyogi 2000), os quais, devido à sua proximidade com as clorofilas nas antenas sequestram o $^3\text{Chl}^*$ e o $^1\text{O}_2^*$. O α -tocoferol, localizado nas membranas dos tilacóides, constitui também um elemento importante na manutenção da integridade do PSII, sendo muito eficaz na inactivação do $^1\text{O}_2^*$ (Munné-Bosch e Alegre 2002, Trebst *et al.* 2002).

O decréscimo da taxa fotossintética resultante do fecho dos estomas conduz também à redução do consumo de NADPH e de ATP e à inibição em ‘feedback’ da sua síntese, favorecendo a activação de processos como o transporte cíclico de electrões (Golding e Johnson 2003), a reacção de Mehler (Biehler e Fock 1996, Polle 2001) e a fotorrespiração (Wingler *et al.* 1999). A activação destas vias metabólicas tem sido referida como um sumidouro importante dos electrões resultantes da energia de excitação em excesso no cloroplasto, em plantas submetidas a défice hídrico (Osmond e Grace 1995, Biehler e Fock 1996, Wingler *et al.* 1999, 2000, Golding e Johnson 2003). No entanto, tanto a reacção de Mehler como o transporte cíclico de electrões conduzem ao favorecimento da síntese de ATP em detrimento da síntese de NADPH. Este desequilíbrio pode também ter como consequência a diminuição da taxa a que ocorre o ciclo de Calvin por escassez de poder redutor na forma de NADPH. Por outro lado, o transporte cíclico de electrões e a reacção de Mehler contribuem também para a acidificação do lúmen dos tilacóides (Foyer e Harbinson 1999, Makino *et al.* 2002), podendo deste modo promover a activação da desepoxidase da violaxantina, da qual depende o ciclo de desepoxidação das xantofilas (Morosinotto *et al.* 2003), e também a activação da proteína Psbs, constituinte do complexo captador de energia do fotossistema II e responsável por parte do ‘quenching’ não fotoquímico da energia de excitação em excesso (Li *et al.* 2000, 2002). Contudo, a fotorrespiração tem como produto final o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e a reacção de Mehler tem como produto final o radical

superóxido ($O_2^{\cdot-}$), ambas espécies reactivas de oxigénio potencialmente destruidoras de lípidos, proteínas e ácidos nucleicos (Wingler *et al.* 1999, Polle 1996, Tambussi *et al.* 2000).

Vários autores reportaram já a ocorrência de stresse oxidativo em plantas em défice hídrico (Irigoyen *et al.* 1992, Moran *et al.* 1994, Zhang e Kirkham 1996, Boo e Jung 1999, Krieger-Liskay 2005, Mascher *et al.* 2005) e são também várias as evidências que indicam que as espécies reactivas de oxigénio desempenham um papel importante na percepção das alterações ambientais pelas plantas, e na sinalização interna que pode desencadear uma série de reacções das quais dependem as respostas ao stresse (Foyer e Noctor 2005).

Para além da acção já mencionada dos carotenóides relativamente ao $^1Chl^*$, $^3Chl^*$ e $^1O_2^*$, a presença das espécies reactivas de oxigénio como o $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 é controlada por um sistema de enzimas antioxidantes das quais fazem parte a dismutase do superóxido (SOD), a peroxidase do ascorbato (Apx), a redutase do monodesidroascorbato (MDHAR), a redutase do desidroascorbato (DHAR), a redutase da glutatona (GR) e a catalase (Cat) (Foyer *et al.* 1994, Asada *et al.* 1998). O $O_2^{\cdot-}$ resulta da redução do oxigénio molecular no decorrer da reacção de Mehler (Foyer e Harbinson 1999) e a enzima SOD, cujas formas cloroplásticas são as mais abundantes em folhas verdes (Bowler *et al.* 1992), catalisa a reacção de dismutação do superóxido a H_2O_2 e oxigénio molecular (Asada 1999). Na presença de iões metálicos, como os iões de ferro, o H_2O_2 e o $O_2^{\cdot-}$ reagem numa reacção conhecida por reacção de Haber-Weiss cujo produto final é o radical hidroxilo (OH^{\bullet}), muito reactivo e destruidor (Bowler *et al.* 1992, Benov 2001, Van Breusegem *et al.* 2001). A peroxidase do ascorbato e a catalase são enzimas que reduzem o H_2O_2 a água e oxigénio molecular (Larson 1988, Bowler *et al.* 1992). Enquanto a catalase se encontra essencialmente nos peroxissomas e glioxissomas das células vegetais (Havir e McHale 1987, Bowler *et al.* 1992), onde procede à eliminação do H_2O_2 resultante da fotorrespiração (Bowler *et al.* 1992), a peroxidase do ascorbato encontra-se predominantemente no cloroplasto (Bowler *et al.* 1992, Sen Gupta *et al.* 1993) e pode reduzir o peróxido de hidrogénio que aí se formar (Polle 2001). Embora a Apx possa aceitar o guaiacol como dador de electrões, o ascorbato é um dador muito mais eficaz o que implica que a regeneração do ascorbato seja necessária para que a eliminação do H_2O_2 no cloroplasto persista (Asada 1992). A regeneração do ascorbato pode ocorrer a partir da reacção de redução do monodesidroascorbato pela ferredoxina (Miyake e Asada 1994), pelo NADH ou pelo NADPH, catalisada pela redutase do monodesidroascorbato (Hossain e Asada 1985), ou então resultar de uma reacção de oxidação-redução, espontânea, do monodesidroascorbato a ascorbato e desidroascorbato (Polle 2001). O desidroascorbato pode ser reduzido a ascorbato

através do ciclo ascorbato-glutationa, processo onde intervêm as enzimas redutase do desidroascorbato e redutase da glutatona e durante o qual é consumido NADPH (Polle *et al.* 1990, Asada 1992, Bowler *et al.* 1992, Asada 1999, Foyer e Harbinson 1999, Polle 2001).

O stresse oxidativo, resultante da predominância dos agentes oxidantes relativamente aos antioxidantes (Azzi *et al.* 2004), tem como consequência o acréscimo do nível de peroxidação dos lípidos das membranas, que resulta no aumento da abundância em dialdeído malónico ou MDA (Weber *et al.* 2004). A presença de dialdeído malónico (MDA) nos tecidos tem sido relacionada com a indução da expressão de genes que codificam para a dismutase do superóxido, para a peroxidase do ascorbato e também para as desidrinas (Weber *et al.* 2004). Deste modo, o aumento do teor foliar de MDA, para além de ser indicador da ocorrência de stresse oxidativo, pode contribuir para a indução da protecção dos tecidos contra a desidratação ou os seus efeitos. Por outro lado, o H₂O₂, para além de estar associado à indução da expressão de genes relacionados com a aclimação e tolerância a diversos tipos de stresse abiótico (Foyer *et al.* 1997), está também na origem da formação dos radicais hidroxilo, os quais promovem a inibição reversível das aquaporinas, reduzindo o transporte de água para fora das células, evitando assim a desidratação excessiva (Henzler *et al.* 2004). Enquanto as plantas crescem e se desenvolvem em condições óptimas, os níveis constitutivos de antioxidantes são suficientes para controlar a produção contínua de espécies reactivas de oxigénio (Munné Bosch e Alegre 2004), mas os processos que são estimulados ou inibidos durante a imposição do défice hídrico parecem possuir a capacidade de provocar danos e simultaneamente ser também necessários, pelo menos em certa medida, para o desencadear dos mecanismos de protecção essenciais à sobrevivência dos tecidos. Porém, o stresse oxidativo associado ao decréscimo das defesas antioxidantes tem sido também associado à indução da senescência foliar (Ye *et al.* 2000, Prochazkova *et al.* 2001, Munné-Bosch *et al.* 2001), tendo Ye *et al.* (2000) reportado que o declínio no teor foliar em clorofila durante a senescência foliar de *Arabidopsis thaliana* foi precedido pelo aumento da peroxidação dos lípidos. Diversos estudos demonstraram que a secura acelera o padrão acrópeto da senescência foliar em várias espécies (Aparício-Tejo e Boyer 1983, O'Neill 1983, Olsson 1995), mas este processo, apesar de conduzir à morte dos tecidos, pode reverter em favor da planta como um todo, já que é através dele que a planta reduz a área transpirante e recicla para as zonas mais jovens e em crescimento ou para os órgãos de reserva os nutrientes que resultam do desmantelamento organizado dos conteúdos dos tecidos senescentes (Munné-Bosch e Alegre 2004). Acresce que os trabalhos realizados em diversas espécies vegetais sobre os efeitos do défice hídrico na actividade do sistema enzimático antioxidante não são muito conclusivos no

seu conjunto, já que enquanto nuns a actividade das enzimas do sistema antioxidante foi induzida (Ratnayaka *et al.* 2003, Srivalli *et al.* 2003), noutros decresceu (Moran *et al.* 1994, Schwanz e Polle 2001) e noutros não foi afectada (Yoshimura *et al.* 2000). Estas disparidades de resultados são provavelmente consequência de os estudos terem sido realizados em génotipos com estratégias diversas de enfrentar o défice hídrico (Sairam *et al.* 1997/98, Davenport *et al.* 2003, Sairam *et al.* 2005), sob condições ambientais e níveis de défice hídrico variáveis (Irigoyen *et al.* 1992, Sgherry e Nari-Izzo 1995) e em diferentes estádios de desenvolvimento da planta (Ye *et al.* 2000) e/ou idades foliares (Sairam *et al.* 2003/04).

As situações de secura só podem ser ultrapassadas com sucesso pelas plantas se os componentes celulares essenciais e as suas relações funcionais forem preservados, não só durante o período de desidratação, mas também durante a rehidratação. Neste sentido, a tolerância aos défices hídricos deverá requerer o controlo preciso do metabolismo, de forma a permitir a manutenção das funções essenciais durante o período de stresse, e também a reconstrução e reabilitação da maquinaria celular afectada durante o período de défice hídrico, de modo a que seja possível o restabelecimento fisiológico dos tecidos e da planta durante a rehidratação. No entanto, de entre os diversos trabalhos dedicados ao estudo dos efeitos do défice hídrico, poucos se debruçaram sobre os efeitos da rehidratação. Entre estes encontram-se os estudos de Navari-Izzo *et al.* (1995) e de Olsson *et al.* (1996), que propuseram que a velocidade com que o défice hídrico é imposto influencia a capacidade de recuperação das plantas durante o alívio do stresse, e o de Kaiser (1987) que concluiu, após a rehidratação de discos foliares, que a rehidratação rápida pode ser pelo menos tão prejudicial para as células do mesófilo como a própria desidratação. Num estudo em que foram comparadas duas idades foliares, David *et al.* (1998) verificaram que enquanto a actividade fotossintética das folhas mais jovens recuperou rapidamente dos efeitos dos défices hídricos, o mesmo não se verificou nas folhas mais velhas, em que a rehidratação teve aparentemente um efeito mais negativo sobre o desempenho do aparelho fotossintético do que a desidratação em si, tal como já tinha sido sugerido por Dreesmann *et al.* (1994). Adicionalmente, em estudos realizados em várias espécies vegetais foi demonstrado que as folhas maduras, completamente expandidas, são mais afectadas pelo défice hídrico do que as folhas jovens em expansão (Calatayud *et al.* 2000, Jung 2004), para além de as folhas jovens parecerem dispor de uma protecção mais eficaz contra o stresse oxidativo (Bowler *et al.* 1992, Havaux *et al.* 2000).

Munns e Weir (1981), Premachandra e Joly (1992), Wang *et al.* (1994) e David *et al.* (1998) detectaram, em várias espécies, uma maior acumulação de açúcares solúveis induzida pela secura em folhas jovens do que em folhas velhas, tendo as hexoses sido os principais

contribuintes para os açúcares acumulados. O decréscimo da utilização de ATP e de NADPH no estroma e a diminuição da taxa de regeneração da RuBP poderão estar relacionadas com a acumulação de açúcares solúveis, já que esta implica a redução da disponibilidade de fósforo inorgânico no estroma (Azcón-Bieto 1983), havendo também indícios de que a sacarose e sobretudo a glucose, reprimem a expressão de alguns genes relacionados com a actividade fotossintética (Sheen 1990). Por outro lado, há indicações de que a acumulação de açúcares solúveis confere maior tolerância à desidratação (Pelah *et al.*, 1997; David *et al.*, 1998), contribuindo para a manutenção da turgescência celular (Hsiao 1973, Ingram e Bartels 1996), e ainda que a acumulação da sacarose parece contribuir para a manutenção da integridade das membranas celulares, da estrutura das proteínas e da actividade enzimática em tecidos desidratados (Ingram e Bartels 1996, Hoekstra *et al.* 2001).

A rehidratação dos tecidos pode reverter a redução da condutância estomática, mas o restabelecimento do metabolismo fotossintético implica também o retomar das condições de difusão do CO₂, a recuperação da capacidade de regeneração da RuBP, a reactivação da Rubisco ou ainda da síntese de ATP e de NADPH e do equilíbrio entre o poder oxidante e antioxidante.

Até à data, os trabalhos realizados em plantas, tecidos ou algas sob défice hídrico, com rehidratação ou não, têm conduzido a resultados que nem sempre são concordantes. Muitas das discrepâncias são provavelmente devidas aos diferentes níveis de défice hídrico e condições ambientais em que foram impostos, para além das diferenças entre os génotipos utilizados, idades fisiológicas das plantas e dos tecidos.

Os objectivos deste trabalho foram i) avaliar a resposta dos mecanismos fotossintéticos à duração e intensidade do défice hídrico e rehidratação em folhas jovens e maduras de *Helianthus annuus*, ii) investigar o efeito da diminuição temporária da densidade de fluxo quântico na resposta ao défice hídrico e na capacidade de recuperação da actividade fotossintética das plantas desta espécie e iii) analisar comparativamente os efeitos do défice hídrico e da rehidratação na actividade fotossintética e no sistema antioxidante de duas espécies com estratégias distintas perante o défice hídrico, o *H. annuus* tolerante ao défice hídrico (Zhang e Kirkham 1996) e o *Lupinus albus* que evita o défice hídrico (Huyghe 1997).

1.1. Referências bibliográficas

Aparicio-Tejo P. M., Boyer J. S. (1983). Significance of accelerated leaf senescence at low water potentials for water loss and grain yield in maize. *Crop Science*, **23**: 1198-1202.

- Asada K. (1992). Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, **85**: 235-241.
- Asada K., Endo T., Mano J., Miyake C. (1998). Molecular mechanism for relaxation of and protection from light stress *In* Satoh K., Murata N. (eds.) *Stress responses of photosynthetic organisms. Molecular mechanisms and molecular regulations*. Elsevier Science Ltd. Amsterdão, p. 37-52.
- Asada K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**: 601-639.
- Azcón-Bieto J. (1983). Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. *Plant Physiology*, **73**: 681-686.
- Azzi A., Davies K. J. A., Kelly F. (2004). Free radical biology - terminology and critical thinking. *FEBS Letters*, **558**: 3-6.
- Benov L. (2001). How superoxide radical damages the cell. *Protoplasma*, **217**: 33-36.
- Biehler K., Fock H. (1996). Evidence for the contribution of the Mehler-peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought stressed wheat. *Plant Physiology*, **112**: 265-272.
- Boo Y. C., Jung J. (1999). Water deficit-induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice. *Journal of Plant Physiology*, **155**: 255-261.
- Bowler C., Van Montagu M., Inzé D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **43**: 83-116.
- Boyer J. S., Bowen B. L. (1970). Inhibition of oxygen evolution in chloroplasts isolated from leaves with low water potentials. *Plant Physiology*, **45**: 612-615.
- Calatayud P.-A., Llovera E., Bois J. F., Lamaze T. (2000). Photosynthesis in drought-adapted cassava. *Photosynthetica*, **38**: 97-104.
- Chaves M. M. (1991). Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*, **42**: 1-16.
- Chaves M. M., Maroco J. P., Pereira J. S. (2003). Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, **30**: 239-264.
- Choudhury N. K., Behera R. K. (2001). Photoinhibition of photosynthesis: Role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents. *Photosynthetica*, **39**: 481-488.
- Cornic G. (1994). Drought stress and high light effects on leaf photosynthesis. *In* Baker N. R., Bowyer J. R. (eds.) *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, p. 297-313.
- Cornic G., Fresneau C. (2002). Photosynthetic carbon reduction and carbon oxidation cycles are the main electron sinks for photosystem II activity during a mild drought. *Annals of Botany*, **89**: 887-894.

- Cornic G. (2000). Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture - not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science*, **5**: 187-188.
- Cornic G., Massacci A. (1996). Leaf photosynthesis under drought stress. In Baker N. R. (ed.) *Photosynthesis and the environment*. Kluwer Academic Publishers, Londres, p. 49-110.
- Daveau S. (1988). Comentários e actualização In Ribeiro O., Lautensach H. *Geografia de Portugal. II. O ritmo climático e a paisagem*. Sá da Costa. Lisboa
- Davenport S. B., Gallego S. M., Benavides M. P., Tomaro M. L. (2003). Behaviour of antioxidant defense system in the adaptive response to salt stress in *Helianthus annuus* L. cells. *Plant Growth Regulation*, **40**: 81-88.
- David M. M., Coelho D., Barrote I., Correia M. J. (1998). Leaf age effects on photosynthetic activity and sugar accumulation in droughted and rewatered *Lupinus albus* plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, **25**: 299-306.
- Davies W. J., Zhang J. (1991). Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **42**: 55-76.
- Davison I. R., Pearson G. A. (1996). Stress tolerance in intertidal seaweeds. *Journal of Phycology*, **32**: 197-211.
- Demmig-Adams B. (1990). Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1020**: 1-24.
- Demmig-Adams B., Adams III W. W. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, **1**: 21-26.
- Dreesmann D. C., Harn C., Daie J. (1994). Expression of genes encoding Rubisco in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants subjected to gradual desiccation. *Plant Cell Physiology*, **35**: 645-653.
- Flexas J., Medrano H. (2002). Drought-inhibition of photosynthesis in C₃ plants: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany*, **89**: 183-189.
- Foyer C., Descourvières P., Kunert K. J. (1994). Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell and Environment*, **17**: 507-523.
- Foyer C. H., Lopez-Delgado H., Dat J. F., Scott I. M. (1997). Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*, **100**: 241-254.
- Foyer C. H., Harbinson J. (1999). Relationships between antioxidant metabolism and carotenoids in the regulation of photosynthesis. In Frank H. A., Young A. J., Britton G., Cogdell R. J. (eds.) *The Photochemistry of carotenoids*. Kluwer Academic Publishers, Londres, p. 305-325.

- Foyer C., Noctor G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*, **28**: 1056–1071.
- Golding A. J., Johnson G. N. (2003). Down-regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. *Planta*, **218**: 107-114.
- Gunasekera D., Berkowitz G. A. (1993). Use of transgenic plants with Ribulose-1,5-Biphosphate Carboxylase/Oxygenase antisense DNA to evaluate the rate limitation of photosynthesis under water stress. *Plant Physiology*, **103**: 629-635.
- Havaux M., Bonfils J. P., Lutz C., Niyogi K. K. (2000). Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the npq1 Arabidopsis mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Plant Physiology*, **124**: 273-284.
- Havir E. A., McHale N. A. (1987). Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, **84**: 450-455.
- Henzler T., Ye Q., Steudle E. (2004). Oxidative gating of water channels (aquaporins) in *Chara* by hydroxyl radicals. *Plant, Cell and Environment*, **27**: 1184-1195.
- Hoekstra F. A., Golovina E. A., Buitink J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, **6**: 431-438.
- Hossain M. A., Asada K. (1985). Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **260**: 12920-12926.
- Hsiao T. C. (1973). Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*, **24**: 519-570.
- Huyghe C. (1997). White lupin (*Lupinus albus* L.). *Field Crops Research*, **53**: 147-160.
- Ingram J., Bartels D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**: 377-403.
- Irigoyen J. J., Emerich D. W., Sánchez-Díaz M. (1992). Alfafa leaf senescence induced by drought stress: photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evolution. *Physiologia Plantarum*, **84**: 67-72.
- Jung S. (2004). Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. *Plant Science*, **166**: 459-466.
- Kaiser W. M. (1987). Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum*, **71**: 142-149.
- Kawamitsu Y., Driscoll S., Boyer J. S. (2000). Stress tolerance in intertidal seaweeds. *Plant and Cell Physiology*, **41**: 344-353.
- Krieger-Liszakay A. (2005). Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, **56**: 337-346.

- Larson R. A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, **27**: 969-978.
- Lawlor D. W. (2002). Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: Stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany*, **89**: 871-885.
- Li X. P., Bjorkman O., Shih C., Grossman A. R., Rosenquist M., Jansson S., Niyogi K. K. (2000). A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature*, **403**: 391-395.
- Li X.-P., Muller-Moule P., Gilmore A. M., Niyogi K. K. (2002). PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**: 15222-15227.
- Lu C. M., Zhang J. H. (1998). Effects of water stress on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition in wheat plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, **25**: 883-892.
- Makino A., Miyake C., Yokota A. (2002). Physiological functions of the water-water cycle (Mehler reaction) and the cyclic electron flow around PSI in rice leaves. *Plant and Cell Physiology*, **43**: 1017-1026.
- Mascher R., Nagy E., Lippmann B., Hornlein S., Fischer S., Scheiding W., Neagoe A., Bergmann H. (2005). Improvement of tolerance to paraquat and drought in barley (*Hordeum vulgare* L.) by exogenous 2-aminoethanol: effects on superoxide dismutase activity and chloroplast ultrastructure. *Plant Science*, **168**: 691-698.
- Miyake C., Asada K. (1994). Ferredoxin-dependent photoreduction of the monodehydroascorbate radical in spinach thylakoids. *Plant and Cell Physiology*, **35**: 539-549.
- Moran J. F., Becana M., Iturbe-Ormaetxe I., Frechilla S., Klucas R. V., Aparicio-Tejo P. (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*, **194**: 346-352.
- Morosinotto T., Caffarri S., Dall'Osto L., Bassi R. (2003). Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids. *Physiologia Plantarum*, **119**: 347-354.
- Munné-Bosch S., Jubany-Marí T., Alegre L. (2001). Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts. *Plant, Cell and Environment*, **24**: 1319-1327.
- Munné-Bosch S., Alegre L. (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **21**: 31-57.
- Munné-Bosch S., Alegre L. (2004). Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology*, **31**: 203-216.
- Munns R., Weir R. (1981). Contribution of sugars to osmotic adjustment in elongating and expanded zones of wheat leaves during moderate water deficits at two light levels. *Australian Journal of Plant Physiology*, **8**: 93-105

- Navari-Izzo F., Ricci F., Vazzana C., Quartacci M. F. (1995). Unusual composition of thylakoid membranes of the resurrection plant *Boea hygroskopica*: Changes in lipids upon dehydration and rehydration. *Physiologia Plantarum*, **94**: 135-142.
- Niyogi K. K., Grossman A. R., Bjorkman O. (1998). Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *The Plant Cell*, **10**: 1121-1134.
- Niyogi K. K. (2000). Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**: 455-460.
- Olsson M. (1995). Alterations in lipid composition, lipid peroxidation and anti-oxidative protection during senescence in drought stressed plants and non-drought stressed plants of *Pisum sativum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **33**: 547-553.
- Olsson M., Nilsson K., Liljenberg C., Hendry G. A. F. (1996). Drought stress in seedlings: Lipid metabolism and lipid peroxidation during recovery from drought in *Lotus corniculatus* and *Cerastium fontanum*. *Physiologia Plantarum*, **96**: 577-584.
- O'Neill S. D. (1983) Role of osmotic potential gradients during water stress and leaf senescence in *Fragaria virginiana*. *Plant Physiology*, **72**: 931-937.
- Osmond C. B., Grace S. C. (1995). Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*, **46**: 1351-1362.
- Pankovic D., Sakac Z., Kevresan S., Plesnicar M. (1999). Acclimation to long-term water deficit in the leaves of two sunflower hybrids: photosynthesis, electron transport and carbon metabolism. *Journal of Experimental Botany*, **50**: 127-138.
- Passioura J. B. (1996). Drought and drought tolerance. *Plant Growth Regulation*, **20**: 79-83.
- Pelah D., Wang W., Altman A., Shoseyov O., Bartels D. (1997). Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response. *Physiologia Plantarum*, **99**: 153-159.
- Pogson B. J., Niyogi K. K., Bjorkman O., DellaPenna D. (1998). Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in *Arabidopsis* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**: 13324-13329.
- Polle A., Chakrabarti K., Schurmann W., Rennenberg H. (1990). Composition and properties of hydrogen peroxide decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of norway spruce (*Picea abies* L., Karst). *Plant Physiology*, **94**: 312-319.
- Polle A. (1996). Mehler reaction: friend or foe in photosynthesis? *Botanica Acta*, **109**: 84-89.
- Polle A. (2001). Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology*, **126**: 445-462.

- Premachandra G. S., Joly R. J. (1992). Solutes contributing to osmotic potential in young *versus* mature leaves of cacao seedlings. *Journal of Plant Physiology*, **139**: 355-360.
- Prochazkova D., Sairam R. K., Srivastava G. C., Singh D. V. (2001). Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*, **161**: 765-771.
- Ratnayaka H. H., Molin W. T., Sterling T. M. (2003). Physiological and antioxidant responses of cotton and spurred anoda under interference and mild drought. *Journal of Experimental Botany*, **54**: 2293-2305.
- Sairam R. K., Shukla D. S., Saxena D. C. (1997/98). Stress induced injury and antioxidant enzymes in relation to drought tolerance in wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, **40**: 357-364.
- Sairam R. K., Singh D. V., Srivastava G. C. (2003/04). Changes in activities of antioxidant enzymes in sunflower leaves of different ages. *Biologia Plantarum*, **47**: 61-66.
- Sairam R. K., Srivastava G. C., Agarwal S., Meena R. C. (2005). Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, **49**: 85 - 91.
- Schwanz P., Polle A. (2001). Differential stress responses of antioxidative systems to drought in pendunculate oak (*Quercus robur*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high CO₂ concentrations. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 133-143.
- Sen Gupta A., Webb R. P., Scott Holaday A., Allen R. D. (1993). Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants. *Plant Physiology*, **103**: 1067-1073.
- Sgherri C. L. M., Navari-Izzo F. (1995). Sunflower seedlings subjected to increasing water deficit stress: oxidative stress and defence mechanisms. *Physiologia Plantarum*, **93**: 25-30.
- Sheen J. (1990). Metabolic repression of transcription in higher plants. *The Plant Cell*, **2**: 1027-1038.
- Srivalli B., Sharma G., Khanna-Chopra R. (2003). Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. *Physiologia Plantarum*, **119**: 503-512.
- Tambussi E. A., Bartoli C. G., Beltrano J., Guiamet J. J., Araus J. L. (2000). Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiologia Plantarum*, **108**: 398-404.
- Tardieu F. (1996). Drought perception by plants. Do cells of droughted plants experience water stress? *Plant Growth Regulation*, **20**: 93-104.
- Tezara W., Mitchell V. J., Driscoll S. D., Lawlor D. W. (1999). Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, **401**: 914-917.
- Trebst A., Depka, Holländer-Czytkob H. (2002). A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters*, **516**: 156-160.

- Van Breusegem F., Vranová E., Dat J. F., Inzé D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, **161**: 405-414.
- Wang Z., Quebedeaux B., Stutte G. W. (1994). Osmotic adjustment: effect of water stress on carbohydrates in leaves stems and roots of apple. *Australian Journal of Plant Physiology*, **22**: 747-754.
- Weber H., Chételat A., Reymond P., Farmer E. E. (2004). Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *The Plant Journal*, **37**: 877–888.
- Wingler A., Lea P. J., Quick W. P., Leegood R. C. (2000). Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, **355**: 1517-1529.
- Wingler A., Quick W. P., Bungard R. A., Bailey K. J., Lea P. J., Leegood R. C. (1999). The role of photorespiration during drought stress: an analysis utilizing barley mutants with reduced activities of photorespiratory. *Plant Cell and Environment*, **22**: 361-373.
- Ye Z. Z., Rodriguez R., Tran A., Hoang H., de los Santos D., Brown S., Vellanoweth R. L. (2000). The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, **158**: 115-127.
- Yoshimura K., Yabuta Y., Ishikawa T., Shigeoka S. (2000). Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology*, **123**: 223-234.
- Zhang J., Kirkham M. B. (1996). Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist*, **132**: 361-373.

Capítulo 2

Material e métodos

2.1. Condições gerais dos ensaios

Foram realizados quatro ensaios entre Maio de 1999 e Julho de 2002, três com girassol (*Helianthus annuus* L. cultivar 'Giant') e um com tremoceiro (*Lupinus albus* L.). Os ensaios com girassol realizaram-se entre Maio e Julho de 1999 (Gir99), Setembro e Novembro de 2001 (Gir01) e Junho e Julho de 2002 (Gir02). O ensaio realizado com tremoceiro decorreu entre Março e Maio de 2001 (Lup01).

As sementeiras foram efectuadas directamente em vasos de três litros. O substrato utilizado em todos os ensaios foi uma mistura de turfa não fertilizada (Shamrock) com vermiculite na proporção de 1:1 (v:v) à qual foi adicionado um fungicida (substância activa: captana 83%) na proporção de 20 g por cada 50 L de substrato.

Exceptuando o ensaio de girassol realizado em 1999, a rega foi efectuada com solução nutritiva completa de Hoagland modificada (Hoagland e Snyder, 1933) testada anteriormente para cada uma das espécies. Nos ensaios realizados em 2001 e em 2002 as plantas foram submetidas a dois níveis de défice hídrico: um menos intenso e mais curto e outro, mais intenso e prolongado. O estado hídrico foi imposto no substrato, manipulando em cada rega a reposição da solução nutritiva, em função da quantidade de água perdida por evapotranspiração, determinada por pesagem dos vasos. Nas plantas controlo a solução foi sempre repostada na totalidade do peso perdido. Para cada um dos ensaios foram efectuadas rehidratações através de diversas regas, de modo a garantir uma hidratação homogénea de todo o substrato, até ser atingida a capacidade de campo. Realizaram-se amostragens nas plantas bem hidratadas, em défice hídrico e durante o período de rehidratação.

Nos ensaios realizados em 1999 e em 2001 as plantas desenvolveram-se sob abrigo, numa estufa de vidro equipada com um sistema de controlo térmico regulado para uma temperatura máxima de 25°C. Sendo a estufa desprovida de qualquer sistema de aquecimento, a temperatura mínima variou de acordo com as condições exteriores. Esta estufa não estava equipada com iluminação suplementar, pelo que o crescimento das plantas decorreu sob condições de iluminação natural com uma quebra de cerca de 35%. Dada a elevada variabilidade da irradiância nos vários pontos da estufa, procedeu-se à rotação periódica dos vasos. O ensaio Gir02 foi efectuado numa câmara de crescimento "walk-in" (Fitoclima 16000 EHVP, Aralab, Portugal) com controlo de irradiância, fotoperíodo, temperatura e humidade relativa.

As medições de potencial hídrico, trocas gasosas e fluorescência e a recolha de amostras para a medição da capacidade fotossintética, quantificação dos parâmetros bioquímicos, teor relativo em água foliar e massa foliar específica foram efectuadas num

número mínimo possível de folhas adjacentes, previamente seleccionadas em cada planta, num total de cinco plantas por tratamento.

2.2. Instalação dos ensaios

Ensaio Gir99 (*Helianthus annuus*, Maio a Julho de 1999)

Este ensaio teve início em Maio de 1999, com a sementeira das plantas, e as amostragens decorreram em Julho do mesmo ano. Após a embebição das sementes em água destilada, efectuou-se a sementeira de modo a obter duas plantas por vaso. As primeiras regas após a germinação foram efectuadas com água para evitar a acumulação de sais no substrato durante a fase inicial do crescimento. Posteriormente, e até ao início da imposição do défice hídrico, a rega com água foi intercalada com a rega com uma solução nutritiva, de nome comercial Complezal 12-4-6 (Bayer), composta por 120g/L de azoto, 40g/L de fósforo e 60g/L de potássio e micronutrientes, na diluição de 400 mL/100 L.

A imposição do défice hídrico teve início trinta e sete dias após a sementeira, quando as plantas apresentavam um total de oito a onze folhas com comprimento superior a 1 cm. O défice hídrico foi imposto gradualmente, durante doze dias, pela reposição de 70% das perdas diárias por evapotranspiração. No dia da amostragem das plantas em stresse o substrato encontrava-se a 28% da capacidade de campo. A recuperação do stresse foi feita com o volume de solução nutritiva necessário à reposição do peso perdido por evapotranspiração durante o desenvolvimento do stresse, tendo como referência o peso dos vasos quando regados à capacidade de campo.

As plantas em défice hídrico foram amostradas quarenta e nove dias após a sementeira, em simultâneo com as plantas controlo. A amostragem das plantas em recuperação foi feita cinquenta e um dias após a sementeira, 48 h após o início do alívio do stresse. Foram analisadas folhas de duas idades diferentes. Como folhas jovens (J) foram consideradas as que se encontravam em início de expansão aquando da imposição do défice hídrico e que completaram a sua expansão durante o ciclo de secagem, encontrando-se completamente expandidas no período da amostragem (contagem acrópeta da folha marcada para amostragem igual a 10.6 ± 0.9 , 9.4 ± 1.1 e 10.2 ± 0.8 para as plantas controlo, em défice hídrico e rehidratadas, respectivamente, num total de cerca de 17.6 ± 0.9 , 16.8 ± 0.8 e 17.8 ± 1.1 folhas por planta; valores apresentados sob a forma de média mais ou menos desvio padrão). Como folhas maduras (M) foram consideradas as que já se encontravam em expansão ou quase expandidas no início da imposição do défice hídrico (contagem acrópeta da folha marcada para amostragem igual a 6.0 ± 0.7 , 6.2 ± 0.4 e 6.8 ± 0.5 para as plantas controlo, em

défice hídrico e rehidratadas, respectivamente; valores apresentados sob a forma de média mais ou menos desvio padrão).

Em cada amostragem mediu-se o potencial hídrico foliar de madrugada numa folha completamente expandida e não senescente. Cerca do meio-dia procedeu-se à medição, na folha marcada, da fluorescência da clorofila *a* e das trocas gasosas em condições ambientais (irradiância: 1105 ± 44 e $1068 \pm 53 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, folhas jovens e folhas maduras, respectivamente). Imediatamente a seguir a estas medições foram retiradas amostras, da mesma folha, para a determinação dos teores em pigmentos e em proteína solúvel e ainda para a determinação do teor relativo em água foliar (TRA) e massa foliar específica (SLM).

Na semana em que decorreu a amostragem a maior parte das plantas já se encontrava em floração.

Ensaio Lup01 (Lupinus albus, Março a Abril de 2001)

Este ensaio, realizado com *Lupinus albus*, semente comercial, teve início em Março de 2001 e as amostragens decorreram no fim de Abril do mesmo ano. Após a embebição das sementes em água destilada, efectuou-se a sementeira de modo a obter uma planta por vaso.

Durante o período de crescimento das plantas e antes do início da imposição dos tratamentos, todos os vasos foram regados até à capacidade de campo de dois em dois dias. As primeiras regas após a germinação foram efectuadas com água para evitar a acumulação de sais no substrato durante a fase inicial do crescimento. Dez dias após a sementeira, a rega começou a ser feita com uma solução nutritiva completa de Hoagland (Hoagland e Snyder, 1933) modificada cuja concentração em nutrientes foi aumentando progressivamente (soluções L1, L2 e L3, Anexo I), de modo a acompanhar o crescimento das plantas (Tab. II.1). A partir dos vinte e quatro dias após a sementeira a composição da solução de rega não sofreu mais alterações até ao final do ensaio.

Tabela II.1 – Regime de regas efectuado no ensaio Lup01

Dias após a sementeira	Solução de rega (a)
0	água
10	L1
17	L2
24	L3

(a) Anexo I - composição das soluções L1, L2 e L3.

A imposição do défice hídrico teve início vinte e oito dias após a sementeira, quando as plantas apresentavam seis a oito folhas nas quais o comprimento do folíolo central era superior a 2 cm. O défice hídrico foi imposto ao longo de dezoito dias para o primeiro nível de stresse, stresse ligeiro (DHL), e prolongou-se por mais seis dias para o segundo nível de stresse, stresse moderado (DHm). No dia da amostragem das plantas em stresse o substrato encontrava-se a 55% e 45% da capacidade de campo, respectivamente para o stresse ligeiro e para o stresse moderado. A recuperação do stresse foi feita em plantas às quais se tinha imposto défice hídrico, pela reposição da solução nutritiva em função da quantidade da água perdida, tendo como referência o peso dos vasos quando regados à capacidade de campo. No início da imposição do défice hídrico as plantas encontravam-se em estágio de desenvolvimento vegetativo, tendo iniciado a floração durante a imposição do stresse e antes da amostragem correspondente ao stresse mais moderado. Durante esta amostragem todas as plantas exibiam inflorescências primárias e, uma semana depois, na amostragem correspondente ao défice hídrico mais prolongado e intenso, muitas destas inflorescências já tinham evoluído para fruto. Para uniformizar as condições ambientais nos diferentes dias de amostragem, as plantas foram transferidas de véspera para uma câmara de crescimento (Fitoclima 700 EDTU, Aralab, Portugal): humidade relativa: 60%, temperatura noite/dia: 18°C/22 °C, irradiância máxima: 200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

As amostragens foram realizadas quarenta e cinco, quarenta e seis, cinquenta e dois, cinquenta e quatro e cinquenta e cinco dias após a sementeira, para as plantas controlo, em défice hídrico ligeiro (DHL), défice hídrico moderado (DHm), 48 h e 72 h depois da rehidratação do substrato, respectivamente. As folhas seleccionadas para as amostragens correspondentes ao défice hídrico estavam em início de expansão aquando do início da imposição do stresse e completaram a sua expansão durante o ciclo de secagem, encontrando-se completamente expandidas no período da amostragem. A posição na planta por contagem acrópeta das folhas marcadas para amostragem foi 6.0 ± 1.3 num total de 14.0 ± 0.7 folhas nas plantas controlo, 6.6 ± 0.9 num total de 14.4 ± 1.5 folhas nas plantas em défice hídrico ligeiro, 10.0 ± 0.7 num total de 15.2 ± 1.3 folhas nas plantas em défice hídrico moderado, 11.0 ± 1.2 num total de 20.0 ± 4.8 folhas 48 h depois da rehidratação do substrato e 11.6 ± 0.9 num total de 17.0 ± 3.8 folhas 72 h depois da rehidratação do substrato.

Em cada amostragem foi medido o potencial hídrico foliar de madrugada e a meio do dia. De madrugada o potencial hídrico foi medido em folhas destacadas, completamente expandidas e não senescentes, que não iriam ser utilizadas noutras medições, enquanto o

potencial hídrico a meio do dia foi medido numa folha adjacente à folha marcada, da qual foram ainda retiradas amostras para avaliação do teor relativo em água foliar (TRA) e da massa foliar específica (SLM). Uma hora depois de as luzes terem sido ligadas foram retirados discos foliares da folha marcada para a medição da capacidade fotossintética (A_{\max} , irradiância: $892.4 \pm 3.6 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Após a medição de A_{\max} os discos foliares foram colocados em azoto líquido para posterior determinação do teor em proteína solúvel e em Rubisco. Cinco horas depois de ligadas as luzes, foram medidas as trocas gasosas, na folha marcada, em condições ambientais (irradiância: $128 \pm 3 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A fluorescência da clorofila *a* foi medida de madrugada e a meio do dia (irradiância: $82 \pm 3 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) na folha marcada e, imediatamente a seguir a estas medições foram retiradas amostras, da mesma folha, para a determinação dos teores em pigmentos. À mesma hora foram retiradas amostras, da folha imediatamente acima, para a quantificação do teor foliar em dialdeído malónico (MDA) e ainda para a determinação da actividade das enzimas do sistema antioxidante.

Ensaio Gir01 (*Helianthus annuus*, Setembro a Outubro de 2001)

Este ensaio, realizado com *Helianthus annuus*, teve início em Setembro de 2001 e as amostragens decorreram no fim de Outubro do mesmo ano. Após a embebição das sementes com água destilada, efectuou-se a sementeira de modo a obter uma planta por vaso. Neste ensaio foi instalado na estufa um sistema de registo da temperatura e da humidade relativa. As temperaturas mais altas verificaram-se durante a primeira semana após a instalação do ensaio, com um máximo de 32.9°C , indicando um funcionamento ineficaz do controlo térmico. No mesmo intervalo de tempo a temperatura mínima registada foi de 16.1°C . A humidade relativa variou entre 33.9% e 90.8%. Durante o resto do ensaio a temperatura máxima atingida foi 31.9°C e a mínima 12.7°C . A humidade relativa variou entre 28.7% e 94.0%.

Durante o período de crescimento das plantas e antes do início da imposição dos tratamentos, todos os vasos foram regados até à capacidade de campo de dois em dois dias. As primeiras regas após a germinação foram efectuadas com água para evitar a acumulação de sais no substrato durante a fase inicial do crescimento. No terceiro dia após a sementeira a rega começou a ser feita com uma solução nutritiva completa de Hoagland modificada (Hoagland e Snyder, 1933) cuja concentração em nutrientes foi aumentando progressivamente (soluções G1, G3, G4 e G5, Anexo II), de modo a acompanhar o crescimento das plantas (Tab. II.2). A partir do vigésimo sexto dia a composição da solução de rega não sofreu mais alterações até ao final do ensaio.

Tabela II.2 – Regime de regas efectuado no ensaio Gir01

Dias após a sementeira	Estado vegetativo	Solução de rega (a)
0	sementeira	água
3	iniciação do primeiro par de folhas	G1
12	primeiro par de folhas em expansão	G3
18	iniciação do segundo e terceiro par de folhas	G4
26	iniciação do terceiro e quarto par de folhas	G5

(a) Anexo II – composição das soluções G1, G3, G4 e G5

A imposição do défice hídrico teve início vinte e seis dias após a sementeira em ambos os regimes nutritivos, quando as plantas apresentavam seis a nove folhas com comprimento superior a 1 cm. O défice hídrico foi imposto no substrato durante treze dias para o primeiro nível de stresse, stresse ligeiro (DHL), e prolongou-se por mais seis dias para o segundo nível de stresse, stresse moderado (DHm). No dia da amostragem das plantas sujeitas a défice hídrico o substrato encontrava-se a 55 % e a 45% da capacidade de campo para o stresse ligeiro e para o stresse moderado, respectivamente. No início da imposição do défice hídrico as plantas encontravam-se todas em estado vegetativo. A floração teve início durante a imposição do défice hídrico e antes da amostragem correspondente ao défice hídrico ligeiro, pelo que as plantas se encontravam em floração durante toda a amostragem.

A recuperação do stresse foi feita em plantas às quais se tinha imposto défice hídrico, pela rega com solução nutritiva, tendo como referência o peso dos vasos quando regados à capacidade de campo.

Com vista à uniformização das condições ambientais nos dias de amostragem, as plantas foram transferidas de véspera para uma câmara de crescimento (Fitoclima 700 EDTU, Aralab, Portugal): humidade relativa: 60%, temperatura noite/dia: 18°C/22 °C, irradiância máxima: 200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

As plantas controlo (C) foram amostradas quarenta dias após a sementeira, as plantas em défice hídrico ligeiro (DHL) trinta e nove, as plantas em défice hídrico moderado (DHm) quarenta. As amostragens das plantas em recuperação foram feitas 48 h (R48) e 72 h (R72) após o início o início da rehidratação do substrato. As folhas seleccionadas para a amostragem correspondente ao défice hídrico estavam já iniciadas aquando do início da imposição do

stresse e completaram a sua expansão durante o ciclo de secagem, encontrando-se completamente expandidas no período da amostragem. Por contagem acrópeta, as folhas marcadas para amostragem correspondiam a 8.2 ± 1.6 num total de 15.0 ± 2.8 folhas nas plantas controlo, 8.6 ± 1.5 num total de 15.8 ± 3.0 folhas nas plantas em défice hídrico ligeiro, 9.4 ± 1.9 num total de 16.8 ± 2.9 folhas nas plantas em défice hídrico moderado, 9.8 ± 0.8 num total de 17.4 ± 1.5 folhas 48 h depois da rehidratação do substrato e 10.2 ± 0.8 num total de 18.8 ± 0.8 folhas 72 h depois da rehidratação do substrato.

Em cada amostragem mediu-se o potencial hídrico e a fluorescência da clorofila *a* de madrugada e a meio do dia (irradiância: $91 \pm 2 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). O potencial hídrico de madrugada foi medido em folhas destacadas, completamente expandidas e não senescentes, que não iriam ser utilizadas noutras medições, e o potencial hídrico a meio do dia (5 h depois de ligadas as luzes na câmara) foi medido numa folha adjacente à folha marcada, da qual foram também retiradas amostras para a quantificação de TRA e SLM. A fluorescência da clorofila *a* foi sempre medida na folha marcada e as amostras para a quantificação dos pigmentos foram retiradas imediatamente a seguir, da mesma folha. Quatro horas depois de ligadas as luzes procedeu-se à medição das trocas gasosas, na folha marcada, sob condições ambiente (irradiância: $144 \pm 4 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e à recolha de discos foliares para medição da capacidade fotossintética (irradiância: $1268.6 \pm 13.8 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Os discos foliares utilizados na medição da capacidade fotossintética foram depois colocados em azoto líquido para posterior determinação do teor em proteína solúvel e Rubisco. Cerca de 5h depois de ligadas as luzes, foram colhidas amostras da folha imediatamente acima da folha marcada para determinação do teor foliar em MDA e da actividade das enzimas do sistema antioxidante.

Ensaio Gir02 (*Helianthus annuus*, Junho e Julho de 2002)

Este ensaio, realizado com *Helianthus annuus*, teve início no princípio de Junho de 2002 e as amostragens decorreram no fim de Julho do mesmo ano. Depois da embebição das sementes com água destilada, efectuou-se a sementeira de modo a obter uma planta por vaso. As plantas desenvolveram-se numa câmara de crescimento “walk-in” (Fitoclima 16000 EHVP, Aralab, Portugal) programada para um fotoperíodo de 12 h (irradiância máxima de $700 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em que a temperatura diurna era de 25°C com humidade relativa 60%, e a temperatura nocturna era de 22°C com humidade relativa 70%.

Logo após a sementeira a rega começou a ser feita com uma solução nutritiva completa de Hoagland modificada (Hoagland e Snyder, 1933), cuja concentração em

nutrientes foi aumentando progressivamente (soluções G2, G3, G4 e G5, Anexo II) ao longo do ensaio, de modo a acompanhar o crescimento das plantas (Tab. II.3). Depois do décimo sétimo dia após a sementeira a composição da solução de rega não sofreu mais alterações até ao final do ensaio.

Tabela II.3 – Regime de regas efectuado no ensaio Gir02

Dias após a sementeira	Estado vegetativo	Solução de rega (a)
0	sementeira	G2
8	primeiro par de folhas iniciado	G3
13	iniciação do segundo par de folhas	G4
17	segundo par de folhas em desenvolvimento e iniciação do terceiro par de folhas	G5

(a) Anexo II – composição das soluções G2, G3, G4 e G5

A imposição do défice hídrico teve início dezanove dias após a sementeira, quando as plantas apresentavam quatro a seis folhas com comprimento superior a 1 cm. O défice hídrico foi imposto no substrato durante nove dias para o primeiro nível de stresse (DHm) e prolongou-se por mais seis dias para o segundo nível de stresse (DHs). No dia da amostragem das plantas sujeitas a défice hídrico o substrato encontrava-se a 55 % e 40% da capacidade de campo para DHm e DHs, respectivamente. A recuperação do stresse foi feita, em plantas às quais se tinha imposto défice hídrico, pela reposição da totalidade da água perdida, tendo como referência o peso dos vasos quando regados à capacidade de campo.

Na véspera de cada amostragem metade das plantas a analisar foram transferidas para uma outra câmara de crescimento de condições controladas (Fitoclima 700 EDTU, Aralab, Portugal) programada para manter as mesmas condições de humidade e temperatura que a câmara “walk-in” mas com uma irradiância máxima de $200 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Foram analisadas folhas de duas idades diferentes. As folhas consideradas jovens eram folhas que se encontravam em início de expansão no início da imposição do défice hídrico e que completaram a sua expansão durante o ciclo de secagem, encontrando-se completamente expandidas no período da amostragem (contagem acrópeta da folha marcada para amostragem igual a 6.2 ± 0.4 num total de 10.8 ± 0.6 folhas nas plantas controlo, 5.9 ± 0.3 num total de

10.3 ± 0.7 folhas nas plantas DHm, 7.4 ± 0.5 num total de 14.4 ± 0.9 folhas nas plantas DHs e 6.9 ± 0.6 num total de 13.8 ± 1.2 folhas e 8.0 ± 0.5 num total de 16.3 ± 0.8 folhas 24 h e 48 h depois da rehidratação do substrato, respectivamente; valores apresentados sob a forma de média mais ou menos desvio padrão). Como folhas maduras foram consideradas as folhas que já se encontravam em expansão no início da imposição do défice hídrico (contagem acrópeta da folha marcada para amostragem igual a 3.0 ± 0.0 num total de 10.8 ± 0.6 folhas nas plantas controlo, 3.0 ± 0.0 num total de 10.3 ± 0.7 nas plantas DHm, 3.8 ± 0.6 num total de 14.4 ± 0.9 folhas nas plantas DHs e 3 ± 0 num total de 13.8 ± 1.2 folhas e 4.0 ± 0.0 num total de 16.3 ± 0.8 24 h e 48 h depois da rehidratação do substrato, respectivamente; valores apresentados sob a forma de média mais ou menos desvio padrão).

As amostragens das plantas para o primeiro nível de défice hídrico (DHm) foram realizadas vinte e oito dias após a sementeira e as plantas controlo vinte e sete dias, quando todas as plantas se encontravam em estado vegetativo. Para o segundo nível de défice hídrico (DHs) as plantas foram amostradas trinta e quatro dias após a sementeira. Nesta amostragem cerca de metade das plantas já tinha iniciado a diferenciação do botão floral. As amostragens das plantas em recuperação foram feitas 24 h e 48 h após o início da rehidratação.

Em cada amostragem mediu-se o potencial hídrico e a fluorescência da clorofila *a* de madrugada e a meio do dia (5 h depois de as luzes acenderem nas câmaras; folhas jovens a baixa irradiância: 111 ± 2 μmol quanta m⁻²s⁻¹; folhas maduras a baixa irradiância: 96 ± 2 μmol quanta m⁻²s⁻¹; folhas jovens a irradiância mais alta: 359 ± 6 μmol quanta m⁻²s⁻¹; folhas maduras a irradiância mais alta: 327 ± 9 μmol quanta m⁻²s⁻¹). De madrugada o potencial hídrico foi medido numa folha destacada, completamente expandida e não senescente. A meio do dia, o potencial hídrico foi medido numa folha destacada, adjacente à folha marcada para amostragem da qual foram também retiradas amostras para a determinação de TRA e SLM. A fluorescência da clorofila *a* foi sempre medida na folha marcada. As amostras para a quantificação dos pigmentos e dos açúcares solúveis foram retiradas da mesma folha, imediatamente a seguir às medições de fluorescência. As amostras para a determinação do MDA foram retiradas da mesma folha, mas só a meio do dia. Três a quatro horas depois de ligadas as luzes foram retirados discos foliares para medição de A_{max} (irradiância: 1316.4 ± 8.5 μmol quanta m⁻²s⁻¹) que, depois de efectuada a medição, foram colocados em azoto líquido para posterior determinação do teor em proteína solúvel. Na mesma altura procedeu-se à medição das trocas gasosas em condições ambientais na folha marcada (folhas jovens a baixa irradiância: 166 ± 3 μmol quanta m⁻²s⁻¹; folhas maduras a baixa irradiância: 155 ± 2

$\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$; folhas jovens a irradiância mais alta: $458 \pm 4 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$; folhas maduras a irradiância mais alta: $448 \pm 4 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

2.3. Determinação do potencial hídrico e teor relativo em água foliares e da massa foliar específica

O potencial hídrico foi medido de madrugada (Ψ_{pd}) e a meio do dia (Ψ_{md}). De madrugada o potencial hídrico foi medido em folhas destacadas completamente expandidas e não senescentes, enquanto o potencial hídrico a meio do dia foi medido numa folha adjacente à folha marcada (jovem ou madura), da qual se retiraram também amostras para a determinação do teor relativo em água e da massa foliar específica.

As medições de potencial hídrico foram feitas com uma câmara de pressão (Model 1000 Pressure Chamber Instrument, PMS Instruments, Estados Unidos da América) segundo Scholander *et al.* (1964).

O teor relativo em água (TRA) foi determinado em discos foliares. 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 é definido pela fórmula $\text{TRA} = (P_f - P_s) / (P_t - P_s)$. Nesta fórmula, P_f representa a massa dos discos foliares determinada no momento da colheita, P_s representa o peso seco dado pela massa determinada após permanência a 80°C durante 48 h e P_t , o peso túrgido, representa a massa determinada após permanência em água destilada, às escuras, a 4°C durante 3 h (Riga e Vartanian, 1999). A massa foliar específica (SLM) representa a razão entre o peso seco (P_s) e a área do tecido (A).

2.4. Medições de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

a) Trocas gasosas em condições ambiente

As trocas gasosas foram medidas com um sistema aberto, portátil, de mini cuvete (HCM 1000, Walz, Alemanha). Este sistema de mini cuvete permite medições rápidas das trocas gasosas em condições naturais e funciona associado a um analisador de gases por infra-vermelhos (IRGA, Infra Red Gas Analyser) de dois canais que permite a medição diferencial $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ (Leybol Heraeus, Alemanha).

Num sistema aberto diferencial, o ar é bombeado a um fluxo constante do exterior e, dentro do aparelho, é repartido por dois circuitos: o circuito de medida e o circuito de referência. O ar canalizado para o circuito de medida passa pela folha, que se encontra encerrada numa câmara estanque (mini cuvete), e sofre alterações devidas à actividade foliar,

nomeadamente no que respeita às pressões parciais de vapor de água e de dióxido de carbono. O ar do circuito de referência faz um percurso semelhante ao do ar de medida, mas não passa pela câmara onde está encerrada a folha. Os dois circuitos de ar são depois canalizados para um analisador de gases por infra-vermelhos onde são determinadas as diferenças na composição em vapor de água e em dióxido de carbono entre o ar de medida e o ar de referência. O aparelho tem ainda a capacidade de adquirir os valores da temperatura do ar, temperatura da folha e intensidade da luz incidente. O HCM-1000 é controlado por um computador que executa a aquisição dos dados e o cálculo, de acordo com von Caemmerer e Farquhar (1981), da taxa de transpiração (TR), da condutância total para o vapor de água (g), da taxa de fotossíntese (NP) e da pressão parcial de CO₂ nos espaços intercelulares (C_i). Nestas medições foram utilizadas folhas intactas, não destacadas da planta. As medições foram efectuadas às condições ambientais.

b) Capacidade fotossintética

A capacidade fotossintética (A_{\max}) foi medida polarigraficamente com um eléctrodo de oxigénio tipo Clark (LD2/3), ligado a uma caixa de controlo e aquisição de sinal (CB1-D), ambos da Hansatech Instruments, Reino Unido. As medições de capacidade fotossintética foram feitas a 25°C, 5% CO₂ e intensidade luminosa saturante de acordo com Delieu e Walker (1981).

Um eléctrodo de oxigénio tipo Clark consiste numa célula electroquímica especializada composta por dois eléctrodos imersos numa solução de electrólito. A aplicação de uma voltagem polarizadora resulta na ionização do electrólito e no estabelecimento de uma corrente entre os dois eléctrodos. A magnitude desta corrente é proporcional à concentração de oxigénio no meio circundante (Walker 1990). O eléctrodo de oxigénio utilizado consiste num cátodo de platina e num ânodo de prata montados num disco de resina epoxy. A ponte de electrólito entre o cátodo e o ânodo é estabelecida por uma solução saturada de cloreto de potássio (KCl). A aplicação de uma voltagem estável polarizante de cerca de 700 mV dá início uma série de reacções electroquímicas cuja magnitude depende da quantidade de oxigénio presente. A corrente gerada é convertida num sinal visível num registador (Walker 1990).

O material vegetal utilizado (discos foliares) foi encerrado numa câmara de reacção que se encontra em contacto com o sensor de oxigénio, o cátodo. A temperatura de trabalho foi mantida por um banho termostático (Julabo HC, Julabo Labortechnik, Alemanha) que rodeia a câmara de reacção e a zona onde se encontra o eléctrodo. A luz actínica, indutora da fotossíntese, foi fornecida por uma fonte de luz (LS2, Hansatech Instruments, Reino Unido) equipada com uma lâmpada de halogénio (Osram Xenophot HLX, 12 V, 150 W). A

intensidade luminosa foi regulada através de filtros de densidade neutra (A5, Hansatech Instruments, Reino Unido). O CO₂ necessário à realização da fotossíntese foi fornecido a partir de soluções de tampão carbonatos CO₃²⁻/HCO₃⁻ (Pankovic *et al.*, 1999), previamente testadas de forma a garantir condições de CO₂ saturante durante as medições de A_{max} nas espécies vegetais e regimes hídricos utilizados nos ensaios.

c) Fluorescência da clorofila *a*

A fluorescência da clorofila *a* foi medida pelo método dos pulsos saturantes com um fluorímetro portátil de pulso modulado (PAM-2000, Walz, Alemanha).

A clorofila, depois de excitada pela luz, volta ao seu estado energético de base através da libertação espontânea da energia de que dispõe em excesso. Esta energia é utilizada na via fotoquímica ou dissipada sob a forma de calor, sendo a emissão de fluorescência um processo complementar a estas vias de relaxamento da clorofila. Deste modo quanto maior for a emissão de fluorescência pela clorofila depois de iluminada (fluorescência variável) menor será a quantidade de energia utilizada na via fotoquímica ou reemitida sob a forma de calor.

Na maioria dos estudos sobre fluorescência assume-se que, à temperatura ambiente, a fluorescência variável tem origem quase exclusivamente na clorofila *a* do fotossistema II, e reflecte as suas propriedades de excitação e conversão de energia (Schreiber *et al.*, 1998). Devido à relação funcional do fotossistema II (PSII) com o restante aparelho fotossintético, a análise da fluorescência medida na região do espectro próxima do funcionamento do PSII (680nm) constitui um indicador indirecto do funcionamento de todo o aparelho fotossintético (Schreiber e Bilger, 1986).

Quando uma folha é iluminada continuamente após ter sido mantida no escuro pelo tempo necessário à oxidação de todos os aceitadores primários de electrões, a fluorescência aumenta rapidamente de um nível baixo (F₀) para um nível intermédio, que reflecte o equilíbrio do estado de redução do aceitador primário de electrões, a quinona A (Q_A), com o aceitador secundário, a quinona B (Q_B); a emissão de fluorescência atinge depois um pico máximo, que indica a acumulação de Q_A e de Q_B reduzidas, após o que decresce para um nível próximo de F₀; este decréscimo reflecte a activação pela luz da capacidade de transporte de electrões pelo fotossistema I e também o desenvolvimento dos vários processos de dissipação da fluorescência, fotoquímicos e não fotoquímicos. A cinética desta resposta é conhecida por efeito de Kautsky (Schreiber e Bilger, 1986). O estado de redução do primeiro aceitador de electrões estável, a quinona A, é o factor principal que determina o rendimento da fluorescência da clorofila *a in vivo*; a emissão de fluorescência é máxima (F_m) quando todas as

Q_A se encontram reduzidas, e mínima quando todas as Q_A se encontram oxidadas correspondendo este último estado à fluorescência basal ou F_0 .

Em folhas adaptadas ao escuro F_0 é determinado após a aplicação de um pulso de luz de fraca intensidade, cerca de $0.1 \text{ mmol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. F_m é determinado pela aplicação de um pulso de luz saturante e a fluorescência variável (F_v) é definida pela sua diferença. A razão $(F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$ representa uma medida do rendimento quântico potencial do PSII (Schreiber *et al.* 1998) e reflecte a sua eficiência fotoquímica máxima.

Em folhas adaptadas à luz, o nível de alterações da fluorescência máxima (F'_m) pode ser monitorizado, continuamente, pela indução de fluorescência através da aplicação repetida de pulsos de luz saturante, de curta duração. A fluorescência passa por alterações complexas até atingir um nível estável (F_t), desde que as condições externas se mantenham constantes. Foi demonstrado que, quando todos os centros do PSII estão abertos, o nível de F_0 pode ser diminuído pelo chamado 'quenching' do F_0 (q_0), atingindo o nível F'_0 , ou nível mínimo de fluorescência em material adaptado à luz. Para se proceder ao cálculo correcto do 'quenching' fotoquímico (qP^1), utilizado para estimar a fracção de centros de reacção abertos, é então necessária a determinação prévia do F'_0 (van Kooten e Snel, 1990). Sob condições estáveis, o F'_0 é determinado escurecendo a amostra, e aplicando simultaneamente uma luz fraca na zona do vermelho longínquo, durante aproximadamente 3 segundos, de forma a oxidar completamente o PSII durante a medição. O conhecimento do F'_0 é indispensável para a obtenção de informação sobre a magnitude da fracção de centros de reacção do PSII 'abertos', via o cálculo do qP (Schreiber *et al.* 1998). A medição da fluorescência em folhas adaptadas à luz permite ainda o cálculo correcto do parâmetro de Genty (Φ_{PSII}^2), que reflecte o rendimento quântico real do PSII, ou seja, o rendimento quântico do transporte acíclico de electrões e a eficiência fotoquímica dos centros de reacção do PSII abertos, o F'_v/F'_m (Genty *et al.* 1989). Com este tipo de medições torna-se também possível a avaliação da quantidade de energia dissipada de forma não radiativa, relacionada com o 'quenching' não fotoquímico (NPQ^3), calculado segundo a equação de Stern-Volmer (Cornic 1994). Assumindo que, em média, uma folha C_3 absorve 84% da radiação incidente (Björkman e Demmig 1987) e que os quanta são repartidos equitativamente pelos dois fotossistemas, pode ainda estimar-se a taxa de transporte de electrões (ETR^4) (Krall e Edwards 1992).

¹ $qP = (F'_m - F_t)/(F'_m - F'_0)$

² $\Phi_{\text{PSII}} = (F'_m - F_t)/F'_m$

³ $\text{NPQ} = (F_m - F'_m)/F'_m$

⁴ $\text{ETR} = \Phi \times \text{PPFD} \times 0.84 \times 0.5$

Nos ensaios realizados em 1999 utilizou-se um fluorímetro portátil (Plant Efficiency Analyser - PEA, Hansatech, Inglaterra) que apenas permitiu a determinação dos parâmetros de fluorescência em material adaptado ao escuro.

2.5. Análises bioquímicas

a) Quantificação dos pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos foram quantificados em extractos foliares por: a) colorimetria, ou b) por 'High Performance Liquid Chromatography' (HPLC):

a) Os extractos foliares foram obtidos por maceração em acetona a 100% na proporção de 1 cm² de material vegetal para 5 mL de solvente. O homogeneizado foi centrifugado a 14000 x g (Heraeus Sepatech Biofuge A, rotor de ângulo fixo 1378, Alemanha) durante 3 minutos. Foram lidas as absorvâncias a 661.6 nm ($A_{661.6}$), 644.8 nm ($A_{644.8}$) e 470 nm (A_{470}) num espectrofotómetro Shimadzu UV-160, Japão. As concentrações de clorofila *a* (*Ca*), a clorofila *b* (*Cb*), a clorofila total (*Ca+b*) e carotenóides totais (*Car*) no extracto foliar foram calculadas segundo as equações (Lichtenthaler, 1987):

$$Ca (\mu\text{g mL}^{-1}) = 11.24 \times A_{661.6} - 2.04 \times A_{644.8}$$

$$Cb (\mu\text{g mL}^{-1}) = 20.13 \times A_{644.8} - 4.19 \times A_{661.6}$$

$$Ca+b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 7.05 \times A_{661.6} + 18.09 \times A_{644.8}$$

$$Car (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000 \times A_{470} - 1.90 \times Ca - 63.14 \times Cb)/214$$

b) Os extractos foliares foram obtidos tal como descrito em Abadía e Abadía (1993): o material foi esmagado com um pouco de ascorbato de sódio, em azoto líquido. Ao macerado obtido adicionou-se acetona a 100%, neutralizada com carbonato de cálcio (cerca de 20 g de carbonato de cálcio em 10 L de acetona), na proporção de 0.2 a 0.4 cm² de material vegetal por mL de solvente. Com o objectivo de remover as partículas em suspensão, o extracto foi filtrado através de uma sequência de dois filtros hidrofóbicos, de PTFE, com porosidades 5 µm e 0,2 µm. O extracto obtido foi mantido a -20°C e às escuras até ser analisado.

A composição em pigmentos dos extractos foliares foi determinada por HPLC segundo de las Rivas *et al.* (1989) no Departamento de Nutrición Vegetal na Estación Experimental de Aula Dei, Saragoça, Espanha. A cromatografia foi realizada com uma pré-coluna de fase reversa Waters µbondapak (tamanho das partículas 10 µm) e com coluna de compressão radial C₁₈ (Waters Novapak, 100 x 8 mm, tamanho das partículas: 4 µm). As amostras (100 µL) foram injectadas com um injector Rheodyne 7010 com um 'loop' de 20 µL e as fases móveis foram bombeadas por uma bomba de alta pressão Waters M45 com um

fluxo de 1.7 mL min^{-1} (pressão: 100 psi). Os picos de absorção foram detectados a 450 nm (detector Shimadzu UV-VIS) e integrados com um integrador Shimadzu CR3. Antes da injeção da amostra, a coluna foi equilibrada durante sete minutos com uma solução de acetonitrilo e metanol na proporção 7:1 (volume: volume). Depois da coluna equilibrada, injectou-se a amostra e a fase móvel foi bombeada por mais dois minutos, após o que injectou o primeiro eluente (E1) composto por acetonitrilo, metanol e trietilamina nas proporções 3:0.4:0.02 (v:v) durante 3.5 minutos. Aos 3.5 minutos injectou-se o segundo eluente (E2) composto por acetonitrilo, metanol, água, acetato de etilo e trietilamina nas proporções 2.8:0.3:0.02:3.2:0.04 (v:v) durante 4.5 minutos. Por fim voltou a injectar-se o primeiro eluente durante 5 minutos. Os picos de cada pigmento foram identificados através dos seus tempos de retenção previamente determinados durante a calibração do aparelho de HPLC para esta metodologia, sendo a sequência de saída dos pigmentos a seguinte: neoxantina cis, neoxantina trans, violaxantina, taraxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina, clorofila *b*, clorofila *a*, α -caroteno e β -caroteno.

b) Quantificação dos açúcares não estruturais

O teor foliar em açúcares não estruturais foi determinado segundo Stitt *et al.* (1978, 1989) e com base no método enzimático descrito por Jones *et al.* (1977). Utilizando um espectrofotómetro Shimadzu UV-3000, Japão, foi feita a quantificação indirecta dos açúcares não estruturais através das alterações na absorvância a 340 nm. O aumento na absorvância a 340 nm é devido à redução do NADP^+ a NADPH, associada a um conjunto de reacções de inter conversão de açúcares, cuja estequiometria é de 1:1 para as hexoses e 2:1 para a sacarose, tendo-se usado o valor de 6.2 mM^{-1} para coeficiente de extinção molar do NADPH (ϵ_{NADPH}).

A extracção dos açúcares solúveis foi feita em de etanol a 80% (v:v), a 80°C , na razão de 2.5 cm^2 de material vegetal para 10 mL de solvente. A quantificação foi efectuada aplicando 50 μL a 100 μL de extracto, após branqueamento com carvão activado, numa cuvete semi-micro na qual já se encontravam 700 μL de tampão imidazol 100 mM (pH 6.9) com 1.5 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 25 μL de NADP 0.5 mM, 25 μL de ATP 1.1 mM e 1 μL de uma solução com 0.6U de hexocinase (E.C. 2.7.1.1). Foram registadas as alterações na absorvância a 340 nm, após a adição sequencial de 1 μL de uma solução com 1U de glucose-6-fosfato desidrogenase (E.C. 1.1.1.49), 1.2U de fosfogluco-isomerase (E.C. 5.3.1.9) e 33U de invertase (E.C. 3.2.1.26), com vista à quantificação da glucose, da frutose e da sacarose, respectivamente. As soluções de enzimas NADP e ATP foram feitas em tampão imidazol

100 mM (pH 6.9) com 1.5 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$. As enzimas, o NADP e ATP utilizados são os comercializados pela Boehringer, excepto a invertase, comercializada pela Sigma.

O amido foi quantificado em equivalentes de glucose, após hidrólise enzimática do resíduo sólido, resultante da extracção alcoólica, depois de homogeneizado e lavado. O resíduo sólido foi homogeneizado por maceração em água destilada, na proporção de 2 cm² de material vegetal para 1 mL de água, e a suspensão obtida foi centrifugada a 15000 x g (Heraeus Sepatech Biofuge A, rotor de ângulo fixo 1378, Alemanha) durante 5 minutos. O depósito resultante desta centrifugação foi ressuspensionado em 1 mL de água destilada, homogeneizado e centrifugado a 15000 x g durante 5 minutos. A ressuspensão e centrifugação do depósito foram repetidas por três vezes, após o que se procedeu à autoclavagem do resíduo sólido a 120°C durante 3 horas. Procedeu-se então à hidrólise enzimática do amido: a suspensão autoclavada foi homogeneizada e 100 µL foram colocados em 500 µL de um meio reaccional constituído por 100 mM de tampão acetato de sódio, pH 4.8, com 1.4 U de amiloglucosidase (E.C. 3.2.1.3) (Boehringer) e 2 U de α -amilase (E.C. 3.2.1.1) (Sigma). Esta mistura reaccional foi a incubar a 37°C, durante um mínimo de 4 horas, após o que foi centrifugada. Depois da centrifugação quantificou-se a glucose contida no sobrenadante por um método colorimétrico adaptado, do método enzimático já descrito, para microplacas de 96 poços (Hatterscheid e Willebrink 1991). A mistura reaccional em cada poço foi constituída por 10 µL de sobrenadante a que se adicionaram 150 µL de uma mistura composta por 8 mL de água destilada desionizada, 11.56 mL de violeta de p-iodonitrotetrazolio (INT), 56.1 mL de albumina bovina (BSA) a 0.1%, 340 µL de diaforase e 5 mL da solução 2 e 800 µL da solução 3 do 'kit' de doseamento da Roche Molecular Biochemicals (cat. N° 716260). Depois de todas as misturas reaccionais terem sido carregadas nos poços, as microplacas foram cobertas com papel de alumínio e incubaram a temperatura ambiente durante 40 a 60 minutos. O amido contido na amostra foi quantificado em equivalentes de glucose através da reacção de redução do $NADP^+$ a NADPH, que por sua vez é oxidado pelo INT na presença da diaforase. Desta reacção resulta o aumento da absorvância a 490 nm. A quantidade de amido (em equivalentes de glucose) contida nas amostras de cada placa foi determinada em função da curva padrão da respectiva placa, constituída por uma série de soluções de glucose, após leitura a 490 nm num leitor de microplacas (Titertek Multiskan-Plus).

c) Quantificação da proteína solúvel total e da Rubisco (Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase)

A proteína solúvel total e a Rubisco (E.C. 4.1.1.39) foram quantificadas em amostras foliares maceradas de tampão de extracção, a frio, na razão de 2 cm² para 1 mL. O tampão de extracção, com pH 7.4, era constituído por 25 mM Hepes, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 2.5 mM NaHCO₃, 0.05% Triton-X, 5% Glicerina, 10 mM DTT, 1mM de benzamidina, 1 mM ácido amino n-caprónico e 0.25 mM PMSF tal como descrito em Quick *et al.* (1991). O extracto foi dividido em aliquotas de 200 µL que foram imediatamente congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C. Cada uma das aliquotas foi posteriormente utilizada para a quantificação da proteína solúvel total e da Rubisco.

Para a quantificação da proteína solúvel total uma das aliquotas foi centrifugada a 14000 x g (Heraeus Sepatech Biofuge A, rotor de ângulo fixo 1378, Alemanha) durante 3 minutos e o doseamento da proteína foi efectuado em 4 µL de sobrenadante.

O doseamento das proteínas foi efectuado pelo método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando um reagente comercial (BioRad Protein Assay, Hercules, California, USA) e albumina bovina (BSA) como padrão. Foram feitas cinco diluições de BSA em água destilada de modo a que se obtivessem as concentrações de BSA pretendidas (0 µg mL⁻¹, 2 µg mL⁻¹, 4 µg mL⁻¹, 6 µg mL⁻¹ e 8 µg mL⁻¹), após a adição de 200 µL de BioRad. Foi adicionada água destilada às amostras até perfazer um volume total de 800 µL aos quais se adicionaram 200 µL de BioRad. As absorvâncias de duplicados de cada amostra foram lidas a 595 nm, num espectrofotómetro Shimadzu UV-160, Japão, 20-30 minutos depois da adição do reagente.

A Rubisco foi quantificada por ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) indirecto com anticorpos monoclonais de acordo com os protocolos descritos em Ausubel *et al.* (1990). Utilizaram-se anticorpos monoclonais anti-Rubisco, de tremoceiro, produzidos em coelho (cortesia de M. Chaves, I.S.A. – Universidade Técnica de Lisboa) na diluição 1:10000 e um anticorpo conjugado anti-rabbit IgG/peroxidase produzido em cabra (Sigma, St Louis, USA) na diluição 1:5000. A Rubisco utilizada como padrão foi purificada como descrito por Paech e Dybing (1986) a partir de extractos foliares de tremoceiro ou de girassol.

Decorridos vinte minutos sobre a adição do substrato, a reacção foi parada com 25 µL de H₂SO₄ 3M e procedeu-se à medição da absorvância a 450 nm num leitor de placas ELISA (Titertek Multiskan-Plus). Com os valores de absorvância obtidos para as diferentes diluições

do padrão, calculou-se a equação da recta, resultante da relação entre $\log[\text{Rubisco}]$ e o logit da percentagem de ligação $[\text{logit}(B/B_0)]^5$, que permite calcular o teor em Rubisco nos extractos:

$$\begin{aligned}\text{logit}(B/B_0) &= a \log[\text{Rubisco}] + b \\ \log[\text{Rubisco}] &= (\text{logit}(B/B_0) - b)/a \\ [\text{Rubisco}] &= 10^{((\text{logit}(B/B_0) - b)/a)}\end{aligned}$$

Utilizaram-se apenas os valores correspondentes à zona dinâmica de ligação, isto é, situados entre 20% e 90% da ligação máxima.

d) Quantificação de produtos de peroxidação de lípidos

Os danos provocados aos lípidos por espécies reactivas de oxigénio (ROS), são estimados através da determinação do teor em substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos extractos dos tecidos. O dialdeído malónico (MDA) ou propanodial (IUPAC), um produto final, secundário, da autooxidação e degradação enzimática dos ácidos gordos polinsaturados, é considerado um indicador útil do nível de peroxidação dos lípidos (Hodges *et al.* 1999). O MDA reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), por via de uma reacção de adição nucleofílica, catalizada por um ácido, e resulta na formação de uma substância avermelhada, com um pico de absorção a 532 nm. Tradicionalmente o nível de peroxidação dos lípidos é determinado medindo a absorvância a 532 nm para os TBARS e a 600 nm para posterior correcção das leituras para a absorção não específica devida à turbidez ($\text{Abs}_{532} - \text{Abs}_{600} = \text{Abs}_{\text{MDA}}$). Estudos realizados (Blokhina *et al.* 1999, Hodges *et al.* 1999, Taulavuori *et al.* 2001) revelaram que este método deve ser corrigido contra compostos como as antocianinas e os hidratos de carbono, cujos níveis variam de tecido para tecido e com o nível de stresse a que foram sujeitos, que interferem com as medições a 532 nm e provocam a sobrestimação do MDA (Taulavuori *et al.* 2001). Segundo Hodges *et al.* (1999), pode obter-se a correcção dos valores medindo simultaneamente a absorvância a 532 nm de uma solução contendo o extracto vegetal e incubada com TBA (amostra) e sem TBA (referência). À absorvância do extracto vegetal incubado com TBA deverá depois ser subtraída a absorvância do extracto vegetal incubado sem TBA. Tanto a amostra como a referência são lidas a três comprimentos de onda: 532 nm (pico de absorção do complexo TBA- MDA e de flavonóides como as antocianinas), 440 nm (pico de absorção dos hidratos de carbono), e 600 nm (para correcção das leituras para a absorção não específica devida à turbidez).

⁵ $\text{logit}(B/B_0) = \ln(B/B_0)/[100 - (B/B_0)]$

$\%(B/B_0) = (\text{Abs A} - \text{Abs B})/(\text{Abs m} - \text{Abs B}) \times 100$

Abs A – absorvância da amostra; Abs B – absorvância do branco; Abs m – absorvância do padrão menos diluído

Neste trabalho o nível da peroxidação de lípidos foi estimado de acordo com Hodges *et al.* (1999). O material vegetal foi macerado em ácido tricloroacético (TCA) a 20% na proporção de 100 mg de peso fresco para 1 mL de ácido tricloroacético. Depois de homogeneizada, esta suspensão foi centrifugada a 4°C, 3000 x g (Heraeus Megafuge 1.0R, rotor de ângulo variável 3360, Alemanha), durante 10 minutos. A 500 µL do sobrenadante foram adicionados 1.5 mL de uma solução de TBA em TCA (0.5% de TBA e TCA a 20%, v:v). Foi feito um duplicado e uma referência para cada amostra. A referência foi obtida pela adição de 1.5 mL de TCA 20% a 500 µL de amostra. Foram ainda preparados dois zeros, em que a amostra foi substituída por TCA 20%, para cada conjunto de leituras. As amostras, as referências e os zeros foram bem homogeneizados e colocados num banho a 90°C durante 25 minutos, após o que foram arrefecidos em gelo durante 15 minutos. Depois de homogeneizar, procedeu-se a uma nova centrifugação à temperatura ambiente, a 10000 x g (Heraeus Megafuge 1.0R, rotor de ângulo variável 3360, Alemanha) durante 10 minutos. Recolheu-se o sobrenadante e leu-se a absorvância a 440 nm, 532 nm e 600 nm num espectrofotómetro Shimadzu UV-160, Japão.

Os equivalentes de MDA (Eq. MDA) foram calculados com base nas seguintes equações:

$$\text{Eq MDA (nmol mL}^{-1}\text{)} = [(A-B)/157\ 000] \times 10^6$$

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

$$B = (\text{Abs}_{440+\text{TBA}} - \text{Abs}_{600+\text{TBA}}) \times 0.0571$$

Em que $\text{Abs}_{532+\text{TBA}}$, $\text{Abs}_{600+\text{TBA}}$ e $\text{Abs}_{440+\text{TBA}}$ representam as absorvâncias das amostras a 532 nm, 600 nm e 440 nm e $\text{Abs}_{532-\text{TBA}}$, $\text{Abs}_{600-\text{TBA}}$ e $\text{Abs}_{440-\text{TBA}}$ representam as absorvâncias das referências nos mesmos comprimentos de onda.

e) Extracção e determinação da actividade das enzimas do sistema antioxidante

Foi medida a actividade das seguintes enzimas: peroxidase do ascorbato (E.C.1.11.1.11), redutase do desidroascorbato (E.C.1.8.5.1), redutase do radical mono desidroascorbato (E.C.1.1.5.4), dismutase do superóxido (E.C.1.15.1.1), redutase da glutatona (E.C. 1.6.4.2) e catalase (E.C.1.11.1.6).

A actividade das enzimas do sistema antioxidante foi medida em extractos foliares obtidos a partir de fracções de folhas. Depois de colhido, o material foliar foi imediatamente congelado em azoto líquido e armazenado a -80°C até à extracção.

Os extractos foliares foram obtidos como descrito em Polle *et al.* (1993), excepto a peroxidase do ascorbato (Apx), a redutase do desidroascorbato (DHAR) e a redutase do radical monodesidroascorbato (MDHAR), em cujo tampão de extracção foi adicionado ascorbato para evitar a sua inactivação (Nakano e Asada 1987). Os extractos foram depois purificados por filtração em colunas de Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia, Freiburg, Alemanha) (Polle *et al.*, 1993).

A actividade da Apx, da MDHAR, da DHAR e da redutase da glutatona (GR) foi determinada tal como descrito em Polle e Morawe (1995). A actividade da dismutase do superóxido (SOD) foi medida tal como descrito em Polle *et al.* (1989) segundo Misra (1985) e a da catalase (Cat) segundo Aebi (1984).

As extracções e as leituras foram sempre realizadas no mesmo dia. As leituras de absorvância foram levadas a cabo num espectrofotómetro Shimadzu UV-160, Japão equipado com um sistema de controlo de temperatura e os valores de absorvância foram registados de 10 em 10 segundos. Foram analisados, no mínimo, três replicados de cada amostra. A actividade das enzimas foi calculada em unidades (U), utilizando a seguinte expressão:

$$U (\mu\text{mol min}^{-1}) = \Delta_{\text{Abs}}/\epsilon \times V/V_a \times F_c \times V_e \times 1/b \times 10^3$$

em que:

- Δ_{Abs} - variação de absorvância (nm min^{-1})
- ϵ - coeficiente de extinção da substância a ser medida ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
- V - volume total na cuvete (μL)
- V_a - volume de extracto (μL)
- F_c - factor de diluição devido à purificação das amostras nas colunas
- V_e - volume de extracção (L)
- b - espessura da célula de leitura (cm)

Uma unidade de enzima (U) é definida como sendo igual a uma micromole de substrato transformada em produto por minuto ($U = 1 \mu\text{mol substrato min}^{-1}$). O katal (kat) é a unidade do sistema internacional para definir a actividade enzimática em que $1U = 16.67 \text{ nkat}$ (Gul *et al.* 1998).

Obtenção dos extractos foliares para medição da actividade das enzimas peroxidase do ascorbato (Apx), redutase do desidroascorbato (DHAR) e redutase do radical mono desidroascorbato (MDHAR)

Os extractos foliares obtiveram-se após maceração do material foliar em azoto líquido. Ao material vegetal, ainda congelado, adicionou-se um pouco de PVPP e de areia do mar. A extracção foi levada a cabo em tampão fosfatos de potássio pH 7.8, 100 mM, com 2% de Triton x-100 e 10 mM de ascorbato, na proporção de 500 mg de material vegetal para 5 mL de

tampão de extracção. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 49000 x g (Beckman J2-MC, rotor de ângulo fixo JA-20.1) durante 30 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi removido por decantação e mantido no gelo. Os extractos foliares foram purificados em colunas de Sephadex G-25. Depois de equilibrar as colunas com 20 mL de tampão fosfatos de potássio pH 7.0, 100 mM com 1 mM de ascorbato, passaram-se 2.5 mL de amostra que depois foi eluída com 3.5 mL do mesmo tampão. Os 6 mL de extracto obtido foram mantidos no gelo até se proceder à sua leitura.

Obtenção dos extractos foliares para medição da actividade das enzimas redutase da glutathiona (GR), catalase (Cat) e dismutase do superóxido (SOD)

Os extractos foliares obtiveram-se após maceração do material foliar em azoto líquido. Ao material vegetal ainda congelado adicionou-se um pouco de PVPP e de areia do mar. A extracção foi levada a cabo em tampão fosfatos de potássio, pH 7.8, 100 mM, contendo 2% de Triton x-100, na proporção de 500 mg de material vegetal para 5 mL de tampão de extracção. O homogeneizado foi depois centrifugado a 49000 x g (Beckman J2-MC, rotor de ângulo fixo JA-20.1) durante 30 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi removido por decantação e mantido no gelo. Os extractos foliares foram purificados em colunas de Sephadex G-25. Depois de equilibrar as colunas com 20 mL de tampão fosfatos de potássio, pH 7.8, 20 mM, passaram-se 2.5 mL de amostra que depois foi eluída com 3.5 mL do mesmo tampão. Os 6 mL de extracto obtido foram mantidos no gelo até se proceder à sua leitura.

Medição da actividade da peroxidase do ascorbato (Apx)

A actividade da Apx foi medida a 25°C em 1 mL de mistura reaccional seguindo o decréscimo da absorvância a 290 nm, resultante do consumo do ascorbato devido à sua oxidação a desidroascorbato por acção do peróxido de hidrogénio, durante 3 minutos. O meio de reacção era composto por 600 µL de água miliQ, 100 µL de tampão fosfatos de potássio 500 mM pH7, 100 µL de ascorbato 800 µM e 50 µL de extracto. A reacção foi iniciada com 150 µL de peróxido de hidrogénio 20 mM e os valores de absorvância foram registados de dez em dez segundos durante três minutos. Para cada amostra foi feito um controlo no qual o extracto foi substituído por volume igual de tampão fosfatos de potássio pH 7.0, 100 mM. A actividade da Apx foi calculada depois de ter sido subtraída a taxa do controlo, tendo-se utilizado o coeficiente de extinção $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Uma unidade de Apx é equivalente à quantidade de proteína necessária para catalisar a oxidação de 1 µmole de ascorbato por minuto.

Medição da actividade da reductase do desidroascorbato (DHAR)

A actividade da DHAR foi medida a 25°C em 1 mL de mistura reaccional seguindo o aumento da absorvância a 265 nm, devida à formação de ascorbato resultante da reacção de redução do desidroascorbato a ascorbato por acção da GSH (glutathiona na forma reduzida), durante 3 minutos. A mistura reaccional compôs-se por 700 µL de água miliQ, 100 µL de tampão fosfatos de potássio 600 mM, pH 6.1, 100 µL de desidroascorbato 8 mM e 50 µL de extracto. A reacção foi iniciada com 50 µL de uma solução 20 mM de GSH. Para cada amostra foi feito um controlo em que o extracto foi substituído por tampão fosfatos de potássio pH 7.0, 100 mM. Os valores de absorvância foram registados de dez em dez segundos e a actividade da DHAR foi calculada depois de ter sido subtraída a taxa do controlo, tendo-se utilizado o coeficiente de extinção 14 mM⁻¹cm⁻¹. Uma unidade de DHAR é equivalente à quantidade de proteína necessária para catalisar a redução de 1 µmole de desidroascorbato por minuto.

Medição da actividade da reductase do radical mono desidroascorbato (MDHAR)

A actividade da MDHAR foi medida a 25°C em 1 mL de mistura reaccional seguindo durante 3 minutos o decréscimo de absorvância a 340 nm, devido ao consumo do NADH na reacção de redução de radicais monodesidroascorbato (MDHA) a ascorbato na presença de ascorbato e de ascorbato oxidase (Roche). Foi utilizada ascorbato oxidase (AAO) com vista à produção do MDHA a partir de ascorbato. Antes das medições de actividade da MDHAR foi preparada, de fresco, uma solução de AAO em acetato de sódio pH 6.2, 200 mM na proporção de 1 mg AAO em 20 mL de acetato de sódio. A actividade da AAO foi depois avaliada seguindo o decréscimo da absorvância a 290 nm, resultado da oxidação do ascorbato a MDHA ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), em 1 mL de meio reaccional contendo 100 mM Tricina/NaOH, pH 8.0 com 200 µM de NADH e 800 µM de ascorbato. A diluição da solução de AAO na mistura de reacção foi sempre de modo a obter 7 nkat⁶ de actividade enzimática. Deste modo, 1 mL de mistura reaccional para medição da actividade enzimática da MDHAR compôs-se de 50 µL de extracto foliar, 50 µL de ascorbato 800 µM em Tricina/NaOH e o volume de solução de AAO necessário à obtenção de uma actividade de 7 nkat. A esta mistura adicionou-se Tricina/NaOH 100 mM pH 8 até perfazer o volume total de 1mL. Os valores de absorvância foram registados de dez em dez segundos durante 3 minutos. Para cada amostra realizou-se um controlo em que se substituiu o extracto por tampão fosfatos de potássio pH

⁶ nkat = nanokatal; o katal (kat) é a unidade de medição da actividade enzimática do sistema internacional (SI); 1 kat = 60 mol min⁻¹ = 6 x 10⁷ U; 1 U = 16.67 nkat;

7.0, 100 mM. A actividade da MDHAR foi calculada depois de ter sido subtraída a taxa do controlo, tendo-se utilizado o coeficiente de extinção $6.12 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Uma unidade de MDHAR é equivalente à quantidade de proteína necessária para catalisar a oxidação de 1 μmole de NADH por minuto.

Medição da actividade da reductase da glutathiona (GR)

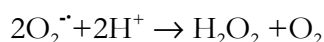
A actividade da GR foi medida a 25°C durante 3 minutos em 1 mL de mistura reaccional, seguindo o decréscimo de absorvância a 340 nm devido à oxidação do NADPH a NADP na reacção de redução da forma oxidada da glutathiona (GSSG) à forma reduzida (GSH) catalizada pela GR. A mistura reaccional compôs-se por 700 μL de tampão Hepes pH 8.0 com 0.5 mM EDTA, 100 μL de NADPH 2.5 mM, 100 μL de GSSG 5 mM em tampão Hepes e 100 μL de extracto foliar. Para cada amostra foi feito um controlo em que o extracto foi substituído por tampão fosfatos de potássio pH 7.8, 20 mM. Os valores de absorvância foram registados de dez em dez segundos, durante 3 minutos, e a actividade da GR foi calculada depois de ter sido subtraída a taxa do controlo, tendo-se utilizado o coeficiente de extinção $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Uma unidade de GR é equivalente à quantidade de proteína necessária para catalisar a oxidação de 1 μmole de NADPH por minuto.

Medição da actividade da catalase (Cat)

A actividade da catalase foi medida a 25°C em 1 mL de mistura reaccional seguindo, durante 3 minutos, o decréscimo de absorvância a 240 nm devido à redução do peróxido de hidrogénio a água e oxigénio molecular. O meio de reacção era composto por 720 μL de tampão fosfatos de potássio 50 mM, pH 7.0, 250 μL de peróxido de hidrogénio 40 mM e 30 μL de extracto, tendo a reacção sido iniciada com a adição do peróxido de hidrogénio. Para cada amostra foi feito um controlo no qual o peróxido de hidrogénio foi substituído por volume igual de tampão fosfatos de potássio 50 mM, pH 7.0. Os valores de absorvância foram registados de dez em dez segundos e a actividade da Cat foi calculada depois de ter sido subtraída a taxa do controlo, tendo-se utilizado o coeficiente de extinção $39.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Uma unidade de catalase é equivalente à quantidade de proteína necessária para decompor 1 μmole de H_2O_2 por minuto.

Medição da actividade da dismutase do superóxido (SOD)

A SOD catalisa a dismutação dos radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), de acordo com a seguinte reacção:



A epinefrina é estável em meio ácido mas, a pH elevado, auto-oxida a adrenocromio. A pH 10.2 e a 30°C a auto-oxidação da epinefrina é rápida e apresenta uma taxa linear após uma fase lag inicial e curta. A conversão da epinefrina a adrenocromio depende da existência do superóxido, pelo que é inibida pela SOD. A taxa à qual a SOD induz o decréscimo desta reacção dependente do superóxido pode ser calculada e dá uma medida indirecta da actividade da enzima. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária a 50% de inibição da taxa de conversão da epinefrina a adrenocromio.

A actividade da SOD foi medida em 1 mL de mistura reaccional a 30°C seguindo, durante 3 minutos, o decréscimo de absorvância a 480 nm devido à auto-oxidação da epinefrina. Foi efectuada uma solução 20 mM epinefrina em HCl 0,01 N. Num meio de reacção composto por 900 μ L de tampão carbonatos de sódio 62.5 mM, pH10.4, com 0.125 mM EDTA e 85 μ L de tampão fosfatos de potássio foram colocados 15 μ L da solução de epinefrina de modo a obter uma taxa de auto-oxidação de 0.025 ± 0.003 (nm min⁻¹). Após ter sido atingida esta taxa de auto-oxidação parte do tampão fosfatos de potássio foi substituído por amostra e os valores de absorvância foram registados de 10 em 10 segundos, de modo a poder calcular-se a nova taxa de auto-oxidação. A actividade da SOD foi determinada com base nos seguintes cálculos:

$$PI = 1 - A/E$$

PI - fracção de inibição pela SOD

E - variação da absorvância no meio de reacção com epinefrina (nm min⁻¹)

A - variação da absorvância no meio de reacção com epinefrina e com extracto (nm min⁻¹)

O valor da PI é depois utilizado no cálculo do volume, em μ L, de extracto necessário para que haja 50% inibição da auto-oxidação da adrenalina ($VE_{50\%}$):

$$VE_{50\%} (\mu L) = 0.5 \times V_a / PI$$

V_a - volume de extracto (μ L)

PI - percentagem de inibição

O número de unidades de SOD (U_{SOD}) por mililitro de extracto será dado pela expressão:

$$U_{SOD} (U mL^{-1}) = 1000 / VE_{50\%}$$

2.6. Análise estatística

Os dados referentes aos diferentes regimes hídricos estudados foram submetidos a análises de variância a um critério (ANOVA) ($\alpha = 0.05$) depois de testados para a distribuição normal e para a homogeneidade da variância. Sempre que se obteve um F significativo ($P < 0.05$), o nível de significância das diferenças existentes entre as médias foi avaliado pelo teste de comparação múltipla de Dunnett, comparando as médias de cada um dos tratamentos por déficit hídrico e rehidratação com a média do controlo, constituído pelas plantas bem hidratadas. Nos casos em que ocorreu heterogeneidade da variância foi utilizado teste de Kruskal-Wallis para análise não paramétrica, seguido do teste comparação múltipla de Dunnett. Nos Capítulos 3 e 4 realizou-se ainda o teste t de Student para comparar as médias obtidas de madrugada e a meio do dia, ou ainda para comparar as médias entre as folhas jovens e as folhas maduras (Capítulo 3) ou entre as plantas mantidas a alta irradiância e as transferidas para baixa irradiância (Capítulo 4). Utilizou-se o ‘software’ SigmaStat 3.0/SigmaPlot 8.0 (SPSS Inc., EUA) para o tratamento estatístico e representação gráfica dos dados.

2.7. Referências Bibliográficas

- Abadía J., Abadía A. (1993). Iron and plant pigments. In Barton L. L., Hemming B. (ed.) *Iron chelation in plants and soil microorganisms*. Academic Press Inc, Nova Iorque, p. 327-343.
- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in enzymology*, **105**: 121-126.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (1990). *Current protocols in molecular biology*. Vol. 2., John Wiley and Sons, Nova Iorque.
- Björkman O., Demmig B. (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origin. *Planta*, **170**: 489-504.
- Blokhina O. B., Fagerstedt K. V., Chirkova T. V. (1999). Relationships between lipid peroxidation and anoxia tolerance in a range of species during post-anoxic reoxygenation. *Physiologia Plantarum*, **105**: 625-632.
- 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.
- Cornic G. (1994). Drought stress and high light effects on leaf photosynthesis. In: N. R. Baker e J. R. Bowyer (eds.). *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, p. 297-313.
- de las Rivas J., Abadía A., Abadía J. (1989). A new reversed phase-HPLC method resolving all major higher plant photosynthetic pigments. *Plant Physiology*, **91**: 190-192.

- Delieu T., Walker D. A. (1981). Polarographic measurement of photosynthetic O₂ evolution by leaf discs. *New Phytologist*, **89**: 165-175.
- 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 et Biophysica Acta*, **990**: 87-92.
- Gul S., Sreedharan S. K., Brocklehurst K. (1998). Enzyme assays. Essential data. In Rickwood D., Hames B. D. (eds.) *Essential Data Series*. John Wiley and Sons, Nova Iorque.
- Hatterscheid G., Willenbrink J. (1991). Mikoplattenleser zur enzymatischen zuckerbestimmung. *BioTec Analytik*, **4**: 46-48.
- Hoagland D. R., Snyder W. C. (1933). Nutrition of strawberry plants under controlled conditions. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, **30**: 288-296.
- 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*, **207**: 604-611.
- Jones G. K., Outlaw Jr W. H., Lowry O. H. (1977). Enzymic assay of 10⁻⁷ to 10⁻¹⁴ moles of sucrose in plant tissues. *Plant Physiology*, **60**: 379-383.
- Krall J. P., Edwards G. E. (1992). Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves. *Physiologia Plantarum*, **86**: 180-187.
- Lichtenthaler H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*, **148**: 349-382.
- Misra H. P. (1985). Adrenochrome assay for superoxide dismutase. In Greenwald R. A. (ed.) *CRC Handbook of methods for oxygen radical research*, FL, p. 237-241.
- Nakano Y., Asada K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; Its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiology*, **28**: 131-140.
- Paech C., Dybing C. D. (1986). Purification and degradation of ribulose bisphosphate carboxylase from soybean leaves. *Plant Physiology*, **81**: 97-102.
- Pankovic D., Sakac Z., Kevresan S., Plesnicar M. (1999). Acclimation to long-term water deficit in the leaves of two sunflower hybrids: photosynthesis, electron transport and carbon metabolism. *Journal of Experimental Botany*, **50**: 127-138.
- Polle A., Krings B., Rennenberg H. (1989). Superoxide dismutase activity of norwegian spruce trees (*Picea abies* L.). *Plant Physiology*, **90**: 1310-1315.
- Polle A., Pfirrmann T., Chakrabarti S., Rennenberg H. (1993). The effects of enhanced ozone and enhanced carbon dioxide concentrations on biomass, pigments and antioxidative enzymes in spruce needles (*Picea abies* L.). *Plant Cell and Environment*, **16**: 311-316.

- Polle A., Morawe B. (1995). Seasonal changes of the antioxidative systems in foliar buds and leaves of field-grown beech trees (*Fagus sylvatica*, L.) in a stressful climate. *Botanica Acta*, **108**: 314-320.
- Quick W. P., Shurr U., Scheibe R., Schulze E.-D., Rodermeil S.R., Bogorad L., Stitt M. (1991). Decreased ribulose-1,5-biphosphate carboxylase oxygenase in transgenic tobacco transformed with 'antisense' rbc. I. Impact on photosynthesis in ambient growth conditions. *Planta*, **183**: 542-554.
- Riga P., Vartanian N. (1999). Sequential expression of adaptive mechanisms is responsible for drought resistance in tobacco. *Australian Journal of Plant Physiology*, **26**: 211-220.
- 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 Sciences of U.S.A.*, **52**: 119-125.
- Schreiber U., Bilger W. (1986). Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements. In Tenhunen J. D., Catarino F. M., Lange O. L., Oechel W. C. (ed.) *Plant response to stress: Functional analysis in Mediterranean Ecosystems*. Springer Verlag, Berlin. Vol. 615, p. 27-53.
- Schreiber U., Bilger W., Hormann H., Neubauer C. (1998). Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. In Raghavendra A. S. (ed.) *Photosynthesis. A comprehensive treatise*. Cambridge University Press, Londres, p. 320-336.
- Stitt M., Bulpin P. V., Ap Rees T. (1978). Pathway of starch breakdown in photosynthetic tissues of *Pisum sativum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **544**: 200-214.
- Stitt M., McLilley R., Gerhardt R., Heldt H. W. (1989). Determination of metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods in Enzymology*, **174**: 518-552.
- Taulavuori E., Hellstrom E.-K., Taulavuori K., Laine K. (2001). Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 2375-2380.
- van Kooten O., Snel J. F. H. (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress. *Photosynthesis Research*, **25**: 147-150.
- von Caemmerer S., Farquhar G. D. (1981). Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas Exchange of leaves. *Planta*, **153**: 376-387
- Walker, D. (1990). *The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis*. Robert Hill Institute, University of Sheffield, Reino Unido.

Capítulo 3

Efeitos da idade da folha na recuperação da fotossíntese de *Helianthus annuus* L. após um ciclo de desidratação e rehidratação

3.1. Introdução

O défice hídrico tem efeitos potencialmente dramáticos no crescimento e na morfogénese das plantas e afecta diferentes vias metabólicas, entre elas a fotossíntese. Diversos estudos se têm debruçado sobre os efeitos dos défices hídricos na actividade fotossintética de folhas completamente desenvolvidas, mas o debate sobre a importância relativa das limitações estomáticas e das limitações metabólicas que lhe são impostas persiste.

A diminuição da abertura estomática é uma das primeiras respostas ao défice hídrico, sendo induzida por sinais químicos enviados pelas raízes cujas células tenham perdido turgidez por se encontrarem num substrato pouco hidratado (Davies e Zhang 1991). No entanto, enquanto autores como Cornic e Fresnau (2002) concluíram que as respostas ao défice hídrico são quase exclusivamente estomáticas, outros, como Tang *et al.* (2002) propuseram a existência de uma combinação de efeitos estomáticos e não estomáticos; há ainda quem defenda que, sob défice hídrico ligeiro ou moderado, as limitações impostas à fotossíntese são essencialmente estomáticas, e que as limitações ao nível do mesófilo surgem apenas para níveis mais elevados de desidratação dos tecidos, correspondentes a défices hídricos severos (Cornic 2000, Flexas e Medrano 2002a). Na verdade, as limitações à aquisição de CO₂, impostas pela diminuição da condutância estomática, podem também resultar em limitações metabólicas à actividade fotossintética, na medida em que conduzem ao decréscimo do consumo de NADPH e de ATP, o que implica a inibição em 'feedback' da sua síntese e o favorecimento da redução directa do oxigénio (Tausz *et al.* 2004), e que poderia explicar, em alguma medida, as disparidades nos resultados obtidos pelos diferentes autores. No entanto, diversos estudos, em que na metodologia se procurou minimizar, ou mesmo eliminar, o efeito exercido pelos estomas, apontam para a ocorrência de limitações à actividade fotossintética ao nível do mesófilo na sequência da imposição de défice hídrico. Esses estudos foram realizados com material diverso como algas (Davison e Pearson 1996, Kawamitsu *et al.* 2000), que não possuem estomas, cloroplastos isolados (Boyer e Bowen 1970), fragmentos foliares (Tang *et al.* 2002) e plantas inteiras (Boyer 1971, Tezara *et al.* 1999). Em 1971 Boyer propôs que o decréscimo da actividade fotossintética em folhas de *Helianthus annuus* sob défice hídrico ($\psi = -1.2$ MPa) tivesse sido consequência da diminuição da actividade fotoquímica e, em 1999, Tezara *et al.* observaram, na mesma espécie em défice hídrico (-2.0 MPa $< \psi < -1.5$ MPa), que a taxa fotossintética não foi limitada unicamente pela difusão do dióxido de carbono, mas também pela inibição da síntese da ribulose-1,5-bifosfato, devida ao declínio da síntese de ATP. Sabe-se também que a diminuição da actividade fotossintética em plantas sujeitas aos

défices hídricos mais intensos pode ocorrer devido à diminuição da permeabilidade do mesófilo à difusão do CO₂ (Chaves 1991).

Nas plantas em défice hídrico aumenta a formação de espécies reactivas de oxigénio (Biehler e Fock 1996, Boo e Jung 1999, Mascher *et al.* 2005). Se por um lado estas formas reduzidas do oxigénio podem ter um efeito negativo ao promover a oxidação de lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, diminuindo assim o vigor das plantas, é cada vez mais evidente que possuem também um papel decisivo como sensores e sinalizadores internos das variações ambientais (Foyer e Noctor 2005). As espécies reactivas de oxigénio possuem um grande poder oxidativo e a sua produção e eliminação têm de ser reguladas, sendo conhecidos diversos tipos de compostos que intervêm nesses processos (Demmig-Adams e Adams III 1996, Asada 1999, Niyogi 2000, Foyer e Noctor 2003, Foyer e Noctor 2005). A fotossíntese é uma das maiores fontes de espécies reactivas de oxigénio, cuja formação aumenta em situações em que a energia de excitação é superior à capacidade de utilização (Foyer e Noctor 2003). Os carotenóides, além de participarem na captura de fotões nas antenas associadas aos fotossistemas (Lichtenthaler 1987, Römer 1999, Niyogi 2000), desempenham um papel de relevo na dissipação de energia em excesso, contribuindo para o ‘quenching’ não fotoquímico (NPQ), quer através da inactivação do tripleto da clorofila (${}^3\text{Chl}^*$) e eliminação do singlete do oxigénio (${}^1\text{O}_2^*$) e de outras espécies reactivas de oxigénio (Choudhury e Behera 2001, Niyogi 2000), quer através da dissipação do excesso de energia de excitação sob a forma de calor através do ciclo de desepoxidação da violaxantina a anteraxantina e zeaxantina (Demmig-Adams e Adams III 1996, Niyogi 2000). A luteína (Pogson *et al.* 1998, Li *et al.* 2002), o β -caroteno (Choudhury e Behera 2001) e a neoxantina (Jung 2004) encontram-se entre os carotenóides que participam na inactivação do tripleto da clorofila e na eliminação das espécies reactivas de oxigénio. A peroxidação dos lípidos das membranas, com formação de dialdeído malónico (MDA) como produto final secundário, constitui uma das consequências conhecidas da acção das espécies reactivas de oxigénio (Hodges *et al.* 1999). A abundância de MDA nos tecidos não sofre alterações a não ser que se verifique stresse oxidativo (Weber *et al.* 2004).

Foi demonstrado que em plantas sob défice hídrico ocorre o decréscimo do teor foliar em ATP (Tezara *et al.* 1999), a diminuição da taxa de regeneração da ribulose bifosfato (RuBP) (Gunasekera e Berkowitz 1993, Pankovic *et al.* 1999, Tezara *et al.* 1999) e a diminuição da actividade da RuBisCO (Pankovic *et al.* 1999). O decréscimo da utilização de ATP e de NADPH na fotossíntese e a diminuição da taxa de regeneração da RuBP poderão estar relacionadas com a acumulação de açúcares solúveis, já que esta implica a redução da disponibilidade de fósforo inorgânico no estroma (Azcón-Bieto 1983), havendo também

fortes evidências experimentais de que a sacarose, e sobretudo a glucose, reprimem a expressão de alguns genes relacionados com a actividade fotossintética (Sheen 1990). Segundo alguns autores a acumulação de açúcares solúveis parece conferir maior tolerância à desidratação (Pelah *et al.* 1997, David *et al.* 1998), contribuindo para a manutenção da turgidez celular, para a protecção da integridade das membranas celulares (Ingram e Bartels 1996, Hoekstra *et al.* 2001, Chaves *et al.* 2003) e ainda para a manutenção da estrutura das proteínas e da actividade enzimática em tecidos desidratados (Ingram e Bartels 1996, Hoekstra *et al.* 2001).

Muitas das discrepâncias encontradas nas respostas ao défice hídrico podem estar relacionadas com diferenças entre as espécies vegetais, com o tipo de material biológico utilizado nos trabalhos, que varia entre cloroplastos isolados (Boyer e Bowen 1970), fragmentos foliares (Tang *et al.* 2002) ou plantas inteiras (Boyer 1971, David *et al.* 1998, Tezara *et al.* 1999, Calatayud *et al.* 2000), com a duração da imposição e o modo como é imposto o défice hídrico, por diminuição gradual da dotação de rega (David *et al.* 1998, Calatayud *et al.* 2000) ou por corte súbito do fornecimento de água (Tang *et al.* 2002), e ainda com a idade das folhas estudadas (David *et al.* 1998, Calatayud *et al.* 2000, Jung 2004).

Diversos estudos, em várias espécies, mostraram que as folhas maduras (completamente expandidas) são mais afectadas pelo défice hídrico do que as folhas jovens (em expansão) (Calatayud *et al.* 2000, Jung 2004), possuindo estas últimas defesas antioxidantes mais eficazes (Bowler *et al.* 1992, Havaux *et al.* 2000). No entanto pouco se sabe sobre o efeito da rehidratação em cada uma daquelas idades foliares.

A capacidade de recuperação da actividade fotossintética após o alívio do défice hídrico parece também estar dependente da idade das folhas, podendo ser superior nas folhas jovens (David *et al.* 1998). Autores como Navari-Izzo *et al.* (1995) propuseram que a imposição lenta do défice hídrico favorece a capacidade de recuperação das plantas durante o alívio do stresse.

Enquanto a diminuição da abertura estomática pode ser totalmente revertida pela rehidratação dos tecidos, o restabelecimento simultâneo do metabolismo fotossintético implica não só o retomar das condições de difusão do CO₂ mas também a recuperação de outros processos tais como a capacidade de regeneração da RuBP, onde se inclui a reactivação das enzimas do ciclo de Calvin e/ou da síntese de ATP e de NADPH. Há ainda a considerar que a rehidratação dos tecidos pode ter um efeito mais negativo sobre a integridade do aparelho fotossintético do que a desidratação em si, como revelaram os trabalhos de Kaiser (1987) e de Dreesmann *et al.* (1994).

O conjunto dos ensaios realizados, cujos resultados são apresentados neste capítulo, teve como objectivo investigar numa mesma espécie, o girassol (*Helianthus annuus*), a resposta dos mecanismos fotossintéticos à duração e intensidade do défice hídrico, em folhas jovens e maduras, e em que medida poderão afectar a capacidade de recuperação da fotossíntese durante a rehidratação.

3.2. Material e métodos

Para este estudo realizaram-se os ensaios com plantas de *H. annuus* referidos no capítulo 2 (Material e Métodos) como Gir99 e Gir02.

O ensaio Gir99 decorreu entre Maio e Julho de 1999 e constituiu uma primeira abordagem aos objectivos propostos tendo-se, por isso, efectuado uma gama de determinações menos abrangente do que nos ensaios que se seguiram. As plantas desenvolveram-se sob abrigo, numa estufa equipada com um sistema de controlo de temperatura máxima ajustado para 25°C. O crescimento das plantas decorreu sob condições de irradiância e fotoperíodo naturais, com irradiância máxima de 1300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O défice hídrico (DH) foi imposto gradualmente, 37 dias depois da sementeira, durante 12 dias, através da rega, pela reposição parcial das perdas de peso por evapotranspiração.

No ensaio Gir02 foram utilizadas as plantas que se desenvolveram e permaneceram na câmara de crescimento 'walk-in' durante a amostragem. Nesta câmara, as plantas cresceram com um fotoperíodo de 12h, uma irradiância máxima de 700 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura e humidade relativa diurnas de 25°C/60% e temperatura/humidade relativa nocturnas de 22°C/70%. Neste ensaio a imposição do défice hídrico teve lugar 19 dias depois da sementeira e consideraram-se dois níveis de défice hídrico: um, menos intenso e imposto durante nove dias (DHm); outro, mais intenso e prolongado, imposto durante quinze dias (DHs). Em ambos os casos o défice hídrico foi aplicado através da rega, pela reposição parcial do peso perdido por evapotranspiração. As plantas testemunha (C) foram regadas sempre pela reposição integral do peso perdido por evapotranspiração. A rehidratação do substrato foi feita através de diversas regas de modo a garantir uma hidratação homogénea de todo o substrato contido nos vasos.

Em ambos os ensaios foram retiradas amostras de folhas jovens (J) e de folhas maduras (M) de plantas testemunha (C), em défice hídrico (DH, DHm, DHs), 24 h (R24) e/ou 48 h (R48) após o início da rehidratação do substrato. As folhas consideradas jovens na altura da amostragem completaram a sua expansão durante o ciclo de secagem, encontrando-se completamente expandidas no período de amostragem. No ensaio Gir99 a

posição na planta das folhas consideradas jovens, por contagem acrópeta, foi 10.6 ± 0.9 , 9.4 ± 1.1 e 10.2 ± 0.8 para as plantas controlo, em défice hídrico e rehidratadas, respectivamente, num total de cerca de 17 folhas por planta (valores apresentados sob a forma de média mais ou menos desvio padrão). No ensaio Gir02 a posição destas folhas na planta, por contagem acrópeta, correspondia a 6.2 ± 0.4 num total de 10.8 ± 0.6 folhas e 5.9 ± 0.3 num total de 10.3 ± 0.7 para as plantas controlo e no nível de défice hídrico menos intenso, 7.4 ± 0.5 em 14.4 ± 0.9 folhas, 6.9 ± 0.6 em 13.8 ± 1.2 folhas e 8.0 ± 0.5 em 16.3 folhas para as plantas em défice hídrico mais severo, 24 h e 48 h depois da rehidratação do substrato, respectivamente (valores apresentados sob a forma de média mais ou menos desvio padrão). As folhas maduras já se encontravam em expansão no início da imposição do défice hídrico e a sua posição na planta, por contagem acrópeta, no ensaio Gir99 foi 6.0 ± 0.7 , 6.2 ± 0.4 e 6.8 ± 0.5 para as plantas controlo, em défice hídrico e rehidratadas, respectivamente, num total de cerca de 17 folhas por planta (valores apresentados sob a forma de média mais ou menos desvio padrão). No ensaio Gir02 correspondeu a 3.0 ± 0.0 em 10.8 ± 0.6 folhas e 3.0 ± 0.0 em 10.3 ± 0.7 folhas para as plantas controlo e em défice hídrico menos intenso, 3.8 ± 0.6 em 14.4 ± 0.9 folhas, 3 ± 0 em 13.8 ± 1.2 folhas e 4.0 ± 0.0 em 16.3 ± 0.8 folhas para as plantas em défice hídrico mais severo, 24 h e 48 h depois da rehidratação do substrato, respectivamente (valores apresentados sob a forma de média mais ou menos desvio padrão).

A caracterização do estado hídrico das plantas, a determinação da massa específica foliar (SLM), a medição das trocas gasosas em condições ambiente e da capacidade fotossintética, assim como a quantificação do teor foliar em açúcares solúveis, amido, clorofila total, proteína solúvel e dialdeído malónico (MDA) foram realizadas tal como descrito no capítulo 2, bem como o tratamento estatístico dos dados.

3.3. Resultados

Caracterização do estado hídrico das plantas e massa foliar específica.

Não foram observadas diferenças significativas no potencial hídrico entre folhas jovens e maduras nos dois ensaios, nem entre o teor relativo em água foliar (TRA) no ensaio realizado em 1999 (Gir99) pelo que, nestes casos, os resultados das duas idades foliares são apresentados em conjunto na Tabela III.1. A imposição gradual do défice hídrico no substrato resultou no decréscimo significativo do potencial hídrico foliar de madrugada (Ψ_{pd}) e a meio do dia (Ψ_{md}), em ambos os ensaios (Tabela III.1). O decréscimo do potencial hídrico foi acompanhado pela diminuição significativa do teor relativo em água no ensaio Gir99 e no

nível mais intenso de déficit hídrico do ensaio realizado em 2002, tendo-se mantido acima dos 80% no nível de stresse menos intenso. As folhas maduras atingiram TRA significativamente inferior ao das folhas jovens das plantas submetidas ao stresse mais severo (Gir02), apesar de não se terem observado diferenças no potencial hídrico foliar, quer de madrugada quer a meio do dia.

Tabela III.1 – Potencial hídrico foliar de madrugada (Ψ_{pd}) e a meio do dia (Ψ_{md}) e teor relativo em água (TRA) em plantas de *H. annuus* controlo (C), em déficit hídrico (DH) moderado (DHm) e severo (DHs), 24 h (R24) e 48 h (R48) depois da rehidratação do substrato nos ensaios realizados em 1999 (Gir99) e em 2002 (Gir02). Valores médios \pm erro padrão (Gir99: n = 5 excepto em TRA em que n=10; Gir02: n=5 em Ψ_{pd} e n = 10 em Ψ_{md} ; n =5 em TRA). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico relativamente ao controlo (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$). O número (1) indica diferenças significativas entre as médias de Ψ_{pd} e Ψ_{md} ou entre as duas idades foliares (teste *t* de Student, $\alpha = 0.05$).

Ensaio	Regime hídrico	Ψ_{pd} (MPa)	Ψ_{md} (MPa)	TRA (%)	
Gir99	C	-0.10 \pm 0.01	--	89.9 \pm 0.7	
	DH	-0.37* \pm 0.04	--	74.5* \pm 3.5	
	R48	-0.20* \pm 0.01	--	81.6* \pm 1.0	
		Ψ_{pd} (MPa)	Ψ_{md} (MPa)	folhas jovens	folhas maduras
Gir02	C	-0.07 \pm 0.01	-0.33 ¹ \pm 0.02	85.9 \pm 1.4	89.0 \pm 0.9
	DHm	-0.32* \pm 0.04	-0.64* ¹ \pm 0.04	83.0 \pm 1.6	86.3 \pm 1.5
	DHs	-0.88* \pm 0.06	-1.39* ¹ \pm 0.04	69.2* \pm 1.7	61.3* ¹ \pm 2.2
	R24	-0.39* \pm 0.02	-0.49* ¹ \pm 0.02	88.4 \pm 0.7	89.5 \pm 0.7
	R48	-0.39* \pm 0.03	-0.51* ¹ \pm 0.07	84.9 \pm 1.5	89.8 \pm 0.6

Tabela III.2 – Massa específica foliar (SLM) em plantas de *H. annuus* controlo (C), sujeitas a déficit hídrico (DH) moderado (DHm) e severo (DHs) e 24 (R24) e 48 (R48) horas após a rehidratação do substrato nos ensaios realizados em 1999 (Gir99) e em 2002 (Gir02). Valores médios \pm erro padrão (n = 5). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo, (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$). O número (1) indica diferenças significativas entre as médias das duas idades foliares (teste *t* de Student, $\alpha = 0.05$)

Ensaio	Regime hídrico	SLM (g _{ps} /m ²)	
		folhas jovens	folhas maduras
Gir99	C	25.6 \pm 2.4	26.3 \pm 0.7
	DH	31.6* \pm 1.2	26.7 ¹ \pm 1.6
	R48	30.4 \pm 1.1	26.9 \pm 2.0
Gir02	C	27.9 \pm 0.5	28.1 \pm 0.8
	DHm	30.6 \pm 0.8	29.1 \pm 0.9
	DHs	40.1* \pm 1.4	38.0* \pm 2.4
	R24	36.2* \pm 1.2	37.3* \pm 0.5
	R48	34.3* \pm 1.9	32.2 \pm 0.8

Quarenta e oito horas depois da rehidratação do substrato, Ψ_{pd} e Ψ_{md} recuperaram parcialmente e TRA recuperou completamente para os valores observados nas plantas controlo, no ensaio Gir02 (Tabela III.1). Em Gir99 observou-se uma recuperação parcial de

Ψ_{pd} . Apesar de Ψ_{md} não ter sido medido no ensaio Gir99, as determinações do teor relativo em água dão a indicação de que 48 h depois da rehidratação já se verificava alguma recuperação do estado hídrico das plantas (Tabela III.1).

A massa específica foliar (SLM, Tabela III.2) aumentou significativamente nas folhas jovens das plantas em défice hídrico no ensaio Gir99 e em ambas as idades foliares em défice hídrico mais severo no ensaio Gir02. Não se observaram alterações significativas de SLM nas plantas submetidas a défice hídrico moderado em 2002. Ao fim de 48h de rehidratação, SLM recuperou para valores semelhantes aos das folhas controlo em todos os casos.

Trocas gasosas

O défice hídrico induziu uma diminuição significativa da condutância estomática para o vapor de água (g) nos dois ensaios e em ambas as idades foliares, excepto nas folhas maduras em défice hídrico moderado em Gir02 (Fig. 3.1). Enquanto no ensaio Gir99 e no nível mais intenso de défice hídrico de Gir02 g atingiu em ambas as idades foliares valores médios muito baixos, inferiores a $80 \text{ mmol}_{\text{H}_2\text{O}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, nas plantas Gir02 sob stresse menos intenso a condutância estomática média não atingiu valores inferiores a $240 \text{ mmol}_{\text{H}_2\text{O}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mas que, ainda assim corresponderam a um decréscimo de 33% nas folhas jovens e de 27% nas folhas maduras. Foi também neste nível de stresse que a fotossíntese líquida (NP) foi menos afectada pelo défice hídrico (Fig. 3.1). No ensaio Gir99 e no nível mais intenso de défice hídrico do ensaio Gir02 a diminuição de g foi acompanhada pela diminuição de NP, mais acentuada nas folhas maduras, nas quais atingiu valores negativos (Fig. 3.1). No ensaio Gir99, apesar de o decréscimo de NP relativamente ao controlo ter sido estatisticamente significativo apenas nas folhas maduras, as diminuições das médias foram expressivas em ambas as idades foliares, 43% nas folhas mais jovens e de 154% nas folhas maduras (Fig. 3.1). Nas plantas sob défice hídrico mais intenso no ensaio Gir02 o decréscimo de NP foi também bastante acentuado, tendo rondado os 77% nas folhas jovens e 108% nas folhas maduras (Fig. 3.1).

A restrição à aquisição de CO_2 , decorrente da diminuição de g observada nas folhas jovens e maduras em défice hídrico no ensaio Gir99, não parece ter sido limitante para o processo fotossintético uma vez que a pressão parcial de CO_2 nos espaços intercelulares (C_i) não diminuiu nas folhas jovens e aumentou significativamente nas folhas maduras (27%; Fig. 3.1). A pressão parcial de CO_2 nos espaços intercelulares também não se alterou nas folhas jovens e maduras sob défice hídrico moderado do ensaio Gir02, relativamente às folhas bem hidratadas. No mesmo ensaio (Gir02), os decréscimos de NP observados em ambas as idades

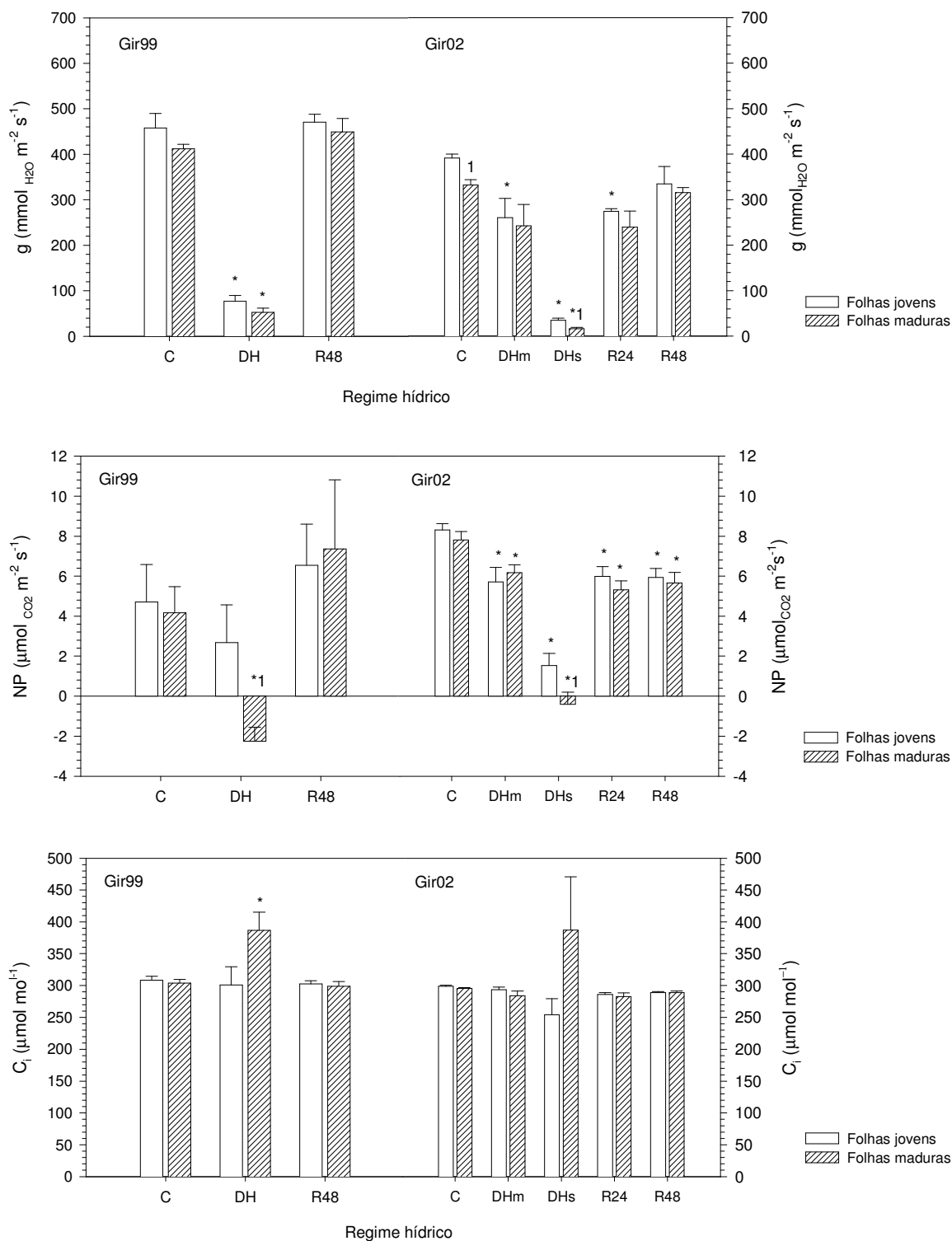


Figura 3.1 - Condutância estomática para o vapor de água (g), taxa de fotossíntese por unidade de área foliar (NP) e pressão parcial de dióxido de carbono nos espaços intercelulares (C_i) em folhas de plantas *H. annuus* controle (C), em déficit hídrico (DH) moderado (DHm) e severo (DHs) e 24 (R24) e 48 (R48) horas após a rehidratação do substrato nos ensaios realizados em 1999 (Gir99) e em 2002 (Gir02). Valores médios \pm erro padrão ($n = 5$). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controle (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$). O número (1) indica diferenças significativas entre as médias dos dois níveis de idades foliares (teste t de Student, $\alpha = 0.05$).

foliares não foram acompanhados pela diminuição de C_i (Fig. 3.1). Tal como nas folhas maduras do ensaio Gir99, o registo de NP negativa nas folhas maduras sob o défice hídrico mais intenso em Gir02 foi acompanhado pelo aumento de C_i (33%; Fig. 3.1).

A reposição dos níveis adequados de água no substrato reflectiu-se na recuperação total de g, C_i e de NP no ensaio realizado em 1999 e na recuperação total de g e de C_i e parcial de NP no ensaio realizado em 2002 (Fig. 3.1).

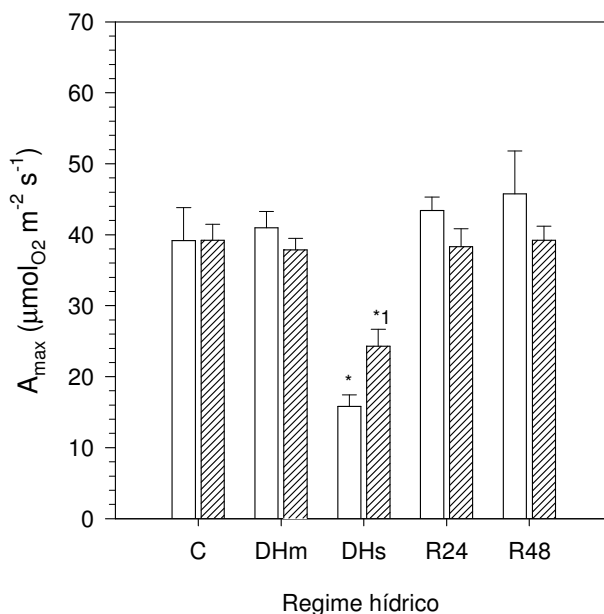


Figura 3.2 - Capacidade fotossintética (A_{max}) em folhas de plantas *H. annuus* controlo (C), em défice hídrico (DH) moderado (DHm) e severo (DHs) e 24 (R24) e 48 (R48) horas após a rehidratação do substrato no ensaio realizado em 2002 (Gir02). Valores médios \pm erro padrão ($n=5$). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnett, $\alpha= 0.05$). O número (1) indica diferenças significativas entre as médias dos dois níveis de idades foliares (teste t de Student, $\alpha= 0.05$).

No ensaio Gir02, os decréscimos de NP observados nas plantas submetidas ao défice hídrico mais moderado não se reflectiram em decréscimos na capacidade fotossintética (A_{max} , Fig. 3.2). Nas plantas submetidas ao défice hídrico mais severo observou-se o decréscimo significativo de A_{max} , nas folhas jovens (60%) e nas folhas maduras (38%), o que contrasta com os resultados obtidos para NP e C_i e aponta para limitações ao nível do mesófilo também nas folhas jovens. Depois da rehidratação do substrato, as folhas de ambas as idades recuperaram totalmente a capacidade fotossintética. No ensaio Gir99 não foi determinada a capacidade fotossintética.

Proteína solúvel, pigmentos e fluorescência da clorofila a

Os regimes hídricos não afectaram negativamente o conteúdo foliar em proteína solúvel (Tabela III.3), clorofila total e carotenóides totais (Tabela III.4) das plantas utilizadas no ensaio Gir99, não se tendo também registado diferenças significativas nestes parâmetros entre as duas idades foliares (Tabelas III.3 e III.4).

Tabela III.3 – Teor em proteína solúvel de folhas jovens e de folhas maduras de plantas de *H. annuus* controlo (C), em défice hídrico (DH) e 24 (R24) e 48 (R48) horas após a rehidratação do substrato nos ensaios realizados em 1999 (Gir99) e em 2002 (Gir02). Valores médios \pm erro padrão ($n = 5$). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$). O número (1) indica diferenças significativas entre as médias dos dois níveis de idades foliares (teste t de Student, $\alpha = 0.05$).

Ensaio	Regime hídrico	Proteína solúvel (g m ⁻²)	
		folhas jovens	folhas maduras
Gir99	C	4.475 \pm 0.163	3.473 \pm 0.282
	DH	5.256 \pm 0.371	4.171 \pm 0.654
	R48	5.320 \pm 0.403	4.452 \pm 0.485
Gir02	C	8.477 \pm 0.251	8.878 \pm 0.256
	DHm	7.858 \pm 0.297	8.171 \pm 0.474
	DHs	9.648 \pm 0.670	8.214 \pm 0.490
	R24	8.523 \pm 0.387	7.290* \pm 0.448
	R48	8.460 \pm 0.365	7.132 ¹ \pm 0.339

Tabela III.4 – Teor em clorofila total e em carotenóides de folhas jovens e de folhas maduras de plantas de *H. annuus* controlo (C), em défice hídrico (DH) e 24 (R24) e 48 (R48) horas após a rehidratação do substrato no ensaio realizado em 1999 (Gir99). Valores médios \pm erro padrão ($n = 5$). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$). O número (1) indica diferenças significativas entre as médias dos dois níveis de idades foliares (teste t de Student, $\alpha = 0.05$).

Ensaio	Regime hídrico	Clorofila total (mg m ⁻²)		Carotenóides totais (mg m ⁻²)	
		folhas jovens	folhas maduras	folhas jovens	folhas maduras
Gir99	C	517.7 \pm 23.4	433.9 \pm 30.9	95.0 \pm 4.5	80.2 \pm 5.3
	DH	605.5 \pm 33.8	536.2 \pm 73.7	112.7 \pm 8.2	106.5 \pm 15.1
	R48	521.6 \pm 29.9	486.6 \pm 69.5	95.7 \pm 3.8	95.2 \pm 11.4

No ensaio Gir02 o défice hídrico não impôs alterações significativas na concentração foliar em proteína solúvel em qualquer uma das idades foliares (Tabela III.3). Apesar disso, nas folhas mais velhas pôde notar-se um ligeiro decréscimo, que se acentuou após a rehidratação do substrato (Tabela III.3).

Embora o teor em clorofila total de madrugada (Tabela III.5) tenha aumentado significativamente nas folhas jovens em défice hídrico (30% no défice hídrico moderado e 36% no défice hídrico mais severo) no ensaio Gir02, a meio do dia esse aumento só se verificou nas plantas sob stresse mais intenso (52%). Neste ensaio, de madrugada, as folhas maduras das plantas controlo apresentaram um teor em clorofila total significativamente

superior ao das folhas jovens, mas o défice hídrico induziu a sua diminuição, que atingiu 18% nas plantas em stresse mais severo. A meio do dia, nas folhas maduras sob défice hídrico severo observou-se o aumento em 25% no teor em clorofila total, que se manteve nas primeiras horas de rehidratação (Tabela III.5). Durante a rehidratação do substrato ocorreu o retorno dos níveis de clorofila total para valores semelhantes aos das plantas controlo, excepto nas folhas maduras que, 48 h depois da rehidratação, de madrugada, apresentaram um teor em clorofila total, 22% inferior ao das plantas controlo (Tabela III.5).

O teor em β -caroteno, luteína, neoxantina e em carotenóides totais de madrugada aumentou, nunca menos de 20%, nas folhas jovens em défice hídrico, moderado e severo (Tabela III.5). Nestas folhas, o teor em β -caroteno atingiu o máximo (37% superior ao controlo) no nível mais intenso de défice hídrico, enquanto que o teor máximo em luteína foi atingido durante o stresse moderado (28% superior ao controlo) (Tabela III.5). Depois da rehidratação do substrato, todos estes carotenóides readquiriram valores semelhantes aos exibidos nas plantas controlo (Tabela III.5). Nas folhas maduras em stresse, de madrugada, o teor em β -caroteno, luteína, neoxantina e em carotenóides totais decresceu, tendo atingido o mínimo 48 h depois da rehidratação do substrato, que na luteína e nos carotenóides totais foi significativamente inferior ao das plantas controlo (28% e 24%, respectivamente; Tabela III.5). Apesar das diferenças na reacção ao défice hídrico e rehidratação, observadas entre as folhas jovens e as folhas maduras, os teores nestes carotenóides exibidos 48h depois da rehidratação foram semelhantes em ambas as idades o que evidencia o facto de, nas plantas bem regadas, as folhas maduras terem exibido teores superiores aos exibidos pelas folhas jovens (Tabela III.5).

A meio do dia, o teor em β -caroteno, luteína, neoxantina e em carotenóides totais aumentou significativamente nas folhas maduras submetidas ao stresse mais severo (38%, 32%, 37% e 29%, respectivamente; Tabela III.5). À mesma hora, nas folhas jovens, ocorreram também aumentos no teor destes pigmentos, 43% no β -caroteno, 26% na luteína, 20% na neoxantina e 30% nos carotenóides totais, embora só no β -caroteno tenham sido estatisticamente significativos (Tabela III.5). Em qualquer um dos casos, as folhas jovens readquiriram valores semelhantes aos das plantas controlo nas primeiras 24 h de rehidratação, enquanto que as folhas maduras só recuperaram 24 h depois (Tabela III.5).

O teor nos pigmentos do ciclo das xantofilas (violaxantina, anteraxantina e zeaxantina) não sofreu alterações significativas nas folhas jovens, nem de madrugada nem a meio do dia (Tabela III.5). Nas folhas maduras, de madrugada, o teor nestes pigmentos decresceu 31% nas

plantas sob stresse mais severo e não recuperou depois da rehidratação. A meio do dia não se registaram diferenças significativas no teor destes pigmentos nas folhas maduras (Tabela III.5).

De um modo geral, observou-se o aumento do teor em pigmentos nas folhas jovens das plantas controlo entre a madrugada e o meio-dia, mais significativos na clorofila total, β -caroteno e luteína (Tabela III.5). Nas folhas maduras verificou-se um decréscimo significativo em todos os pigmentos no mesmo intervalo de tempo (Tabela III.5). A imposição do défice hídrico alterou esta relação, tendo deixado de haver diferenças nos teores em pigmentos entre a madrugada e o meio-dia em ambas as idades foliares (Tabela III.5). Depois da rehidratação do substrato, o teor em carotenóides totais nas folhas jovens voltou a ser significativamente superior a meio do dia, em particular o teor em β -caroteno (Tabela III.5). Nas folhas maduras os teores em pigmentos mantiveram-se idênticos de madrugada e a meio do dia, mesmo depois de 48 h de rehidratação do substrato.

Tabela III.5 – Teor em clorofila total, β -caroteno, luteína, neoxantina, violaxantina (V) anteraxantina (A) e zeaxantina (Z), neoxantina e carotenóides totais de folhas jovens e maduras de madrugada e a meio do dia, em plantas de *H. annuus* (Gir02) controle (C), sob déficit hídrico moderado (DHm) e severo (DHs) e 24 (R24) e 48 (R48) horas depois da rehidratação do substrato. Valores médios \pm erro padrão (n = 5). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico à mesma hora e em folhas da mesma idade (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$). O número (1) indica diferenças significativas entre as médias das idades foliares (teste t de Student, $\alpha = 0.05$). A letra (L) indica diferenças significativas entre as médias obtidas a meio do dia e as médias obtidas de madrugada (teste t de Student, $\alpha = 0.05$).

Regime hídrico	Clorofila <i>a+b</i> ($\mu\text{mol m}^{-2}$)		β -caroteno ($\mu\text{mol m}^{-2}$)		Luteína ($\mu\text{mol m}^{-2}$)		Neoxantina ($\mu\text{mol m}^{-2}$)		V+A+Z ($\mu\text{mol m}^{-2}$)		Carotenóides totais ($\mu\text{mol m}^{-2}$)		
	Folhas jovens	Folhas maduras	Folhas jovens	Folhas maduras	Folhas jovens	Folhas maduras	Folhas jovens	Folhas maduras	Folhas jovens	Folhas maduras	Folhas jovens	Folhas maduras	
Madrugada	C	287.0 \pm 15.7	425.0 ^L \pm 26.5	32.2 \pm 1.6	47.5 ^L \pm 3.0	31.2 \pm 1.2	43.2 ^L \pm 2.8	6.70 \pm 0.37	8.93 ^L \pm 0.76	25.1 \pm 1.7	28.9 \pm 2.1	96.4 \pm 4.7	129.6 ^L \pm 8.6
	DHm	373.6* \pm 18.1	363.5 \pm 20.9	40.5 \pm 1.8	42.6 \pm 2.5	39.8* \pm 1.9	35.2 \pm 1.7	8.32 \pm 0.49	7.75 \pm 0.80	28.4 \pm 0.9	25.7 \pm 0.8	118.1* \pm 4.5	112.7 \pm 5.4
	DHs	390.4* \pm 21.5	348.8 \pm 36.5	44.1* \pm 1.1	41.9 \pm 3.9	37.4 \pm 1.9	33.5* \pm 3.5	8.27 \pm 0.51	7.28 \pm 1.21	24.1 \pm 0.9	19.9* \pm 1.5	114.9 \pm 4.4	103.5 ^L \pm 10.3
	R24	296.9 \pm 28.3	367.7 \pm 23.2	33.5 \pm 3.6	41.6 \pm 2.7	31.1 \pm 2.6	34.9 \pm 2.4	6.15 \pm 0.75	7.67 \pm 0.79	22.2 \pm 2.8	22.2* \pm 1.2	93.9 \pm 9.3	107.5 \pm 6.8
	R48	314.7 \pm 12.1	330.2* \pm 7.4	34.4 \pm 1.5	39.3 \pm 2.1	28.9 \pm 0.9	31.1* \pm 0.8	6.80 \pm 0.28	7.20 \pm 0.17	22.1 \pm 1.7	19.4* \pm 0.9	93.4 \pm 4.0	98.0* \pm 3.2
Meio-dia	C	368.9 ^L \pm 28.6	313.0 ^L \pm 17.8	40.8 ^L \pm 2.9	38.7 ^L \pm 1.4	38.4 ^L \pm 2.4	31.8 ^L \pm 1.5	7.21 \pm 0.41	6.78 ^L \pm 0.39	29.7 \pm 3.6	21.9 ^L \pm 0.9	116.9 \pm 9.2	100.1 ^L \pm 3.7
	DHm	407.9 \pm 34.6	328.4 \pm 21.3	46.8 \pm 2.6	40.9 \pm 2.3	42.4 \pm 3.4	33.7 \pm 2.2	8.81 \pm 0.54	7.12 ^L \pm 0.48	31.1 \pm 1.9	23.9 ^L \pm 2.0	129.9 \pm 8.3	106.4 \pm 6.9
	DHs	560.8 ^L \pm 62.1	390.5 \pm 36.9	58.3* \pm 6.0	51.3* \pm 2.1	48.4 \pm 5.3	41.9* \pm 1.7	8.63 \pm 0.71	9.31* \pm 0.44	26.0 \pm 7.2	25.1 ^L \pm 1.6	151.0 \pm 15.9	128.9* \pm 5.2
	R24	334.9 \pm 29.5	401.2 \pm 30.7	38.2 \pm 3.5	50.1* ^L \pm 2.8	34.7 \pm 2.7	41.3* \pm 2.6	7.12 \pm 0.59	9.18* \pm 0.69	25.9 \pm 1.9	25.5 \pm 1.6	106.3 \pm 8.5	127.2* \pm 6.8
	R48	347.8 \pm 18.7	296.4 \pm 19.9	40.7 ^L \pm 2.2	35.6 \pm 2.4	33.1 \pm 1.6	29.5 \pm 1.4	7.45 \pm 0.37	6.59 \pm 0.40	27.6 \pm 1.8	18.8 ^L \pm 1.4	109.9 ^L \pm 5.2	91.4 \pm 5.1

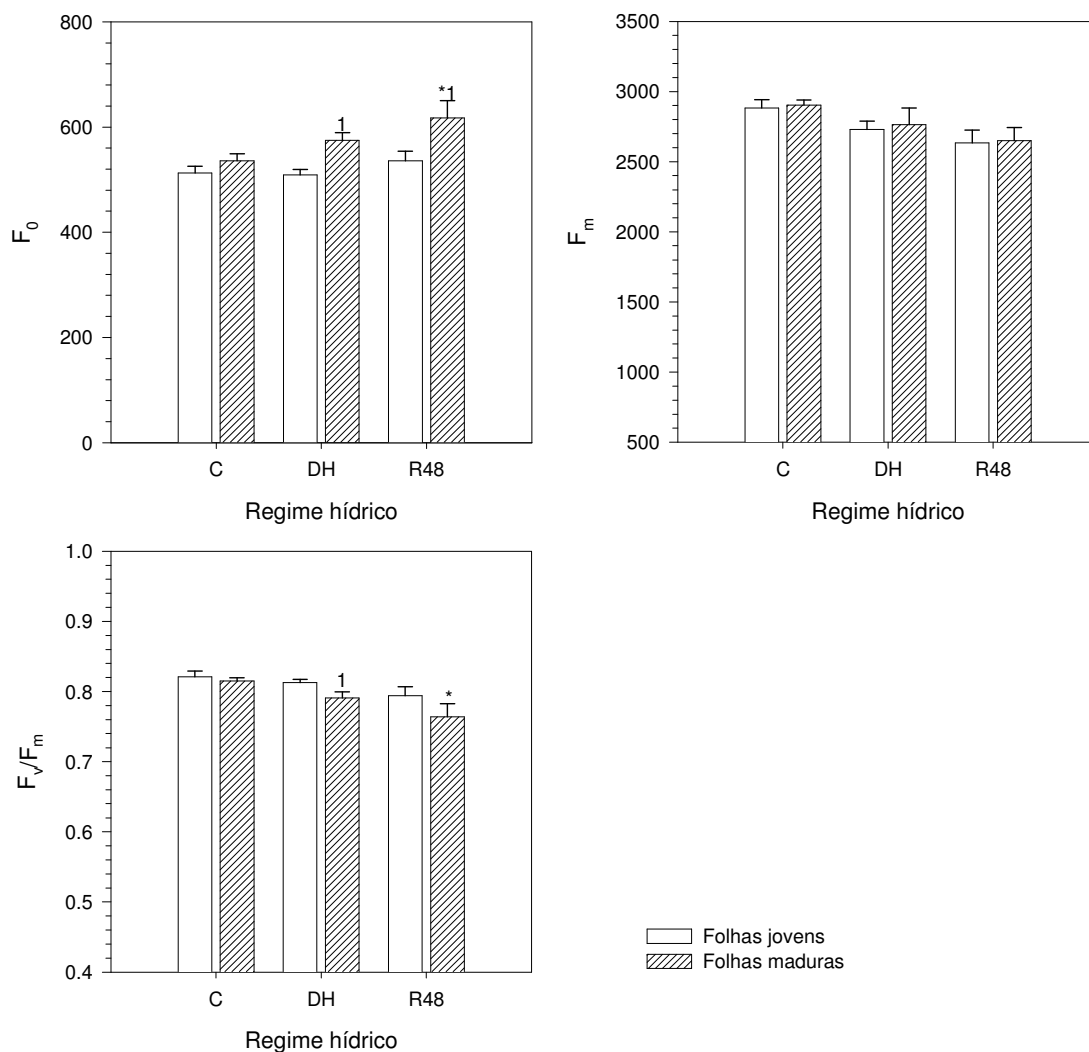


Figura 3.3 - Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em folhas de plantas *H. annuus* controle (C), em déficit hídrico (DH) e 48 (R48) horas após a rehidratação do substrato no ensaio realizado em 1999 (Gir99). Valores médios \pm erro padrão (n=5). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controle (teste de Dunnett, $\alpha=0.05$). O número (1) indica diferenças significativas entre as médias dos dois níveis de idades foliares (teste *t* de Student, $\alpha=0.05$).

A eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) não sofreu alterações nas folhas jovens sob déficit hídrico do ensaio Gir99 (Fig 3.3). Nas folhas maduras sob déficit hídrico este parâmetro diminuiu ligeiramente, mas foi quando as plantas foram rehidratadas que o decréscimo de F_v/F_m se acentuou, tendo-se aproximado de 0.76 (Fig 3.3). Esta diminuição de F_v/F_m deveu-se sobretudo ao aumento da fluorescência basal (Fig. 3.3).

No ensaio Gir02, F_v/F_m não sofreu alterações com a imposição dos diferentes regimes hídricos, nem se registaram quaisquer diferenças entre as duas idades foliares estudadas tendo o valor mais baixo registado sido 0.842 (dados não apresentados). Neste ensaio também não foram observados quaisquer efeitos negativos do déficit hídrico moderado nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* das folhas de ambas as idades, nem das folhas jovens sob stresse

mais intenso. No entanto, nas folhas maduras em déficit hídrico mais acentuado, a eficiência fotoquímica dos centros de reação do fotossistema II ‘abertos’ (F'_v/F'_m ; Fig.3.4) e a proporção de centros de reação ‘abertos’ (qP) decresceram significativamente relativamente às plantas bem regadas, o que se reflectiu na diminuição acentuada de Φ_{PSII} e de ETR. Depois da rehidratação do substrato, F'_v/F'_m das folhas maduras readquiriu valores semelhantes aos das plantas testemunha mas qP e Φ_{PSII} , apesar de se poderem considerar restaurados, não recuperaram completamente os valores exibidos pelas plantas testemunha, o que se repercutiu no não restabelecimento de ETR (Fig. 3.4).

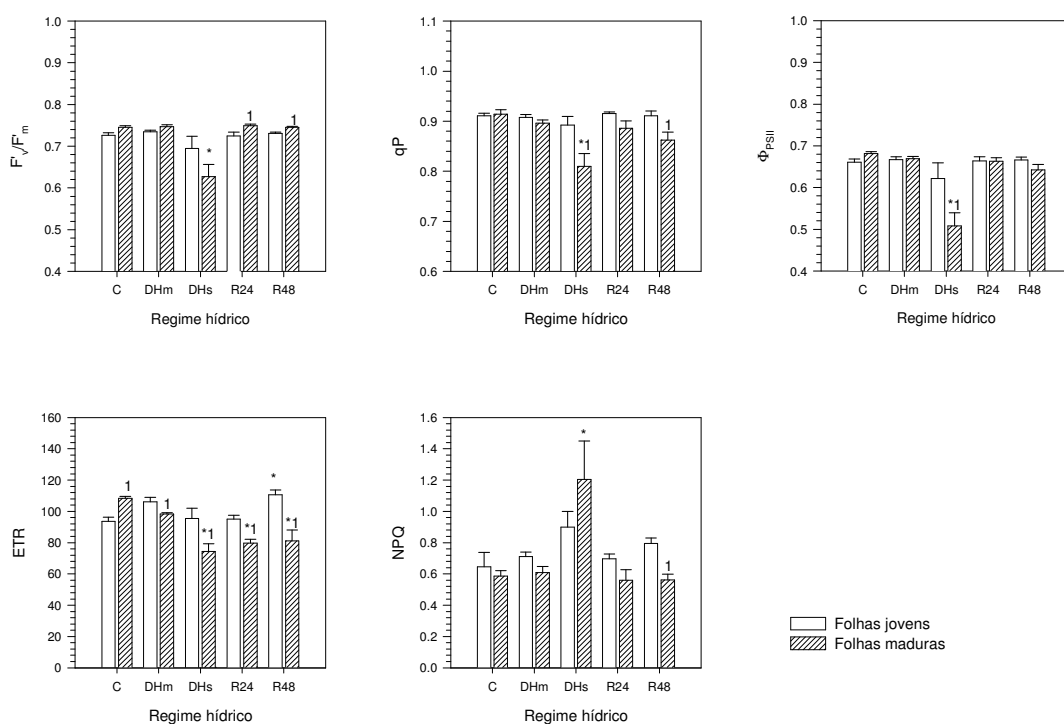


Figura 3.4 - Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em folhas de plantas *H. annuus* controlo (C), em déficit hídrico (DH) moderado (DHm) e severo (DHs) e 24 (R24) e 48 (R48) horas após a rehidratação do substrato no ensaio realizado em 2002 (Gir02). Valores médios \pm erro padrão ($n=5$). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnet, $\alpha= 0.05$). O número (1) indica diferenças significativas entre as médias dos dois níveis de idades foliares (teste *t* de Student, $\alpha= 0.05$).

Nas folhas jovens não se observou a alteração do “quenching” não fotoquímico (NPQ) em nenhum dos regimes hídricos (Fig. 3.4); nas folhas maduras em déficit hídrico mais intenso o NPQ aumentou significativamente relativamente às plantas controlo mas recuperou após as primeiras horas de rehidratação (Fig. 3.4). O aumento do NPQ aparece frequentemente associado ao aumento de dissipação da energia de excitação em excesso sob a forma de calor, levada a cabo pelos pigmentos do ciclo das xantofilas (Demmig-Adams e

Adams III 1996, Niyogi 2000), e que se reflecte no aumento do seu índice de desepoxidação, ou seja, no aumento da razão entre a soma do teor em anteraxantina e zeaxantina (A+Z) e a soma do teor em violaxantina, anteraxantina e zeaxantina (V+A+Z). No entanto, no ensaio Gir02 não se verificou esta relação (Figs. 3.4 e 3.5): o aumento significativo de NPQ nas folhas maduras sob stresse mais intenso não foi acompanhado pelo aumento de $(A+Z)/(V+A+Z)$.

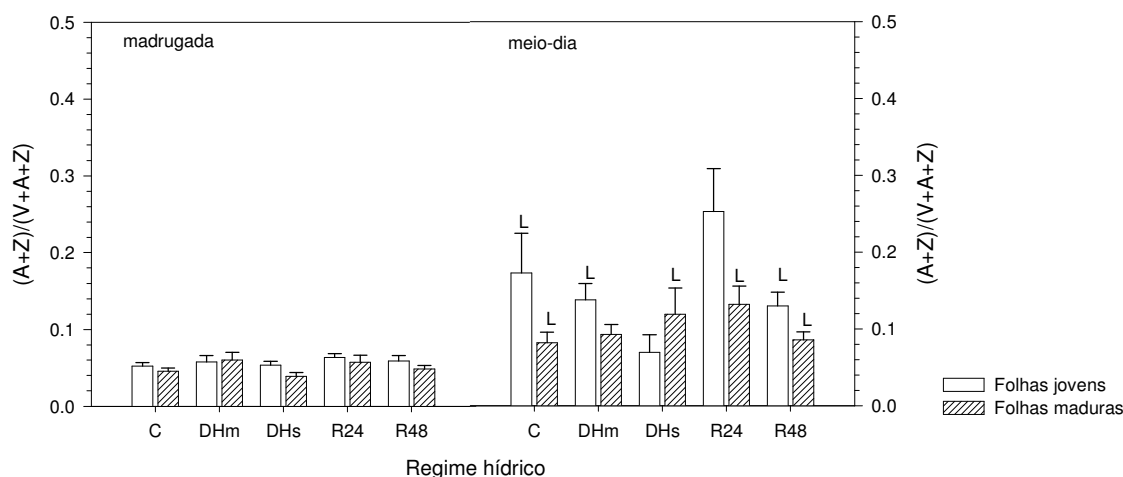


Figura 3.5 - Índice de desepoxidação $[(A+Z)/(V+A+Z)]$ em folhas de plantas *H. annuus* controlo (C), em défice hídrico (DH) moderado (DHm) e severo (DHs) e 24 (R24) e 48 (R48) horas após a rehidratação do substrato no ensaio realizado em 2002 (Gir02). Valores médios \pm erro padrão (n=5). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnett, $\alpha=0.05$). O número (1) indica diferenças significativas entre as médias dos dois níveis de idades foliares. A letra (L) indica diferenças significativas entre as médias obtidas a meio do dia e as médias obtidas de madrugada (teste *t* de Student, $\alpha=0.05$).

De madrugada o índice de desepoxidação da violaxantina a anteraxantina e zeaxantina não variou com a imposição dos diferentes regimes hídricos (Fig. 3.5). A meio do dia, embora não se tenham registado diferenças significativas de $(A+Z)/(V+A+Z)$ entre os diferentes regimes hídricos, observaram-se tendências de resposta ao défice hídrico diferentes em função da idade da folha (Fig. 3.5): enquanto nas folhas jovens $(A+Z)/(V+A+Z)$ tendeu a diminuir com o aumento da intensidade do stresse, nas folhas maduras $(A+Z)/(V+A+Z)$ tendeu a aumentar.

Hidratos de carbono

O teor foliar em hidratos de carbono foi determinado apenas no ensaio Gir02. De madrugada observou-se o aumento do teor foliar em açúcares solúveis totais, 123% nas

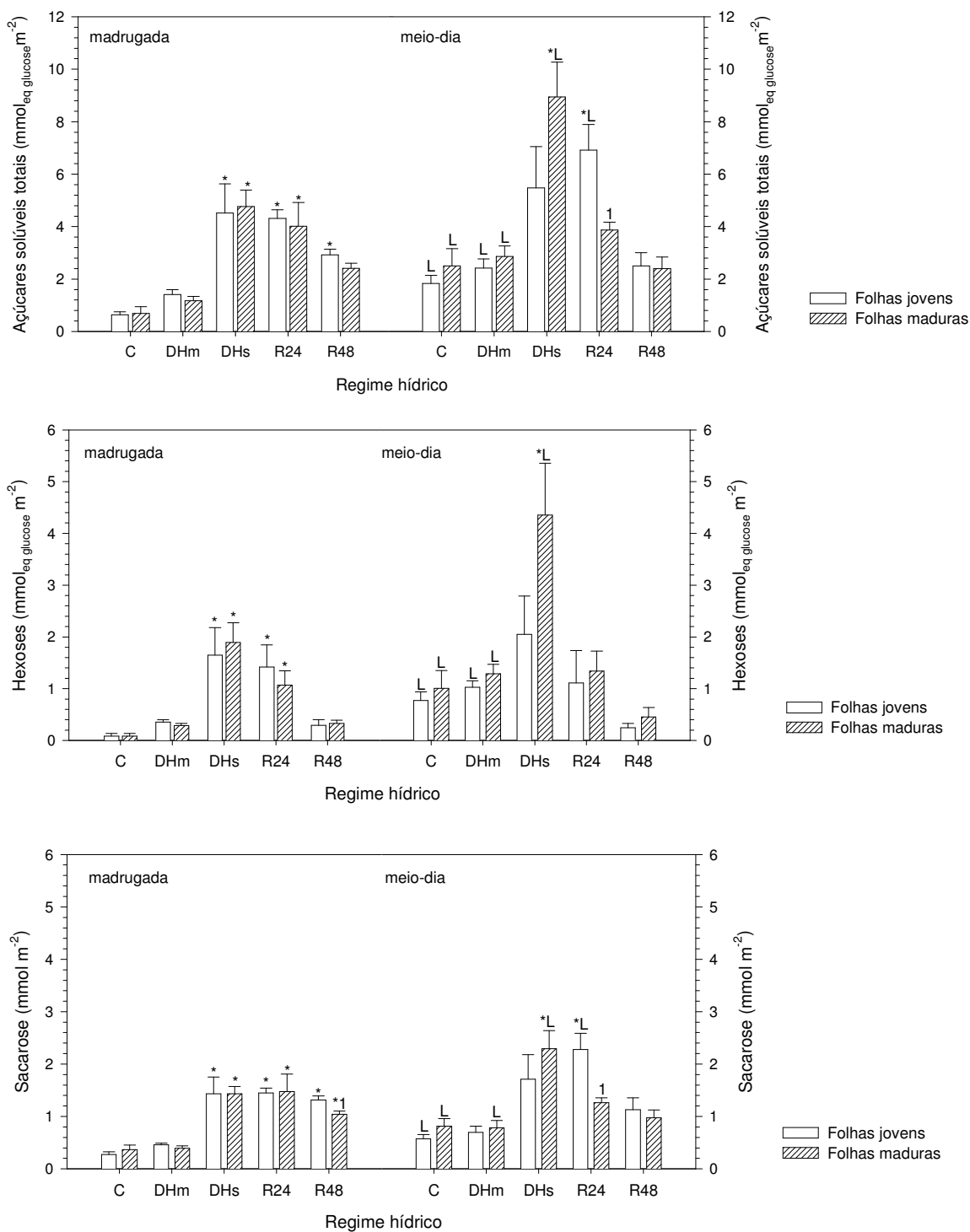


Figura 3.6 - Teor foliar de açúcares solúveis totais, hexoses e sacarose, de madrugada e a meio do dia, em plantas de *H. annuus* controlo (C), em défice hídrico moderado (DHm) e severo (DHs), 24 (R24) e 48 (R48) horas após a rehidratação do substrato no ensaio realizado em 2002 (Gir02). Valores médios \pm erro padrão ($n=5$). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnet, $\alpha=0.05$). O número (1) indica diferenças significativas entre as médias dos dois níveis de idades foliares (teste *t* de Student, $\alpha=0.05$). A letra (L) indica diferenças significativas entre as médias obtidas a meio do dia e as médias obtidas de madrugada (teste *t* de Student, $\alpha=0.05$).

folhas jovens e 70% nas folhas maduras, em resposta à imposição do défice hídrico, (Fig. 3.6). O aumento da intensidade do défice hídrico repercutiu-se num aumento adicional, muito significativo, do teor em açúcares solúveis totais que, relativamente às plantas controlo, septuplicou em ambas as idades foliares (Fig. 3.6). Adicionalmente, a composição dos açúcares solúveis também sofreu alterações nas plantas sob stresse: a proporção de hexoses nos açúcares solúveis totais, que nas folhas das plantas testemunha era inferior a 15%, aumentou para 28% nas folhas jovens e 27% nas maduras em stresse moderado, e alargou-se para 37% e 40%, respectivamente, nas plantas sob stresse mais severo (Fig. 3.6). Estes dados mostram que, embora a sacarose tenha permanecido como principal constituinte dos açúcares solúveis totais, o acréscimo da concentração foliar de açúcares solúveis nas plantas em stresse se deveu, sobretudo, ao aumento no teor em hexoses, em ambas as idades foliares. Nas 24 h que se seguiram à rehidratação do substrato, o teor em açúcares solúveis totais manteve-se significativamente superior ao exibido pelas folhas de ambas as idades das plantas bem regadas, o mesmo se passando com os teores em sacarose e em hexoses (Fig. 3.6). 48 h depois do início da rehidratação do substrato registou-se a recuperação parcial da concentração dos açúcares solúveis totais, relacionada principalmente com o decréscimo do teor em hexoses (Fig.3.6). Apesar das 48 h de rehidratação do substrato, as folhas jovens e as folhas maduras mantiveram teores em sacarose altos, respectivamente quatro e duas vezes superiores aos exibidos pelas plantas controlo (Fig. 3.6).

A meio do dia só se registaram aumentos expressivos do teor em açúcares solúveis totais nas folhas submetidas ao défice hídrico mais severo, para o triplo nas folhas mais jovens e aproximadamente para o quádruplo nas folhas maduras. Nesta altura do dia, não se registaram grandes alterações na composição dos açúcares solúveis totais em hexoses e sacarose nas folhas jovens, enquanto nas folhas maduras a proporção de hexoses aumentou cerca de 10% relativamente à verificada nas plantas bem regadas (Fig. 3.6). 24 h depois de iniciada a rehidratação do substrato a concentração foliar de açúcares solúveis totais recuperou apenas nas folhas maduras mas, passadas mais 24 h, ambos os tipos de folha tinham recuperado (Fig. 3.6). Embora depois da rehidratação a concentração em açúcares solúveis totais tenha atingido valores próximos dos observados nas folhas das plantas bem regadas, a sacarose que representava 60% dos açúcares solúveis nas plantas controlo, independentemente da idade foliar, passou a representar 90% nas folhas jovens e 81% nas folhas maduras das plantas rehidratadas.

Enquanto nas plantas testemunha e nas folhas maduras das plantas em défice hídrico moderado e severo o teor em açúcares solúveis totais, bem como nos seus componentes

hexoses e sacarose, aumentou sempre significativamente entre a madrugada e o meio do dia, nas folhas jovens das plantas em stresse moderado esse aumento só foi estatisticamente significativo quando se consideram os açúcares solúveis totais e, nas folhas jovens submetidas a défice hídrico mais severo não foi observado qualquer aumento (Fig. 3.6). Por outro lado, foi só nestas folhas que, nas primeiras 24 h de rehidratação, se registou o aumento do teor em açúcares solúveis totais entre a madrugada e o meio-dia, consequência do aumento da concentração foliar em sacarose. As plantas com 48 h de rehidratação já apresentaram indícios de recuperação de um padrão semelhante ao observado nas plantas controlo, com aumento ligeiros da concentração em açúcares solúveis totais, e também de hexoses e de sacarose, entre a madrugada e o meio-dia (Fig. 3.6).

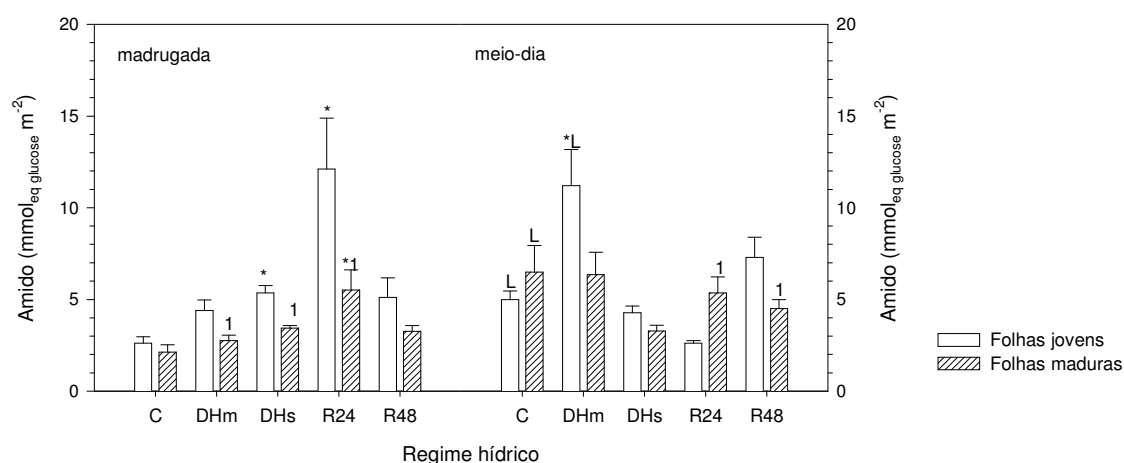


Figura 3.7 - Teor foliar em amido, de madrugada e a meio do dia, em plantas de *H. annuus* controlo (C), em défice hídrico moderado (DHm) e severo (DHs) 24 (R24) e 48 (R48) horas após a rehidratação do substrato no ensaio realizado em 2002 (Gir02). Valores médios \pm erro padrão ($n=5$). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnett, $\alpha= 0.05$). O número (1) indica diferenças significativas entre as médias dos dois níveis de idades foliares (teste t de Student, $\alpha= 0.05$). A letra (L) indica diferenças significativas entre as médias obtidas a meio do dia e as médias obtidas de madrugada (teste t de Student, $\alpha= 0.05$).

De madrugada, o conteúdo em amido das folhas jovens sob stresse moderado aumentou 69% e o aumento da intensidade do stresse teve como consequência um aumento ainda maior, 106% (Fig. 3.7). Na mesma altura do dia o teor em amido nas folhas maduras também aumentou, 30% no stresse moderado e 61% no stresse severo, mas muito menos que nas folhas jovens (Fig. 3.7). No entanto, foi durante as primeira horas de rehidratação que, de madrugada, se registaram os maiores aumentos de concentração de amido foliar, para mais do quádruplo nas folhas jovens e aproximadamente o dobro nas folhas maduras. Nas 24 h de rehidratação seguintes os níveis de amido foliar permaneceram mais altos do que os exibidos nas plantas testemunha, principalmente nas folhas jovens, em que se mantiveram 96%

superiores. A meio do dia só se observou um grande aumento no teor em amido nas folhas jovens sob stresse moderado (125%). O teor em amido das folhas jovens e das folhas maduras em défice hídrico severo não foi muito diferente do registado nas mesmas folhas das plantas testemunha e manteve-se ao longo da rehidratação (Fig. 3.7). Nas folhas testemunha, o teor em amido aumentou sempre da madrugada para o meio-dia, bem como nas folhas submetidas a défice hídrico moderado. Nas plantas em stresse mais severo já não se registou esta acumulação de amido entre a madrugada e o meio do dia e este padrão manteve-se durante as 48 h de rehidratação.

Peroxidação de lípidos (teor em dialdeído malónico ou MDA)

Os regimes hídricos não fizeram alterar significativamente o teor foliar em dialdeído malónico no ensaio Gir99 (Fig 3.8).

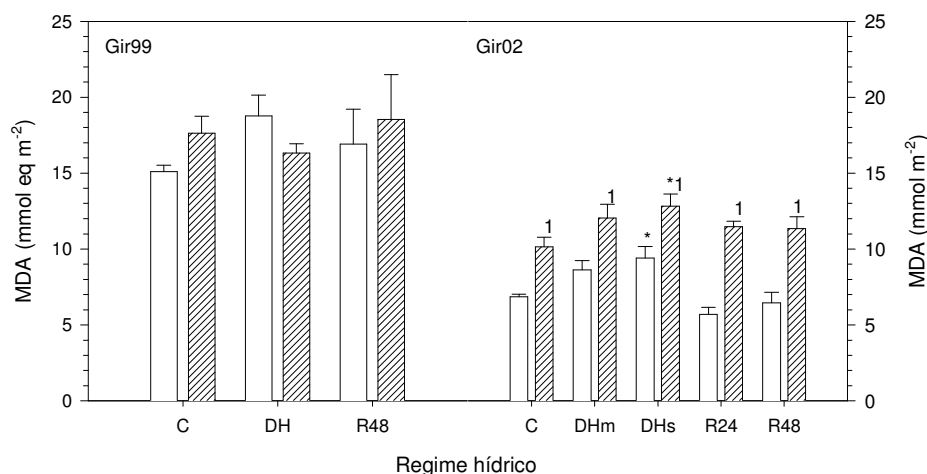


Figura 3.8 - Teor foliar em dialdeído malónico (MDA) de plantas *H. annuus* controlo (C), em défice hídrico (DH) moderado (DHm) e severo (DHs) e 24 (R24) e 48 (R48) horas após a rehidratação do substrato nos ensaios realizados em 1999 (Gir99) e em 2002 (Gir02). Valores médios \pm erro padrão ($n = 5$). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$). O número (1) indica diferenças significativas entre as médias dos dois níveis de idades foliares (teste t de Student, $\alpha = 0.05$).

No ensaio realizado em 2002 a imposição de défice hídrico moderado teve como consequência a subida, em 26% nas folhas jovens e em 20% nas folhas maduras, do teor em MDA (Fig. 3.8). Com o aumento da intensidade do stresse aumentou também o conteúdo em MDA, relativamente às folhas testemunha, 37% nas folhas jovens e 27% nas folhas maduras (Fig. 3.8). Apesar de os aumentos de MDA nas folhas jovens terem sido superiores aos aumentos observados nas folhas maduras, as folhas jovens exibiram sempre teores foliares de MDA significativamente inferiores (Fig. 3.8). Após a rehidratação do substrato o teor em

MDA nas folhas jovens recuperou logo nas primeiras 24h, enquanto nas folhas maduras se manteve mais de 12% acima dos valores controlo (Fig. 3.9).

3.4. Discussão

Apesar de ser geralmente aceite que, em plantas sujeitas a défice hídrico moderado, o declínio da fotossíntese se deve em primeiro lugar à limitação da difusão do CO₂ imposta pelo fecho dos estomas (Ben *et al.* 1987, Kaiser 1987, Chaves 1991, Cornic e Massacci 1996; Quick *et al.* 1992), vários estudos indicam também a existência de limitações ao nível do mesófilo, quer em plantas inteiras (Boyer 1971, Tezara *et al.* 1999) quer em fragmentos foliares (Tang *et al.* 2002) ou em cloroplastos isolados (Boyer e Bowen 1970) quer ainda em algas (Davison e Pearson 1996, Kawamitsu *et al.* 2000), as quais não possuem estomas.

Flexas e Medrano (2002a) sugeriram que os efeitos do défice hídrico sobre a actividade fotossintética dependem da intensidade do stresse, postulando que o fecho dos estomas seja uma das primeiras respostas ao défice hídrico e a principal limitação à fotossíntese em plantas sob stresse ligeiro a moderado e que, em plantas sob stresse severo, ocorre a regulação negativa ou até a inibição de processos metabólicos. Adicionalmente, Flexas e Medrano (2002a,b) demonstraram, com base na comparação de resultados de diversas publicações, que a condutância estomática para o vapor de água (g) medida a luz saturante tem uma relação directa com o nível de défice hídrico a que as plantas estão submetidas. A avaliação da intensidade do stresse feita deste modo é mais fiável e varia menos de espécie para espécie do que quando se recorre aos parâmetros tradicionalmente mais utilizados, como o potencial hídrico ou o teor relativo em água foliar. Aqueles autores consideraram que, a intensidade luminosa saturante, em plantas bem hidratadas ou em défice hídrico ligeiro $g > 150 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, em plantas sob défice hídrico muito moderado $100 < g < 150 \text{ mmol m}^{-2} \text{ m}^{-1}$, em plantas sob défice hídrico moderado $50 < g < 100 \text{ mmol m}^{-2} \text{ m}^{-1}$ e, em plantas submetidas a défice hídrico severo $g < 50 \text{ mmol m}^{-2} \text{ m}^{-1}$. Comparando o nível de stresse atingido no ensaio Gir99 e o nível mais baixo de stresse do ensaio Gir02, tendo como referência o potencial hídrico de madrugada (-0.365 e -0.315 MPa), registou-se um teor relativo em água foliar inferior no ensaio Gir99. Além disso, neste ensaio g situou-se abaixo de $100 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nas plantas em défice hídrico enquanto nas plantas sob stresse menos intenso de Gir02 g não foi inferior a $240 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Tomando como referência os limites estabelecidos por Flexas e Medrano (2002a,b), aceitando também que num solo pouco hidratado a diminuição de turgescência das células das raízes induz a produção de sinais químicos que circulam no fluxo da transpiração e que regulam a abertura dos estomas (Davies e Zhang 1991), e sabendo que a

diminuição progressiva da dotação de rega induziu decréscimos de g superiores a 25% relativamente às folhas testemunha, considerou-se que as plantas sob o nível de stresse menos intenso em Gir02 se encontravam em défice hídrico ligeiro. Ainda segundo os critérios de Flexas e Medrano (2002b), pode considerar-se que no ensaio Gir99 as plantas foram submetidas a défice hídrico moderado e que o nível de défice hídrico mais intenso imposto no ensaio Gir02 pode ser incluído na categoria de défice hídrico severo.

Os resultados de g , NP e C_i , medidos em condições ambiente, bem como os de A_{\max} indicam que a restrição à fotossíntese observada nas plantas em défice hídrico pode ter sido estomática nas folhas jovens em défice hídrico moderado do ensaio Gir99; os mesmos resultados indicam que a restrição de NP pode não ter sido unicamente estomática nas folhas de ambas as idades sob défice hídrico ligeiro no ensaio Gir02 e que não foi exclusivamente estomática nas plantas em défice hídrico severo do mesmo ensaio nem nas folhas maduras de Gir99. Em todos os casos, ao decréscimo do potencial hídrico correspondeu a diminuição da condutância foliar para o vapor de água, e o decréscimo de g reflectiu-se por sua vez no declínio das taxas de fotossíntese. No entanto, a manutenção da pressão parcial de CO_2 nos espaços intercelulares, ou mesmo o seu aumento nas folhas maduras em Gir99 e no stresse severo de Gir02, não apontam para limitações à difusão de CO_2 impostas exclusivamente pelo fecho dos estomas. A fiabilidade das quantificações de C_i em plantas sob défice hídrico tem sido discutida, considerando-se que pode facilmente ser sobrestimado nestas condições (Cornic 2000). As razões apontadas para este facto são, por um lado, o fecho heterogéneo dos estomas, ou por manchas, referido na bibliografia como “patchiness stomatal closure”, e, por outro, o aumento da importância relativa da transpiração cuticular com o aumento da resistência estomática (Cornic 2000). O controlo estomático sobre as taxas fotossintéticas é suprimido quando as medições são executadas a concentrações de CO_2 suficientemente altas para saturar as taxas de carboxilação, independentemente do nível de abertura dos estomas. No ensaio Gir02, a diminuição significativa de A_{\max} nas folhas de ambas as idades sob défice hídrico severo evidenciou a existência de restrições à fotossíntese ao nível do mesófilo em simultâneo com decréscimos substanciais no teor relativo em água, à semelhança do que Lawlor (2002) e Lawlor e Cornic (2002) observaram. Adicionalmente, nas folhas maduras, a obtenção de NP negativa aliada à subida de C_i , aponta para que essas restrições tenham sido acompanhadas pela promoção dos metabolismos produtores de CO_2 , como a fotorrespiração, facto anteriormente registado por outros autores (Wingler *et al.* 1999) e a respiração mitocondrial. No entanto, os trabalhos existentes em que a respiração mitocondrial foi medida em plantas em défice hídrico apontam para a sua inibição nestas condições (Haupt-Herting *et*

al. 2001). Apesar de não dispormos de medições de A_{\max} para o ensaio Gir99, o mesmo se pode inferir relativamente às folhas maduras em stresse deste ensaio, nas quais também se registou NP negativa aliada à subida significativa de C_i . O decréscimo em 43% de NP das folhas jovens no ensaio Gir99 pode ter sido devido apenas a limitações estomáticas, apesar da manutenção de C_i . Nas folhas jovens e maduras sob stresse ligeiro do ensaio Gir02, a diminuição de g e de NP não foi acompanhada pelo decréscimo de C_i o que, só por si, não aponta para que o decréscimo de NP tenha sido devido a limitações à difusão do CO_2 impostas pelo fecho dos estomas. Apesar de a manutenção da capacidade fotossintética destas folhas não confirmar a existência de limitações a NP ao nível do mesófilo, o decréscimo de NP em simultâneo com a manutenção de g superior a $240 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ desvaloriza a importância relativa da taxa de transpiração cuticular, ficando assim eliminado um dos factores tidos como possível causa da sobrestimação de C_i . Por outro lado, diversos autores associaram a abertura estomática por manchas à imposição rápida do défice hídrico (quatro dias), referindo também que este problema pode ser ultrapassado através da imposição mais lenta do stresse (Gunasekera e Berkowitz 1992). Adicionalmente, Gimenez *et al.* (1992) não detectaram fecho dos estomas por manchas em duas cultivares de girassol submetidas a défice hídrico, em que a imposição do stresse foi feita reduzindo a dotação de rega durante quatro dias. No ensaio Gir02 o défice hídrico foi imposto lentamente, por redução da dotação de rega, ao longo de nove dias. Da conjugação destes factos, decorre que é pouco provável que C_i tenha sido sobrestimado nas folhas jovens e maduras sob stresse ligeiro do ensaio Gir02. Deste modo, a manutenção de C_i em conjunto com o decréscimo observado em NP sugerem que, apesar dos resultados de A_{\max} , tenham ocorrido limitações à actividade fotossintética nas folhas sob stresse ligeiro do ensaio Gir02 ao nível do mesófilo.

A secura acelera o padrão acrópeto da senescência foliar em várias espécies (Aparício-Tejo e Boyer 1983, O'Neill 1983, Olsson 1995) e Kaiser (1987) detectou um aumento rápido e transitório no "leakage" das membranas durante a rehidratação de discos foliares, tendo concluído que a rehidratação rápida pode ser pelo menos tão prejudicial para as células do mesófilo como a própria desidratação. Por outro lado, Dreesmann *et al.* (1994) verificaram que a taxa de declínio da actividade da RuBisCO aumentou na rehidratação e David *et al.* (1998) concluíram que, enquanto a actividade fotossintética de folhas jovens e maduras recupera rapidamente dos efeitos dos défices hídricos, o mesmo não se verifica ao nível das folhas mais velhas. O decréscimo do teor foliar em clorofila (Matile *et al.* 1989) e da sua proporção relativamente aos carotenóides (Smart 1994, Merzlyak e Gitelson 1995) são sinais reconhecidos da entrada das folhas em senescência. Os resultados obtidos não dão

indicações de que tenha sido induzida a senescência foliar nas folhas amostradas em qualquer um dos ensaios ou regimes hídricos, uma vez que não se observaram decréscimos do teor em clorofila total e não houve alterações da proporção de clorofila total relativamente aos carotenóides totais, nem nas folhas em stresse, nem depois da rehidratação.

A determinação dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, permite o cálculo da eficiência máxima do fotossistema II (F_v/F_m), da eficiência fotoquímica dos centros de reacção oxidados do PSII (F'_v/F'_m) e a estimativa da fracção de centros de reacção abertos (qP) e do rendimento quântico real (Φ_{PSII}). Com base nestes parâmetros, a performance do aparelho fotossintético pode ser avaliada através da sua relação com o desempenho do fotossistema II (Krall e Edwards 1992). A determinação de Φ_{PSII} permite o cálculo do fluxo de electrões dependente do PSII para uma determinada irradiância (ETR).

Nas folhas jovens do ensaio Gir99 a recuperação de todos os parâmetros de trocas gasosas e a não afectação de nenhum dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, pelo stresse ou pela rehidratação, apoiam a ideia de que a principal limitação ao processo fotossintético nestas folhas pode ter sido estomática. Não obstante, nas folhas maduras, a eficiência máxima do fotossistema II, que já tinha decrescido um pouco nas folhas em stresse, atingiu valores inferiores a 0.8 depois da rehidratação. Simultaneamente ocorreu o aumento significativo de F_0 , indicando a possível ocorrência de danos ao nível dos centros de reacção do PSII nestas folhas e contribuindo para a ideia, já referida, de que a diminuição de NP nas folhas maduras em défice hídrico teve origem também em limitações não estomáticas, com consequências negativas para a sua capacidade de recuperação após o alívio do défice hídrico. Os eventuais danos ao nível dos centros de reacção do fotossistema II nas folhas maduras não foram acompanhados por lesões ao nível das membranas, como é demonstrado pela manutenção dos níveis de MDA, considerado um bom indicador do nível de peroxidação dos lípidos das membranas (Hodges *et al.* 1999). Apesar de as folhas maduras aparentarem danos ao nível dos centros de reacção do PSII, NP recuperou depois do alívio do défice hídrico.

Nas folhas sob o stresse mais ligeiro e nas folhas jovens sob défice hídrico severo do ensaio Gir02 não se registaram quaisquer alterações significativas dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, o que indica que a fotoquímica primária máxima do PSII não foi lesada nestas folhas, não tendo ocorrido fotoinibição crónica (Ögren 1991, Long *et al.* 1994). Apesar disso, foram registados decréscimos de NP, superiores a 25% nas plantas sob o stresse mais ligeiro e de 77% nas folhas jovens sob stresse mais severo.

Nas folhas submetidas ao défice hídrico ligeiro (Gir02) o decréscimo de NP não foi acompanhado pelo decréscimo de ETR. Nas plantas C₃, ETR é repartido essencialmente entre

a fotossíntese e a fotorrespiração (Krall e Edwards 1992, Wingler 1999), podendo também ser utilizado na reacção de Mehler (Osmond e Grace 1995, Biehler e Fock 1996, Niyogi 2000, Wingler *et al.* 1999, 2000). Deste modo, e apesar de qP se ter praticamente mantido, pode ter ocorrido o direccionamento de electrões para estes processos metabólicos consumidores de electrões alternativos à fotossíntese, sobretudo para a reacção de Mehler já que C_i não se alterou. A fotorrespiração e a reacção de Mehler (Polle 1996, Asada 1999, Noctor *et al.* 2002) geram espécies reactivas de oxigénio podendo deste modo ficar justificados os aumentos de cerca de 20% observados no teor foliar em MDA. Fica também reforçada a hipótese de o decréscimo de NP observado nestas folhas ter sido devido a alterações metabólicas induzidas pelo défice hídrico. Nas folhas jovens, o aumento do teor em β -caroteno, luteína, neoxantina e em carotenóides totais de madrugada pode representar o reforço da protecção antioxidante induzido pelo défice hídrico, já que estes pigmentos desempenham um papel importante na dissipação de energia em excesso através da inactivação do $^3\text{Chl}^*$ e da eliminação de espécies reactivas de oxigénio como o $^1\text{O}_2^*$ (Pogson *et al.* 1998, Li *et al.* 2002, Choudhury e Behera 2001, Jung 2004). Este reforço não ocorreu nas folhas maduras, que, nas plantas controlo, já apresentavam teores superiores nestes pigmentos relativamente aos das folhas jovens. No entanto, o aumento dos pigmentos antioxidantes nas folhas jovens, de madrugada, não se reflectiu a meio do dia, altura em que as folhas mantiveram estes pigmentos a níveis semelhantes aos das plantas controlo. Também não se observou qualquer alteração do índice de desepoxidação dos pigmentos do ciclo das xantofilas nem do NPQ. Estes resultados sugerem que o aumento do teor em carotenóides constitui, por si só, uma primeira reacção das folhas jovens ao défice hídrico. No entanto, à luz, serão necessários stresses mais intensos para potenciar este tipo de protecção, apesar do aumento de stresse oxidativo que ocorre, como é demonstrado pelos aumentos de MDA observados relativamente às plantas controlo.

Nas folhas jovens submetidas ao défice hídrico severo (Gir02) também não se registaram alterações nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*. Tal como nas folhas submetidas a défice hídrico ligeiro, o decréscimo de NP não foi acompanhado pelo decréscimo de ETR. Pode assim supor-se que ocorreu o aumento da fotorrespiração, o que concorda com os valores de C_i registados e com o aumento em 37% do teor foliar em MDA, efeito da presença de stresse oxidativo (Weber *et al.* 2004), que como já foi referido, pode ser consequência da indução da fotorrespiração e/ou da reacção de Mehler. Simultaneamente, a diminuição significativa de A_{max} aponta para a existência de limitações ao nível do ciclo de Calvin. Apesar de A_{max} destas folhas ter recuperado depois do alívio do défice hídrico, o mesmo não se verificou com NP. Além disso, observou-se o aumento de ETR, o que aponta

para que os metabolismos consumidores de electrões alternativos à fotossíntese, estimulados durante a imposição do défice hídrico, se tenham mantido com taxas altas mesmo depois do alívio do stresse. Nestas folhas acentuou-se o potencial antioxidante com o aumento dos teores foliares em β -caroteno, luteína, neoxantina e carotenóides totais, de madrugada e a meio do dia, principalmente em β -caroteno, que a meio do dia apresentou um teor 43% superior ao das folhas controlo. Depois da rehidratação, os teores em pigmentos antioxidantes voltaram a ser semelhantes aos exibidos pelas plantas controlo, o que indica que outros mecanismos do sistema antioxidante foram induzidos, mesmo durante a rehidratação, até porque o teor foliar em MDA decresceu indicando também o decréscimo do stresse oxidativo. Deste modo, parece que foi atingido um novo equilíbrio nestas folhas, através de um ajuste entre os diferentes processos metabólicos, com estabilização num novo patamar.

Nas folhas maduras sob défice hídrico severo observou-se o decréscimo significativo de qP , F'_v/F'_m e de Φ_{PSII} . Estes resultados mostram que, nestas folhas, o decréscimo de Φ_{PSII} se deveu à diminuição da fracção de centros de reacção oxidados e à diminuição da sua eficiência de captura de energia. A diminuição de F'_v/F'_m pode ser o reflexo do aumento do 'quenching' não fotoquímico (Baker 1991), o que de facto se observou nestas folhas. O NPQ engloba todos os mecanismos que atenuam a fluorescência emitida pela clorofila *a* e reúne, pelo menos, três componentes: qE , o 'quenching' dependente da energia, qT , o 'quenching' dependente de transições de estado como, por exemplo, o afastamento dos complexos captadores de energia dos centros de reacção e qI , o 'quenching' relacionado com a fotoinibição (Muller *et al.*, 2001). Uma vez que não houve indícios de fotoinibição crónica, qI não terá contribuído para o aumento observado em NPQ, sendo no entanto possível que tenha havido alguma contribuição de qT . qE é o maior contribuinte de NPQ (Muller *et al.* 2001) e engloba os processos dependentes da acidificação do lúmen dos tilacóides. Entre estes processos encontram-se a activação da proteína Psbs (Li *et al.* 2000), a activação da desepoxidase da violaxantina (Vde), da qual depende o ciclo de desepoxidação das xantofilas (Li *et al.* 2000, Morosinotto *et al.* 2003), a reacção de Mehler (Asada 1999, Makino *et al.* 2002), o transporte cíclico de electrões em torno do PSI (Makino *et al.* 2002) e a transferência directa de electrões para 'quenchers' como os carotenóides ou para a própria clorofila (Govindjee 1995). Nas folhas maduras sob stresse severo não se registou aumento no índice de desepoxidação dos pigmentos do ciclo das xantofilas, pelo que este não terá contribuído para o aumento observado em NPQ. O teor foliar em β -caroteno, luteína, neoxantina e em carotenóides totais aumentou mais de 30% nas folhas maduras em défice hídrico severo, podendo esta forma de dissipação de energia ser responsável por uma boa parte do aumento

de NPQ registado (Govindjee 1995), juntamente com a reacção de Mehler (Asada 1999, Makino *et al.* 2002) e o transporte cíclico de electrões (Makino *et al.* 2002). O aumento significativo do teor em MDA destas folhas aponta também para a existência de stresse oxidativo (Weber *et al.* 2004), que poderá ter resultado do aumento da reacção de Mehler ou da formação de tripletos de clorofila (Polle 1996, Asada 1999). A diminuição de ETR nestas folhas não contraria esta hipótese porque NP foi negativa, ou seja, a maior parte dos electrões capturados não foi utilizada no metabolismo fotossintético de redução do CO₂.

Adicionalmente, a diminuição de qP indica a manutenção de uma grande proporção de Q_A reduzida e a manutenção de um baixo rendimento quântico do transporte de electrões, o que reflecte a diminuição da capacidade de utilização dos quanta capturados nas reacções fotoquímicas. Pshibytko *et al.* (2003) atribuíram esta incapacidade à acumulação de plastoquinol e a danos na ligação entre a Q_B e a proteína D1, resultantes do aumento da microviscosidade das membranas tilacoidais provocado pela desidratação. Escalona *et al.* (1999) afirmaram que o decréscimo de Φ_{PSII} pode ser atribuído à menor disponibilidade de CO₂. No nosso trabalho não parece ser este o caso, uma vez que C_i se manteve alto. Depois do alívio do défice hídrico os valores de g e de C_i voltaram a ser idênticos aos verificados nas folhas controlo, assim como os teores em pigmentos antioxidantes e em MDA, tendo NPQ decrescido também. Apesar da recuperação de A_{max}, NP e ETR não recuperaram completamente, dando a ideia de que estas folhas, tal como as folhas jovens, atingiram um novo equilíbrio funcional depois de estarem sujeitas ao défice hídrico e subsequente rehidratação.

A acumulação de açúcares solúveis em folhas sob défice hídrico é um fenómeno comum, muitas vezes atribuído à hidrólise do amido e/ou a uma diminuição no crescimento desproporcionada relativamente à inibição da fotossíntese (Chaves, 1991). Por outro lado, Dancer *et al.* (1990) num trabalho realizado com células em suspensão, observaram que sob pressão osmótica alta, a síntese de sacarose competia com a de amido, havendo uma maior proporção de carbono investida na síntese de sacarose em detrimento do amido. A acumulação de açúcares solúveis pode contribuir para o aumento da tolerância dos tecidos foliares à desidratação (Pelah *et al.* 1997, David *et al.* 1998), colaborando na manutenção da absorção de água e da turgescência das células através da diminuição do potencial osmótico, e protegendo as membranas, mantendo a sua integridade (Ingram e Bartels 1996, Hoekstra *et al.* 2001, Chaves *et al.* 2003). Além disso, os hidratos de carbono como a sacarose desempenham um papel importante na manutenção da estrutura das proteínas e da actividade enzimática em tecidos desidratados (Ingram e Bartels 1996, Hoekstra *et al.* 2001).

A imposição do défice hídrico ligeiro resultou na acumulação de açúcares solúveis, principalmente nas folhas mais jovens (123%), de madrugada. Nas folhas maduras, observou-se um aumento (70%) inferior ao verificado nas folhas jovens. Em ambos os casos o aumento da concentração foliar de açúcares solúveis deveu-se à acumulação preferencial de hexoses. A acumulação de açúcares solúveis nas folhas poderá ter contribuído para manter a turgescência dos tecidos durante a noite e início da manhã, permitindo manter os estomas abertos e taxas de fotossíntese pouco mais baixas que as observadas nas folhas controlo. A meio do dia, a acumulação de amido apenas nas folhas mais jovens em défice hídrico sugere que as folhas maduras tenham passado a funcionar como fonte de carbono para as folhas mais jovens, e que estas tenham diminuído as suas taxas de crescimento, até porque foi sobretudo nas folhas jovens que também se observou a acumulação de amido de madrugada. A redução de NP pode também ter sido consequência de inibição em 'feed-back' devida à acumulação de açúcares solúveis (Azcón-Bieto 1983).

Nas folhas sob défice hídrico mais severo, houve um grande aumento da concentração de açúcares solúveis que, de madrugada, sextuplicou relativamente ao das folhas testemunha da mesma idade. Nesta altura, o teor em hexoses aumentou relativamente às folhas controlo cerca de dezoito vezes nas folhas jovens e vinte e uma vezes nas folhas maduras, para um aumento de quatro e três vezes de sacarose, respectivamente. No entanto, foi a meio do dia que se registaram as maiores concentrações foliares quer de hexoses quer de sacarose que, nas folhas maduras foram significativamente mais altas do que os valores observados nas plantas controlo. A acumulação de açúcares solúveis poderá ter contribuído para manter a turgescência celular durante o tempo de imposição do défice hídrico, embora haja registo de que, na gama de intensidades luminosas a que as plantas foram expostas neste trabalho, a contribuição dos açúcares solúveis para o potencial osmótico pode ser insignificante (Munns e Weir 1981). O aumento do teor foliar em açúcares solúveis, nas folhas jovens e nas folhas maduras, foi acompanhado por uma pequena subida do teor foliar em amido de madrugada, e pela sua diminuição a meio do dia relativamente às plantas controlo e também relativamente às plantas em stresse ligeiro. Nas folhas submetidas a défice hídrico severo, a acumulação de sacarose ao meio-dia nas plantas em stresse foi acompanhada pelo decréscimo do teor em amido, tal como observado em suspensões de células vegetais (Dancer *et al.* 1990), em discos foliares mergulhados em soluções de potencial osmótico indutor de stresse (Zrenner e Stitt 1991), em plantas mesofíticas (Quick *et al.* 1992) e em plantas de dessecação extrema ('resurrection plants') (Muller *et al.* 1997). O aumento do conteúdo em sacarose nas folhas jovens e nas folhas maduras, coincidente com o decréscimo do teor em amido, indica um

reajustamento metabólico no sentido da síntese/acumulação de um hidrato de carbono como a sacarose, móvel e mais facilmente utilizável, e que também tem funções protectoras em condições de desidratação (Ingram e Bartels 1996, Hoekstra *et al.* 2001).

A possibilidade de os açúcares solúveis poderem de algum modo proteger as membranas celulares do stresse oxidativo sugere que se relacionem as variações do teor em MDA com as variações no teor em açúcares solúveis. O acréscimo dos açúcares solúveis nas plantas em stresse foi acompanhado pelo incremento do teor foliar em MDA. Nas plantas submetidas ao nível de défice hídrico ligeiro do ensaio Gir02 registaram-se pequenos aumentos no conteúdo em açúcares solúveis a meio do dia e, nessa altura, ocorreu um aumento de cerca de 20% do teor em MDA nas folhas jovens e nas folhas maduras. Nas plantas submetidas ao défice hídrico mais severo, o aumento para o dobro do teor foliar em açúcares solúveis a meio do dia nas folhas jovens coincidiu com um aumento de 37% do teor em MDA, enquanto nas folhas maduras o aumento em duas vezes e meia do conteúdo em açúcares solúveis coincidiu com um aumento menor (27%) do teor em MDA. Segundo estes resultados, apesar do aumento dos açúcares solúveis, a peroxidação dos lípidos das membranas não foi impedida nas folhas das plantas em défice hídrico. Por outro lado, e embora as folhas jovens tenham apresentado sempre teores em MDA inferiores aos das folhas mais velhas, quando o défice hídrico foi imposto o teor em MDA subiu proporcionalmente menos nas folhas maduras, o que coincidiu com um grande aumento dos açúcares solúveis, sugerindo que estes metabolitos podem estar relacionados com alguma protecção contra o stresse oxidativo. Durante a rehidratação observou-se a recuperação da concentração foliar em açúcares solúveis para valores semelhantes aos das plantas controlo, mas o equilíbrio entre hexoses e sacarose alterou-se. Enquanto nas folhas das plantas testemunha a sacarose representava cerca de 60% dos açúcares solúveis totais, nas plantas rehidratadas esse valor subiu para 90% nas folhas jovens e 81% nas folhas maduras. Este aumento de importância relativa da sacarose na composição dos açúcares solúveis poderá indicar que as funções de protecção atribuídas à sacarose em situações de desidratação se poderão prolongar e até intensificar durante a rehidratação.

Os resultados dos ensaios realizados indicam que não houve indução de senescência pelo défice hídrico em nenhuma das duas idades foliares, não se podendo atribuir as diminuições nas taxas de fotossíntese a esse factor. Indicam também que nas plantas em stresse houve restrições à actividade fotossintética ao nível do mesófilo e que o tipo de restrições impostas pode variar com a idade foliar e com a intensidade do défice hídrico. Se por um lado a actividade fotossintética pode ter sido inibida em 'feed-back' em ambos os tipos

de folha devido à acumulação de açúcares solúveis (Sheen 1990), os resultados mostram que, nas folhas maduras sob déficit hídrico moderado e severo, as diminuições observadas nas taxas líquidas de fotossíntese se deveram à indução da fotorrespiração e, possivelmente, à indução da reacção de Mehler, enquanto nas folhas jovens isso só parece ter acontecido quando as plantas foram submetidas a stresse severo. Quer a fotorrespiração quer a reacção de Mehler constituem sumidouros de electrões alternativos à fotossíntese e contribuem para minimizar a fotoinibição crónica (Osmond e Grace 1995, Kozaki e Takeba 1996), a qual não ocorreu nas folhas estudadas. No nível de déficit hídrico mais ligeiro estes metabolismos consumidores de electrões alternativos à fotossíntese também podem ter sido activados. As folhas jovens sob déficit hídrico ligeiro revelaram também capacidade para reforçar a sua protecção antioxidante, em resposta ao déficit hídrico, através do aumento do teor em pigmentos com esta função, enquanto as folhas maduras já possuíam níveis de pigmentos antioxidantes altos que se mantiveram quando submetidas a déficit hídrico. Enquanto nas folhas jovens o índice de desepoxidação dos pigmentos do ciclo das xantofilas decresceu com o aumento da intensidade do déficit hídrico, nas folhas maduras a tendência foi oposta. Ao contrário do que tem sido referido por vários autores (Adams e Demmig-Adams 1992, Demmig-Adams e Adams 1992, Demmig-Adams *et al.* 1996, Medrano *et al.* 2002), não foi evidente a relação entre as variações daquele índice e as variações de NPQ.

As espécies reactivas de oxigénio parecem fazer parte de um sistema de sinalização do qual depende a expressão de genes que codificam para as dehidrinas e para algumas enzimas do sistema antioxidante (Weber *et al.* 2004). Por outro lado, os radicais hidroxilo têm a capacidade de inibir, de um modo reversível, as aquaporinas (Henzler *et al.* 2004), pelo que o maior aumento de stresse oxidativo nas folhas jovens pode, até determinado limite, representar um incremento na sua capacidade de resistir ao déficit hídrico, superior aos das folhas maduras.

As diferenças registadas entre as folhas jovens e as folhas maduras em déficit hídrico não parecem ter tido influência na capacidade de recuperação da actividade fotossintética, que foi idêntica.

3.5. Referências bibliográficas

Adams III W. W., Demmig-Adams B. (1992). Operation of the xanthophyll cycle in higher plants in response to diurnal changes in incident sunlight. *Planta*, **186**: 390-398.

Aparicio-Tejo P. M., Boyer J. S. (1983). Significance of accelerated leaf senescence at low water potentials for water loss and grain yield in maize. *Crop Science*, **23**: 1198-1202.

- Asada K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**: 601-639.
- Azcón-Bieto J. (1983). Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. *Plant Physiology*, **73**: 681-686.
- Baker N. R. (1991). A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, **81**: 563-570.
- Bartosz G. (1997). Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, **19**: 47-64.
- Ben G.-Y., Osmond C. B., Sharkey T. D. (1987). Comparisons of photosynthetic responses of *Xanthium strumarium* and *Helianthus annuus* to chronic and acute water stress in sun and shade. *Plant Physiology*, **84**: 476-482.
- Biehler K., Fock H. (1996). Evidence for the contribution of the Mehler-Peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. *Plant Physiology*, **112**: 265-272.
- Boo Y. C., Jung J. (1999). Water deficit-induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice. *Journal of Plant Physiology*, **155**: 255-261.
- Bowler C., Van Montagu M., Inzé D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **43**: 83-116.
- Bowyer J. R., Leegood R. C. (1997). Photosynthesis In Dey P. M., Harborne J. B. (eds). *Plant Biochemistry*. Academic Press Ltd. Londres, Reino Unido, p. 49-110.
- Boyer J. S. (1971). Nonstomatal inhibition of photosynthesis in sunflower at low leaf water potentials and high light intensities. *Plant Physiology*, **48**: 532-536.
- Boyer J. S., Bowen B. L. (1970). Inhibition of oxygen evolution in chloroplasts isolated from leaves with low water potentials. *Plant Physiology*, **45**: 612-615.
- Calatayud P.-A., Llovera E., Bois J. F., Lamaze T. (2000). Photosynthesis in drought-adapted cassava. *Photosynthetica*, **38**: 97-104.
- Chaves M. M. (1991). Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*, **42**: 1-16.
- Chaves M. M., Maroco J. P., Pereira J. S. (2003). Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, **30**: 239-264.
- Choudhury N. K., Behera R. K. (2001). Photoinhibition of photosynthesis: Role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents. *Photosynthetica*, **39**: 481-488.
- Cornic G., Massacci A. (1996). Leaf photosynthesis under drought stress. In Baker N. R. (ed.) *Photosynthesis and the Environment*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Vol. 5, p. 347-366.

Cornic G. (2000). Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture - not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science*, **5**: 187-188.

Cornic G., Fresneau C. (2002). Photosynthetic carbon reduction and carbon oxidation cycles are the main electron sinks for photosystem II activity during a mild drought. *Annals of Botany*, **89**: 887-894.

Dancer J., David M., Stitt M. (1990). Water stress leads to a change of partitioning in favour of sucrose in heterotrophic cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Plant Cell and Environment*, **13**: 957-963.

Davies W. J., Zhang J. (1991). Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **42**: 55-76.

David M. M., Coelho D., Barrote I., Correia M. J. (1998). Leaf age effects on photosynthetic activity and sugar accumulation in droughted and rewatered *Lupinus albus* plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, **25**: 299-306.

Davison I. R., Pearson G. A. (1996). Stress tolerance in intertidal seaweeds. *Journal of Phycology*, **32**: 197-211.

Demmig-Adams B., Adams III W. W. (1992). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **43**: 599-626.

Demmig-Adams B., Adams III W. W. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, **1**: 21-26.

Demmig-Adams B., Adams III W. W., Barker D. H., Logan B. A., Bowling D. R., Verhoeven A. S. (1996). Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum*, **98**: 253-264.

Dreesmann D. C., Harn C., Daie J. (1994). Expression of genes encoding Rubisco in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants subjected to gradual desiccation. *Plant Cell Physiology*, **35**: 645-653.

Escalona J. M., Flexas J., Medrano H. (1999). Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Australian Journal of Plant Physiology*, **26**: 421-433.

Flexas J., Medrano H. (2002a). Drought-inhibition of photosynthesis in C₃ plants: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany*, **89**: 183-189.

Flexas J., Medrano H. (2002b). Energy dissipation in C₃ plants under drought. *Functional Plant Biology*, **29**: 1209-1215.

Foyer C. H., Noctor G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, **119**: 355-364.

Foyer C., Noctor G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*, **28**: 1056-1071.

- Jimenez C., Mitchell V. J., Lawlor D. W. (1992). Regulation of photosynthetic rate of two sunflower hybrids under water stress. *Plant Physiology*, **98**: 516-524.
- Govindjee (1995). Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll *a* fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology*, **22**: 131-160.
- Gunasekera D., Berkowitz G. A. (1992). Heterogenous stomatal closure in response to leaf water deficits is not a universal phenomenon. *Plant Physiology*, **98**: 660-665.
- Gunasekera D., Berkowitz G. A. (1993). Use of transgenic plants with Ribulose-1,5-Biphosphate Carboxylase/Oxygenase antisense DNA to evaluate the rate limitation of photosynthesis under water stress. *Plant Physiology*, **103**: 629-635.
- Haupt-Herting S., Klug K., Fock H. P. (2001). A new approach to measure gross CO₂ fluxes in leaves. Gross CO₂ assimilation, photorespiration, and mitochondrial respiration in the light in tomato under drought stress. *Plant Physiology*, **126**: 388-396.
- Havaux M., Bonfils J. P., Lutz C., Niyogi K. K. (2000). Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the npq1 *Arabidopsis* mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Plant Physiology*, **124**: 273-284.
- Henzler T., Ye Q., Steudle E. (2004). Oxidative gating of water channels (aquaporins) in *Chara* by hydroxyl radicals. *Plant, Cell and Environment*, **27**: 1184-1195.
- Hodges D. M., 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*, **207**: 604-611.
- Hoekstra F. A., Golovina E. A., Buitink J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, **6**: 431-438.
- Ingram J., Bartels D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**: 377-403.
- Jung S. (2004). Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. *Plant Science*, **166**: 459-466.
- Kaiser W. M. (1987). Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum*, **71**: 142-149.
- Kawamitsu Y., Driscoll S., Boyer J. S. (2000). Stress tolerance in intertidal seaweeds. *Plant and Cell Physiology*, **41**: 344-353.
- Kozaki A., Takeba A. (1996). Photorespiration protects C₃ plants from photooxidation. *Nature*, **384**: 557-560.
- Krall J. P., Edwards G. E. (1992). Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves. *Physiologia Plantarum*, **86**: 180-187.

- Lawlor D. W. (2002). Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: Stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany*, **89**: 871-885.
- Lawlor D. W., Cornic G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell and Environment*, **25**: 275-294.
- Li X.-P., Bjorkman O., Shih C., Grossman A. R., Rosenquist M., Jansson S., Niyogi K. K. (2000). A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature*, **403**: 391-395.
- Li X.-P., Gilmore A. M., Niyogi K. K. (2002). Molecular and global time-resolved analysis of a psbS gene dosage effect on pH- and xanthophyll cycle-dependent nonphotochemical quenching in photosystem II. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**: 33590-33597.
- Lichtenthaler H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*, **148**: 349-382.
- Long S. P., Humphries S., Falkowski P. G. (1994). Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **45**: 633-662.
- Makino A., Miyake C., Yokota A. (2002). Physiological functions of the water-water cycle (Mehler reaction) and the cyclic electron flow around PSI in rice leaves. *Plant and Cell Physiology*, **43**: 1017-1026.
- Mascher R., Nagy E., Lippmann B., Hornlein S., Fischer S., Scheiding W., Neaogoe A., Bergmann H. (2005). Improvement of tolerance to paraquat and drought in barley (*Hordeum vulgare* L.) by exogenous 2-aminoethanol: effects on superoxide dismutase activity and chloroplast ultrastructure. *Plant Science*, **168**: 691-698.
- Matile P., Duggelin T., Schellenberg M., Rentsch D., Bortlik K., Peisker C., Thomas H. (1989). How and why is chlorophyll broken down in senescent leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, **27**: 595-604.
- Medrano H., Bota J., Abadía A., Sampol B., Escalona J. M., Flexas J. (2002). Effects of drought on light-energy dissipation mechanisms in high-light-acclimated, field-grown grapevines. *Functional Plant Biology*, **29**: 1197-1207.
- Merzlyak M. N., Gitelson A. (1995). Why and what for the leaves are yellow in autumn? On the interpretation of optical spectra of senescing leaves (*Acer platanoides* L.). *Journal of Plant Physiology*, **145**: 315-320.
- Morosinotto T., Caffarri S., Dall'Osto L., Bassi R. (2003). Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids. *Physiologia Plantarum*, **119**: 347-354.
- Muller J., Sprenger N., Bortlik K., Boller T., Wiemken A. (1997). Desiccation increases sucrose levels in *Ramonda* and *Haberlea*, two genera of resurrection plants in Gesneriaceae. *Physiologia Plantarum*, **100**: 153-158.
- Muller P., Li X.-P., Niyogi K. K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, **125**: 1558-1566.

- Munns R., Weir R. (1981). Contribution of sugars to osmotic adjustment in elongating and expanded zones of wheat leaves during moderate water deficits at two light levels. *Australian Journal of Plant Physiology*, **8**: 93-105.
- Navari-Izzo F., Ricci F., Vazzana C., Quartacci M. F. (1995). Unusual composition of thylakoid membranes of the resurrection plant *Boea hygroskopica*: Changes in lipids upon dehydration and rehydration. *Physiologia Plantarum*, **94**: 135-142.
- Niyogi K. K. (2000). Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**: 455-460.
- Noctor G., Veljovic-Jovanovic S., Driscoll S., Novitskaya L., Foyer C. (2002). Drought and oxidative load in the leaves of C₃ plants: a predominant role for photorespiration? *Annals of Botany*, **89**: 841-850.
- Ögren E. (1991). Prediction of photoinhibition of photosynthesis from measurements of fluorescence quenching components. *Planta*, **184**: 538-544.
- Olsson M. (1995). Alterations in lipid composition, lipid peroxidation and anti-oxidative protection during senescence in drought stressed plants and non-drought stressed plants of *Pisum sativum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **33**: 547-553.
- O'Neill S. (1983). Role of osmotic potential gradients during water stress and leaf senescence in *Fragaria virginiana*. *Plant Physiology*, **72**: 931-937.
- Osmond C. B., Grace S. C. (1995). Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*, **46**: 1351-1362.
- Pankovic D., Sakac Z., Kevresan S., Plesnicar M. (1999). Acclimation to long-term water deficit in the leaves of two sunflower hybrids: photosynthesis, electron transport and carbon metabolism. *Journal of Experimental Botany*, **50**: 127-138.
- Pelah D., Wang W., Altman A., Shoseyov O., Bartels D. (1997). Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response. *Physiologia Plantarum*, **99**: 153-159.
- Pogson B. J., Niyogi K. K., Bjorkman O., DellaPenna D. (1998). Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in *Arabidopsis* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**: 13324-13329.
- Polle A. (1996). Mehler reaction: friend or foe in photosynthesis? *Botanica Acta*, **109**: 84-89.
- Pshibytko N. L., Kalitukho L. N., Kabashnikova L. F. (2003). Effects of high temperature and water deficit on photosystem II in *Hordeum vulgare* leaves of various ages. *Russian Journal of Plant Physiology*, **50**: 44-51.
- Quick W. P., Chaves M. M., Wendler R., David M., Rodrigues M. L., Passarinho J. A., Pereira J. S., Adcock M., Leegood R. C., Stitt M. (1992). The effect of water stress on photosynthetic

carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant Cell and Environment*, **15**: 25-35.

Römer S. (1999). Carotenoids in higher plants and algae. In Argyroudi-Akoyunoglou J. H., Senger H. (eds.) *Chloroplast: from molecular biology to biotechnology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, p. 217-223.

Sheen J. (1990). Metabolic repression of transcription in higher plants. *The Plant Cell*, **2**: 1027-1038.

Smart C. M. (1994). Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist*, **126**: 419-448.

Tang A.-C., Kawamitsu Y., Kanechi M., Boyer J. S. (2002). Photosynthetic oxygen evolution at low water potential in leaf discs lacking an epidermis. *Annals of Botany*, **89**: 861-870.

Tausz M., Sircelj H., Grill D. (2004). The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *Journal of Experimental Botany*, **55**: 1955-1962.

Tezara W., Mitchell V. J., Driscoll S. D., Lawlor D. W. (1999). Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, **401**: 914-917.

Weber H., Chételat A., Reymond P., Farmer E. E. (2004). Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *The Plant Journal*, **37**: 877-888.

Wingler A., Quick W. P., Bungard R. A., Bailey K. J., Lea P. J., Leegood R. C. (1999). The role of photorespiration during drought stress: an analysis utilizing barley mutants with reduced activities of photorespiratory enzymes. *Plant Cell and Environment*, **22**: 361-373.

Wingler A., Lea P. J., Quick W. P., Leegood R. C. (2000). Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, **355**: 1517-1529.

Zrenner R., Stitt M. (1991). Comparison of the effect of rapidly and gradually developing water-stress on carbohydrate metabolism in spinach leaves. *Plant Cell and Environment* **14**: 939-946.

Capítulo 4

Efeitos da diminuição temporária da intensidade luminosa na resposta ao déficit hídrico e na capacidade de recuperação da fotossíntese durante a rehidratação de plantas de *Helianthus annuus* L.

4.1. Introdução

As limitações à aquisição de CO₂ verificadas em plantas em défice hídrico podem conduzir a situações em que as taxas de absorção de fótons excedem a capacidade de utilização de energia de excitação no transporte fotossintético de electrões. O excesso de energia de excitação resulta na formação de espécies reactivas de oxigénio, responsáveis por danos mais ou menos reversíveis nos componentes do aparelho fotossintético (Niyogi 2000, Ort 2001). No entanto, as plantas possuem mecanismos que lhes permitem dissipar a energia em excesso seja por transferência directa da clorofila para os carotenóides (Govindjee 1995), ou através da activação da proteína Psbs (Li *et al.* 2000a, 2000b) ou ainda da activação do ciclo de desepoxidação das xantofilas (Demmig-Adams e Adams 1992). Tradicionalmente, a activação destes mecanismos tem sido associada à exposição das plantas a intensidades luminosas altas (Demmig-Adams e Adams 1996, Niyogi 2000, Morosinotto *et al.* 2003). De facto, na natureza, a imposição de uma situação de défice hídrico é normalmente acompanhada por irradiâncias altas, mas a rehidratação é feita pela chuva e, por isso, a irradiâncias baixas ou, em caso de aguaceiros, sob condições de grande alternância de densidades de fluxo quântico. A tolerância à secura pressupõe não só a preservação dos componentes celulares essenciais e das suas relações funcionais durante o período de desidratação, mas também durante a rehidratação. Requer também um controlo preciso do metabolismo que permita a manutenção das funções essenciais durante o período de stresse, e possibilite a reconstrução e reabilitação da maquinaria celular que tenha sido afectada durante o período de défice hídrico, de modo a que seja possível o restabelecimento fisiológico dos tecidos e da planta.

Os trabalhos realizados sobre os efeitos do défice hídrico e da rehidratação em plantas, relacionados com a fotossíntese, têm tido como objecto de estudo tanto tecidos vegetais isolados (Kaiser, 1987) como plantas inteiras. Nos estudos feitos com plantas inteiras têm sido frequentemente utilizadas ‘ressurrection plants’ (Navari-Izzo *et al.* 1995, Dalla Vecchia *et al.* 1998, Di Blasi *et al.* 1998, Proctor e Tuba 2002, Kranner *et al.* 2002, Collet *et al.* 2003, entre outros) e também algumas mesófitas e esclerófitas. Entre estas, encontram-se *Vitis vinifera* L. (Quick *et al.* 1992), *Lupinus albus* L. (Quick *et al.* 1992, David *et al.* 1998), *Beta vulgaris* L. (Dreesmann *et al.* 1994), *Lotus corniculatus* L. e *Cerastium fontanum* Baumg. (Olsson *et al.* 1996), *Triticum aestivum* L. (Bartoli *et al.* 1999), *T. durum* Desf. (Loggini *et al.* 1997, 1999), *Nicotiana tabacum* L. (Riga e Vartanian 1999), *Arabidopsis thaliana* L. (Jung 2004), algumas espécies C₄ (Heckathorn *et al.* 1997) e, mais recentemente, plântulas de oliveira (esclerófita) e de híbridos de prunóideas (Sofo *et al.* 2004,2005). Estes trabalhos foram levados a cabo sob condições experimentais variadas que incluíam as condições naturais de campo, a cultura sob abrigo

(estufas com cobertura de vidro ou de plástico) e a cultura em câmaras de crescimento de ambiente controlado. Na maior parte dos casos a rehidratação foi feita nas mesmas condições de luz em que tinha sido imposto o défice hídrico, excepto nos ensaios de Sofo *et al.* (2004, 2005) em que a rehidratação foi realizada em plantas submetidas a 60 % ou a 30% da irradiância à qual tinha sido imposto o défice hídrico. Poucos têm sido os trabalhos realizados com o objectivo de conhecer melhor as consequências destas variações de intensidade luminosa no comportamento das plantas em défice hídrico e na sua capacidade de recuperação após o alívio do stresse. Entre estes encontram-se os trabalhos de Ben *et al.* (1987) e de Sofo *et al.* (2004, 2005). Segundo Ben *et al.* (1987), a diminuição da capacidade fotossintética e do rendimento quântico das plantas em défice hídrico parecem ser independentes da intensidade luminosa a que as plantas foram expostas durante o stresse. No trabalho de Sofo *et al.* (2004), realizado com plântulas de oliveira, os autores registaram o decréscimo da taxa fotossintética e o aumento do teor foliar em dialdeído malónico (MDA), indicador da existência de stresse oxidativo, e da actividade das enzimas do sistema antioxidante nas plantas em défice hídrico, e verificaram que a recuperação das plantas rehidratadas a alta intensidade luminosa foi mais lenta do que a das rehidratadas a baixa irradiância, aparentemente devido à menor necessidade de remoção das espécies activas de oxigénio nestas últimas. Num trabalho idêntico realizado com prunóideas com um ano de idade, Sofo *et al.* (2005) obtiveram resultados semelhantes.

O decréscimo das taxas fotossintéticas nas folhas em défice hídrico repercute-se na diminuição da sua capacidade de produção de fotoassimilados (Daie 1996). No entanto, o decréscimo das taxas de exportação, observado em condições de défice hídrico por vários autores (Quick *et al.* 1992, Pelleschi *et al.* 1997), reflecte-se na acumulação de açúcares solúveis nas folhas (Munns e Weir 1981, Premachandra e Joly 1992, Wang *et al.* 1994), havendo evidências de que estes metabolitos reprimem a expressão de alguns genes relacionados com a actividade fotossintética (Sheen 1990). Por outro lado, os açúcares solúveis encontram-se entre os metabolitos que contribuem para a manutenção da turgescência celular (Hsiao 1973, Ingram e Bartels 1996) e há indícios de que a sacarose contribui na manutenção da integridade das membranas, estrutura de proteínas e da actividade enzimática em tecidos desidratados (Ingram e Bartels 1996, Hoekstra 2001). No entanto, quando as plantas são colocadas sob densidades de fluxo quântico bastante inferiores àquelas a que estão aclimatadas, verifica-se o decréscimo das taxas de fotossíntese (Zhao e Oosterhuis 1998) e do teor foliar em hidratos de carbono não estruturais (Veneklaas e den Ouden 2005), pelo que não será de esperar que ocorra limitação da actividade fotossintética devida à acumulação de açúcares solúveis.

Os trabalhos realizados no âmbito deste capítulo tiveram como objectivo analisar os efeitos da diminuição transitória da densidade de fluxo quântico na resposta das plantas ao défice hídrico e na sua capacidade de recuperação.

4.2. Material e métodos

Para este estudo foi utilizado o ensaio referenciado no capítulo 2 como Gir02. Por se pretender avaliar o efeito de períodos de iluminação de baixa intensidade na actividade fotossintética de plantas submetidas a défice hídrico e rehidratação, foi necessário utilizar como referência no presente capítulo os dados obtidos em folhas completamente expandidas mantidas nas condições de crescimento, já apresentados no capítulo 3.

Neste estudo foram utilizadas plantas de *Helianthus annuus* que se desenvolveram em vasos numa câmara de crescimento ‘walk-in’ com fotoperíodo de 12h, irradiância máxima de $700 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura e humidade relativa diurnas de $25^\circ\text{C}/60\%$ e temperatura/humidade relativa nocturnas de $22^\circ\text{C}/70\%$. Iniciou-se a imposição do défice hídrico 19 dias depois da sementeira e foram retiradas amostras de plantas bem hidratadas, de plantas submetidas a dois níveis de défice hídrico (um, mais ligeiro, imposto durante nove dias, DHm; outro, mais severo e prolongado, imposto durante quinze dias, DHs) e 24 (R24) e 48 horas (R48) depois da rehidratação do substrato. O défice hídrico foi imposto através da reposição parcial do peso perdido por evapotranspiração. Nas plantas testemunha (C) repôs-se sempre na íntegra o peso perdido por evapotranspiração. Procedeu-se à rehidratação com várias regas, de forma a garantir a hidratação homogénea de todo o substrato contido nos vasos.

Nos dias de amostragem, metade das plantas permaneceram nas condições de crescimento, na câmara ‘walk-in’ (L700), enquanto a outra metade foi transferida, de véspera, para uma outra câmara de crescimento com as mesmas condições de humidade relativa e temperatura mas com irradiância máxima inferior ($200 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$; L150).

Foram amostradas folhas completamente expandidas (em início de expansão no início da imposição do défice hídrico) a que correspondeu uma posição na planta, por contagem acrópeta, de 6.2 ± 0.4 num total de 10.8 ± 0.6 folhas nas plantas controlo, 5.9 ± 0.3 num total de 10.3 ± 0.7 nas plantas sob défice hídrico menos intenso, 7.4 ± 0.5 em 14.4 ± 0.9 folhas nas plantas em défice hídrico mais severo, e 6.9 ± 0.6 em 13.8 ± 1.2 folhas e 8.0 ± 0.5 em 16.3 ± 0.8 folhas, 24 h e 48 h depois da rehidratação do substrato, respectivamente (valores apresentados sob a forma de média mais ou menos desvio padrão).

A determinação do teor relativo em água foliar (TRA) e da massa foliar específica (SLM), a medição do potencial hídrico foliar (Ψ), das trocas gasosas em condições ambiente e dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, assim como a quantificação do teor foliar em amido, açúcares solúveis, pigmentos fotossintéticos e dialdeído malónico (MDA), foram realizadas tal como descrito no capítulo 2, bem como o tratamento estatístico dos dados.

4.3. Resultados

Caracterização do estado hídrico das plantas e massa foliar específica.

A restrição gradual da dotação de rega resultou no decréscimo significativo do potencial hídrico foliar (Ψ) em ambos os níveis de défice hídrico, tendo as plantas em stresse colocadas a intensidade luminosa mais baixa (L150) exibido potenciais hídricos foliares (Ψ) significativamente superiores aos das plantas colocadas a intensidade luminosa mais alta (L700). Enquanto no nível de défice hídrico menos prolongado e menos intenso (DHm) os decréscimos de Ψ não ultrapassaram 0.3 MPa, nas plantas sob stresse mais intenso e prolongado (DHs) Ψ decresceu 1 MPa relativamente à testemunha nas plantas mantidas sob irradiância mais alta e 0.6 MPa nas plantas transferidas para a irradiância mais baixa (Fig. 4.1).

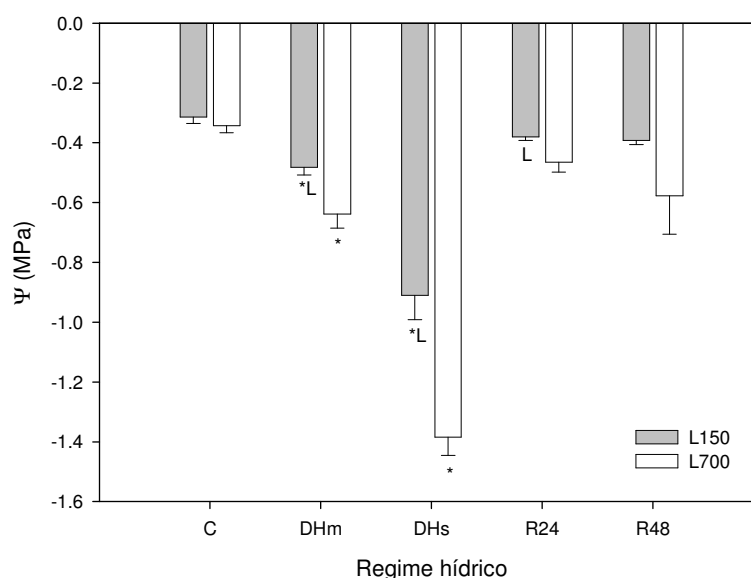


Figura 4.1 – Potencial hídrico (Ψ) em folhas completamente expandidas expostas a baixa (L150: 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a alta intensidade luminosa (L700: 700 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de plantas de *H. annuus* controlo (C), sujeitas a défice hídrico moderado (DHm) e severo (DHs) e 24 (R24) e 48 (R48) horas após a rehidratação do substrato. Valores médios \pm erro padrão ($n = 5$). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$). A letra (L) indica diferenças significativas entre as médias dos dois níveis de intensidade luminosa (teste *t* de Student, $\alpha = 0.05$).

Depois da rehidratação do substrato os potenciais hídricos foliares recuperaram para valores semelhantes aos das plantas testemunha (Fig. 4.1).

Os ligeiros decréscimos de Ψ nas plantas DHm foram acompanhados pela manutenção do teor relativo em água foliar (TRA; Tabela IV.1). No fim do período de desidratação TRA foi inferior a 70% nas plantas mantidas a irradiância alta, enquanto nas plantas L150 se manteve próximo de 80% (Tabela IV.1). Depois da rehidratação do substrato TRA readquiriu valores próximos dos exibidos pelas plantas controlo.

Tabela IV.1 – Teor relativo em água (TRA) e massa específica foliar (SLM) em folhas completamente expandidas de *H. annuus* controlo (C), sujeitas a défice hídrico moderado (DHm) e severo (DHs) 24 (R24) e 48 (R48) horas depois da rehidratação do substrato colocadas a 150 (L150) e a 700 (L700) $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Valores médios \pm erro padrão (n=5). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$). A letra (L) indica diferenças significativas entre as médias dos dois níveis de intensidade luminosa (teste *t* de Student, $\alpha = 0.05$)

	Regime hídrico	L150	L700
TRA (%)	C	84.6 \pm 0.9	85.9 \pm 1.4
	DHm	84.7 \pm 1.0	83.0 \pm 1.6
	DHs	79.0 ^{*L} \pm 2.2	69.2 [*] \pm 1.7
	R24	91.3 ^{*L} \pm 0.3	88.4 \pm 0.7
	R48	90.3 ^{*L} \pm 1.8	84.9 \pm 1.5
SLM ($\text{g}_\text{p} \text{ m}^{-2}$)	C	27.8 \pm 1.1	27.8 \pm 0.5
	DHm	27.6 \pm 1.2	30.6 \pm 0.8
	DHs	35.7 ^{*L} \pm 0.9	40.1 [*] \pm 1.4
	R24	32.4 ^{*L} \pm 0.6	36.2 [*] \pm 1.2
	R48	30.9 \pm 1.2	34.3 [*] \pm 1.9

A massa foliar específica (SLM) aumentou significativamente nas folhas em défice hídrico mais intenso (Tabela IV.1), principalmente nas plantas mantidas a alta irradiância. Após a rehidratação SLM reduziu mas não voltou a atingir valores iguais aos observados nas plantas testemunha.

A transição das plantas para baixa intensidade luminosa atenuou as diferenças existentes entre as plantas em défice hídrico e as plantas testemunha.

Trocas gasosas

Nas plantas mantidas a alta intensidade luminosa, a imposição menos prolongada e menos intensa do défice hídrico induziu pequenas diminuições da condutância estomática (*g*) e da taxa líquida de fotossíntese (NP), mas a concentração intercelular de dióxido de carbono (C_i) não se alterou (Fig. 4.2). O prolongamento e intensificação do défice hídrico provocaram o decréscimo significativo de *g* e de NP para 10% e 20% dos valores registados nas plantas controlo, respectivamente, não se tendo registado redução significativa de C_i (Fig. 4.2). Depois

da rehidratação g recuperou mas NP recuperou apenas parcialmente, mantendo, 48h depois da rehidratação, taxas inferiores às exibidas pelas plantas testemunha.

Nas plantas transferidas para baixa intensidade luminosa não foram registadas alterações de g , NP ou C_i nas plantas submetidas ao défice hídrico menos prolongado e intenso. O agravamento do défice hídrico reflectiu-se no decréscimo de g para 35% dos valores controlo mas não se registaram efeitos nem em NP nem em C_i (Fig. 4.2). Depois da rehidratação do substrato g recuperou para valores semelhantes aos das plantas controlo.

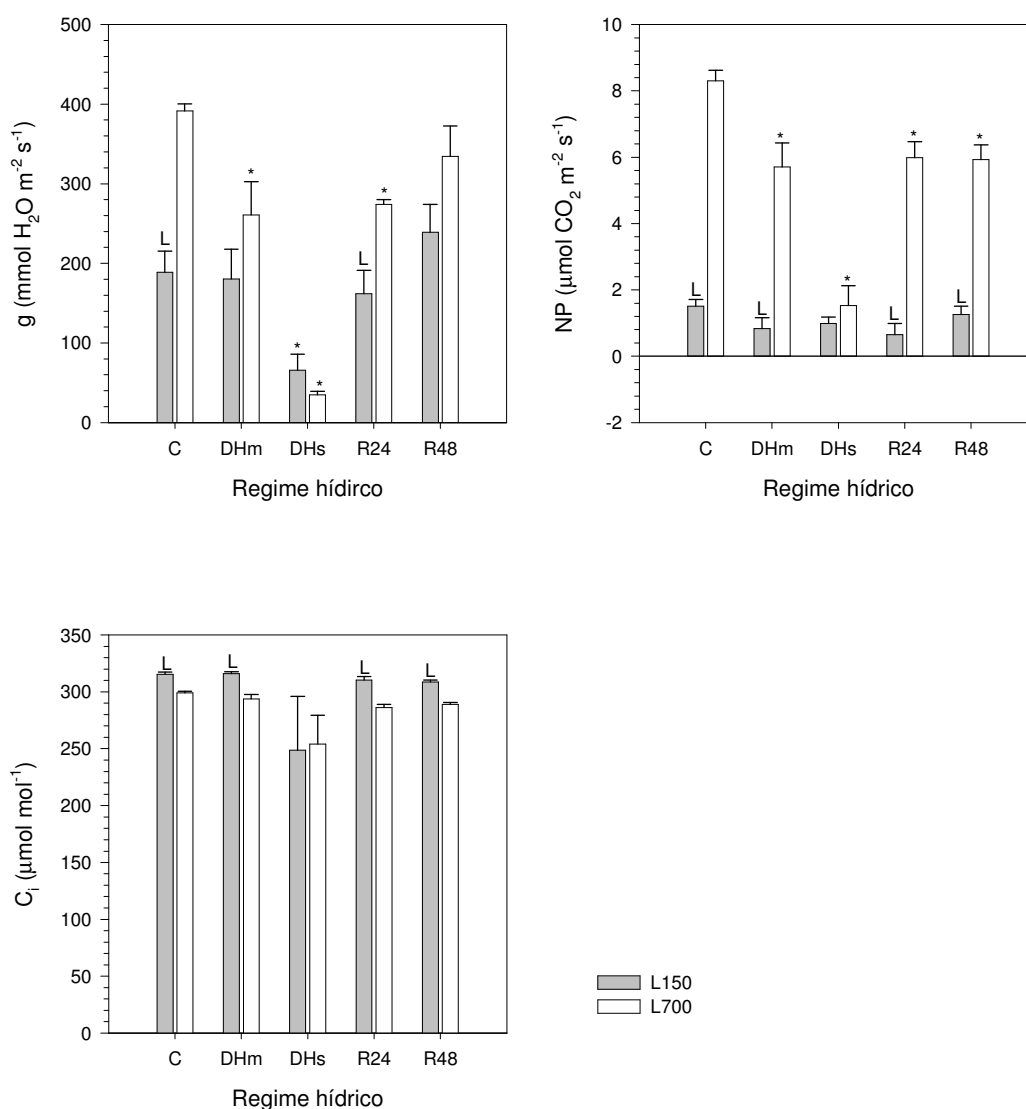


Figura 4.2 – Condutância estomática (g), taxa fotossintética líquida (NP) e pressão parcial de dióxido de carbono nos espaços intercelulares (C_i) medidas em folhas completamente expandidas a 150 (L150) e a 700 (L700) $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em plantas de *H. annuus* controlo (C), sujeitas a défice hídrico moderado (DHm) e severo (DHs) 24 (R24) e 48 (R48) horas após a rehidratação do substrato. Valores médios \pm erro padrão ($n = 5$). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$). A letra (L) indica diferenças significativas entre as médias dos dois níveis de intensidade luminosa (teste t de Student, $\alpha = 0.05$).

Fluorescência da clorofila a, pigmentos do ciclo das xantofilas e pigmentos fotossintéticos

A eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II manteve-se sempre alta, entre 0.84 e 0.87, independentemente do regime hídrico ou da intensidade luminosa a que as plantas foram submetidas (Fig. 4.3). Nas plantas mantidas sob intensidade luminosa mais elevada não foram observadas alterações estatisticamente significativas nos parâmetros da fluorescência da clorofila *a* impostas pelo défice hídrico (Fig. 4.3). Apesar disso, registou-se o aumento do NPQ, ao qual se associaram pequenos decréscimos de F'_v/F'_m , qP e ϕ_{PSII} , nas plantas sob stresse mais longo e intenso, que se esbateram durante a rehidratação. Estas pequenas variações de F'_v/F'_m , qP e ϕ_{PSII} não foram observadas nas plantas colocadas a intensidade luminosa mais baixa, nas quais só o NPQ subiu significativamente, relativamente às plantas testemunha, nas plantas sob stresse mais severo (Fig. 4.3). Depois da rehidratação NPQ recuperou para valores iguais aos das plantas testemunha.

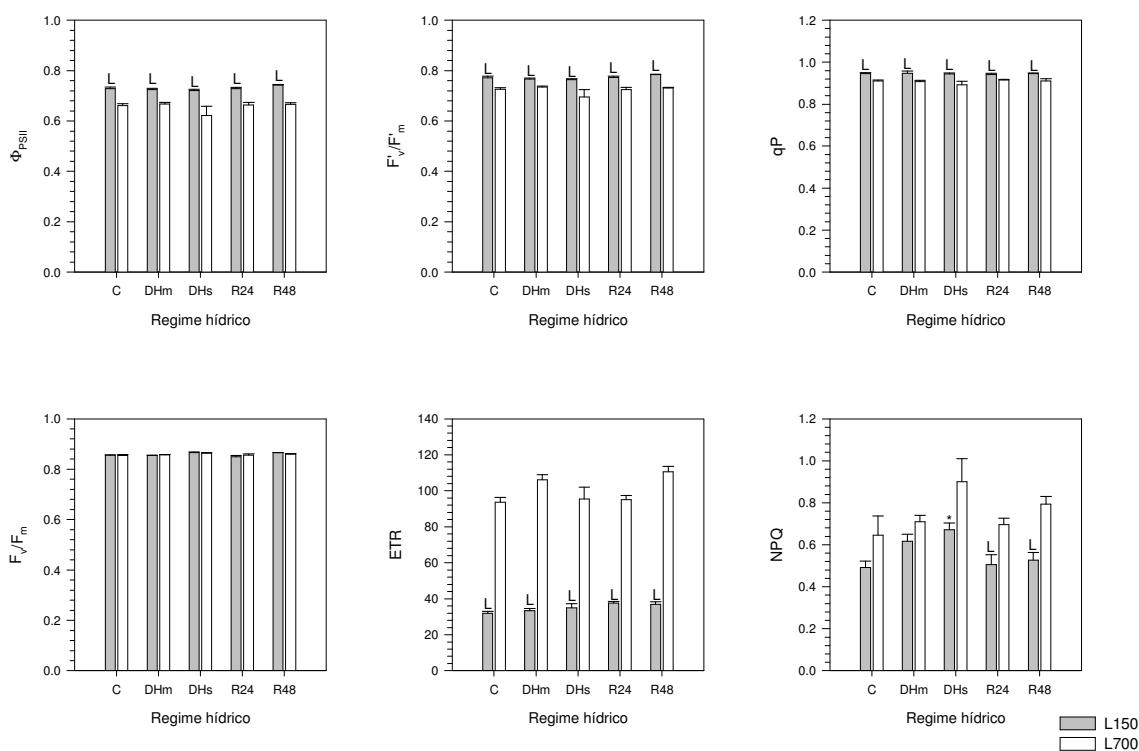


Figura 4.3 – Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em folhas completamente expandidas de plantas *H. annuus* controlo (C), em défice hídrico (DH) moderado (DHm) e severo (DHs) e 24 (R24) e 48 (R48) horas após a rehidratação do substrato no ensaio realizado em 2002 (Gir02). Valores médios \pm erro padrão ($n=5$). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnet, $\alpha= 0.05$). A letra (L) indica diferenças significativas entre as médias dos dois níveis de intensidade luminosa (teste *t* de Student, $\alpha = 0.05$).

A transferência das plantas para a intensidade luminosa mais baixa reflectiu-se em Φ_{PSII} , F_v/F_m e qP superiores e em NPQ inferior aos observados nas plantas sob intensidade luminosa mais alta, sendo a diferença entre os dois regimes luminosos superior nas plantas em stresse.

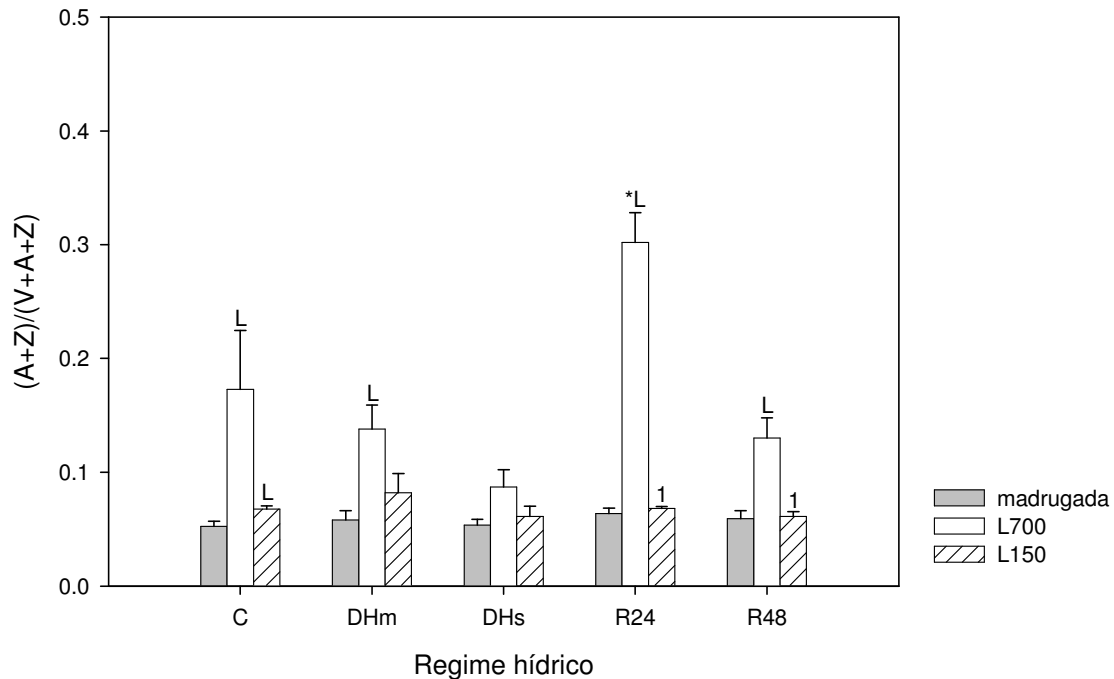


Figura 4.4 – Índice de desepoxidação dos pigmentos do ciclo das xantofilas $[(A+Z)/(V+A+Z)]$ de madrugada, a 150 (L150) e a 700 (L700) $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em folhas completamente expandidas de plantas de *H. annuus* controlo (C), submetidas a défice hídrico moderado (DHm) e severo (DHs) e 24 (R24) e 48 (R48) horas após a rehidratação do substrato. Valores médios \pm erro padrão ($n = 5$). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$). A letra (L) indica diferenças significativas entre as médias das de cada nível de luz e a madrugada (teste t de Student, $\alpha = 0.05$). O número (1) indica diferenças significativas entre os dois níveis de luz (teste t de Student, $\alpha = 0.05$).

De madrugada e nas plantas colocadas a baixa intensidade luminosa, o índice de desepoxidação $(A+Z)/(V+A+Z)$ não sofreu qualquer alteração com os diferentes regimes hídricos. Nas plantas mantidas a intensidade luminosa mais alta, $(A+Z)/(V+A+Z)$ manteve uma tendência decrescente ao longo da imposição do défice hídrico e aumentou significativamente nas primeiras 24h de rehidratação, tendo recuperado para valores próximos dos das plantas controlo nas 24h seguintes. Nestas plantas o índice de desepoxidação aumentou sempre da madrugada para o meio-dia, enquanto nas plantas transferidas para intensidade luminosa baixa esse aumento praticamente não se verificou. Estes dados indicam que a baixa intensidade luminosa a que se encontravam a plantas L150 foi limitante às

reações de desepoxidação da violaxantina e da anteraxantina e os efeitos conjuntos do déficit hídrico com a irradiância mais alta foram atenuados durante a noite. As plantas mantidas sob condições de fluxo quântico mais elevado exibiram índices de desepoxidação dos pigmentos do ciclo das xantofilas sempre superiores aos das plantas transferidas para irradiância baixa (Fig. 4.4).

A observação simultânea das Figs. 4.3 (NPQ) e 4.4 sugere alguma discrepância entre os padrões de resposta da razão $(A+Z)/(V+A+Z)$ e do NPQ, sob a influência da variação simultânea da irradiância e do estado hídrico das plantas. Na tabela IV.2 são apresentados os resultados de um teste de correlação de Spearman entre o índice de desepoxidação e a irradiância, o NPQ e a irradiância e entre o índice de desepoxidação e o NPQ.

Tabela IV.2 – Relação entre a irradiância, o índice de desepoxidação dos pigmentos do ciclo das xantofilas $(A+Z)/(V+A+Z)$ e o ‘quenching’ não fotoquímico (NPQ) (n=50, Correlação de Spearman, $\alpha = 0.05$; P – nível de significância; rs- coeficiente de correlação)

	$(A+Z)/(V+A+Z)$	NPQ	
Irradiância	< 0.001	< 0.001	P
	0.479	0.505	rs
$(A+Z)/(V+A+Z)$		0.250	P
		0.171	rs

Os resultados expostos na Tabela IV.2 permitem concluir que quer NPQ quer $(A+Z)/(V+A+Z)$ dependem da intensidade luminosa ($P < 0.05$), aumentando quando a intensidade luminosa aumenta (rs >0). No entanto, na gama de intensidades luminosas em que se realizaram as medições de fluorescência não se verificou qualquer correlação entre o índice de desepoxidação dos pigmentos do ciclo das xantofilas e o ‘quenching’ não fotoquímico ($P > 0.05$).

Para além da análise dos pigmentos do ciclo das xantofilas, foi ainda analisado o teor foliar noutros carotenóides como o β -caroteno, a luteína e a neoxantina, bem como o teor em carotenóides totais e em clorofila total (Tabela IV.3).

Nas plantas testemunha mantidas a irradiância alta observou-se o aumento do teor em pigmentos fotossintéticos entre a madrugada e o meio-dia, aumento esse que foi significativo na clorofila total, β -caroteno e luteína (Tabela IV.3). Nas plantas testemunha transferidas para a intensidade luminosa mais baixa os teores em pigmentos fotossintéticos mantiveram-se praticamente inalterados relativamente aos observados de madrugada. Destas diferenças na evolução dos teores foliares em pigmentos da madrugada para o meio-dia entre os dois grupos de plantas, resultou que as plantas controlo, transferidas para irradiância mais baixa, exibiram

teores foliares em β -caroteno e em luteína significativamente inferiores aos exibidos pelas plantas mantidas sob a maior intensidade luminosa (Tabela IV.3); estes foram os dois únicos casos em que se registaram diferenças estatisticamente significativas nos teores foliares em pigmentos entre as plantas L150 e L700 (Tabela IV.3).

Nas plantas sob défice hídrico menos intenso e prolongado, de madrugada, registou-se o aumento do teor em pigmentos fotossintéticos, principalmente em clorofila total, luteína e carotenóides totais. No entanto não se registou alteração no teor em pigmentos entre a madrugada e o meio-dia, nas plantas L150, tal como nas plantas controlo, nem nas plantas L700 contrariamente ao sucedido nas plantas controlo (Tabela IV.3).

Tabela IV.3 – Teor em clorofila total, β -caroteno, luteína, neoxantina e carotenóides totais de folhas completamente expandidas de madrugada e a 150 (L150) e a 700 (L700) μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em plantas de *H. annuus* controlo (C), sob défice hídrico moderado (DHm) e severo (DHs) e 24 (R24) e 48 (R48) horas depois da rehidratação do substrato. Valores médios \pm erro padrão ($n = 5$). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo. A letra (L) indica diferenças significativas entre as médias de cada um dos níveis de intensidade luminosa e a madrugada (teste *t* de Student, $\alpha = 0.05$). O número (1) indica diferenças significativas entre os dois níveis de luz (teste *t* de Student, $\alpha = 0.05$).

		Clorofila <i>a+b</i> ($\mu\text{mol m}^{-2}$)	β -caroteno ($\mu\text{mol m}^{-2}$)	Luteína ($\mu\text{mol m}^{-2}$)	Neoxantina ($\mu\text{mol m}^{-2}$)	V+A+Z ($\mu\text{mol m}^{-2}$)	Carotenóides totais ($\mu\text{mol m}^{-2}$)
madrugada	C	287.0 \pm 15.7	32.2 \pm 1.6	31.2 \pm 1.2	6.70 \pm 0.37	25.1 \pm 1.7	96.4 \pm 4.7
	DHm	373.6* \pm 18.1	40.5 \pm 1.8	39.8* \pm 1.9	8.32 \pm 0.49	28.4 \pm 0.9	118.1* \pm 4.5
	DHs	390.4* \pm 21.5	44.1* \pm 1.1	37.4 \pm 1.9	8.27 \pm 0.51	24.1 \pm 0.9	114.9 \pm 4.4
	R24	296.9 \pm 28.3	33.5 \pm 3.6	31.1 \pm 2.6	6.15 \pm 0.75	22.2 \pm 2.8	93.9 \pm 9.3
	R48	314.7 \pm 12.1	34.4 \pm 1.5	28.9 \pm 0.9	6.80 \pm 0.28	22.1 \pm 1.7	93.4 \pm 4.0
L700	C	368.9 ^L \pm 28.6	40.8 ^L \pm 2.9	38.4 ^L \pm 2.4	7.21 \pm 0.41	29.7 \pm 3.6	116.9 \pm 9.2
	DHm	407.9 \pm 34.6	46.8 \pm 2.6	42.4 \pm 3.4	8.81 \pm 0.54	31.1 \pm 1.9	129.9 \pm 8.3
	DHs	560.8* ^L \pm 62.1	58.3* \pm 6.0	48.4 \pm 5.3	8.63 \pm 0.71	26.0 \pm 7.2	151.0 \pm 15.9
	R24	334.9 \pm 29.5	38.2 \pm 3.5	34.7 \pm 2.7	7.12 \pm 0.59	25.9 \pm 1.9	106.3 \pm 8.5
	R48	347.8 \pm 18.7	40.7 ^L \pm 2.2	33.1 \pm 1.6	7.45 \pm 0.37	27.6 \pm 1.8	109.9 ^L \pm 5.2
L150	C	302.2 \pm 22.9	31.9 ^L \pm 2.4	29.9 ^L \pm 2.4	6.3 \pm 0.4	24.1 \pm 2.4	93.1 \pm 7.3
	DHm	371.2 \pm 36.6	42.4 \pm 3.6	36.9 \pm 3.6	8.3 \pm 0.7	28.7 \pm 2.5	117.7 \pm 9.8
	DHs	488.2* ^L \pm 25.3	56.3* ^L \pm 2.1	47.2* ^L \pm 2.4	9.4* \pm 0.8	30.8 ^L \pm 0.9	145.1* ^L \pm 5.9
	R24	337.6 \pm 27.8	37.6 \pm 2.5	34.0 \pm 1.5	7.4 \pm 0.5	26.9 \pm 2.1	106.7 \pm 6.6
	R48	366.6 \pm 24.5	41.3 \pm 3.1	34.2 \pm 2.6	8.0 \pm 0.7	22.5 \pm 5.3	107.5 \pm 10.0

A intensificação do défice hídrico resultou no aumento significativo do teor em clorofila total e em β -caroteno de madrugada, tendo os teores em luteína, neoxantina e carotenóides totais permanecido superiores aos exibidos pelas plantas controlo (Tabela IV.3).

No entanto, neste nível de déficit hídrico, embora as plantas L700 tenham apresentado, de um modo geral, teores em clorofila e em carotenóides totais superiores (embora estatisticamente não significativos) aos das plantas L150, foi nestas últimas que se observaram os maiores incrementos no teor em pigmentos impostos pelo déficit hídrico, o qual, nas plantas sob stresse mais intenso foi significativamente superior ao exibido pelas plantas testemunha. Enquanto nas plantas reidratadas mantidas a alta intensidade luminosa os teores em pigmentos decresceram para valores semelhantes ou inferiores aos exibidos pelas plantas controlo, as plantas reidratadas transferidas para baixa intensidade luminosa mantiveram teores em pigmentos ligeiramente superiores aos das plantas testemunha. Não se observaram alterações significativas no teor em pigmentos do ciclo das xantofilas (V+A+Z) impostas por nenhum dos regimes hídricos (Tabela IV.3).

Peroxidação de lípidos (teor em dialdeído malónico ou MDA)

Nas plantas mantidas a alta irradiância, o teor em MDA aumentou com a intensificação e prolongamento do déficit hídrico, tendo, nas plantas sob stresse mais severo, sido 37% superior ao teor foliar em MDA das plantas testemunha (Fig. 4.9). Da transferência das plantas para a intensidade luminosa mais baixa resultou a manutenção da concentração foliar de MDA igual à exibida pelas plantas testemunha e significativamente inferior à

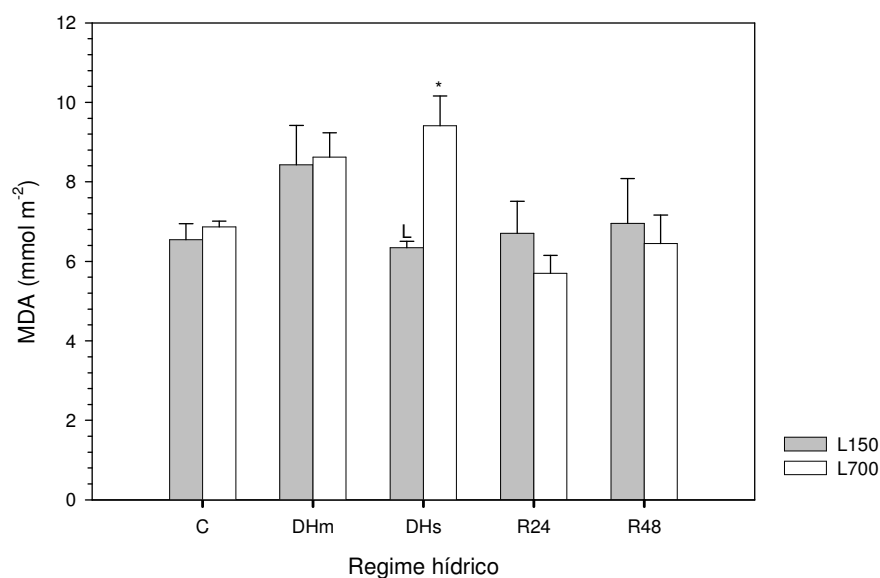


Figura 4.9 – Teor foliar em dialdeído malónico (MDA) a 150 (L150) e a 700 (L700) $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em folhas completamente expandidas de plantas de *H. annuus* controlo (C), submetidas a déficit hídrico moderado (DHm) e severo (DHs) e 24 (R24) e 48 (R48) horas após a rehidratação do substrato. Valores médios \pm erro padrão ($n = 5$). O símbolo indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$). A letra (L) indica diferenças significativas entre as médias de cada nível de luz (teste t de Student, $\alpha = 0.05$)

registada nas plantas mantidas a intensidade luminosa alta. Depois da rehidratação todas as plantas voltaram a apresentar teores foliares de MDA semelhantes aos das plantas testemunha.

Hidratos de carbono

De madrugada, em resposta à imposição do défice hídrico, ocorreu o aumento para aproximadamente o dobro da concentração foliar em açúcares solúveis totais. Com o agravamento do défice hídrico, a concentração de açúcares solúveis septuplicou devido ao acréscimo significativo quer em sacarose quer em hexoses, principalmente nestas últimas (Fig. 4.10). Nas primeiras horas depois da rehidratação do substrato, o teor foliar em açúcares totais manteve-se alto, bem como os teores em hexoses e em sacarose (Fig. 4.10). Com o prosseguimento da rehidratação, a concentração em açúcares solúveis totais decresceu um pouco mas manteve-se significativamente mais alta do que nas folhas controlo, devido à manutenção de altos teores em sacarose (Fig. 4.10). Nesta altura do dia a sacarose representava cerca de 90% dos açúcares solúveis nas plantas controlo, mas decresceu até cerca de 60% nas plantas em stresse severo. Depois da rehidratação a sacarose voltou a representar aproximadamente 90% do total de açúcares solúveis.

Nas plantas mantidas a irradiância alta e sob stresse mais severo, o teor em açúcares solúveis triplicou relativamente ao das folhas controlo, devido especialmente ao incremento em hexoses (Fig. 4.10), e manteve-se alto durante as primeiras horas de rehidratação, só tendo reduzido para valores próximos dos do controlo na R48. Nestas plantas foi registado o aumento do teor em açúcares solúveis entre a madrugada e o meio-dia em todos os regimes hídricos, excepto nas plantas em défice hídrico severo e 48 h depois da rehidratação do substrato (Fig. 4.10).

Nas plantas transferidas para a intensidade luminosa mais baixa, embora o teor em açúcares solúveis nas plantas em stresse severo tenha também sido significativamente (cerca de 4.5 vezes) superior ao das plantas controlo, nunca se registou o aumento significativo destes hidratos de carbono entre a madrugada e o meio do dia. Nestas plantas a concentração foliar de açúcares solúveis igualou a das plantas controlo nas primeiras horas de rehidratação.

Enquanto nas plantas controlo L700 os açúcares solúveis eram compostos por partes aproximadamente iguais de sacarose e de hexoses (60% e 40%, respectivamente), nas plantas transferidas para a irradiância mais baixa predominou a sacarose (85%). A imposição do défice hídrico alterou esta proporcionalidade, induzindo a predominância de sacarose nas plantas mantidas a irradiância alta, que se acentuou durante a rehidratação atingindo 90% nas plantas R48. Nas plantas L150, com a imposição do défice hídrico

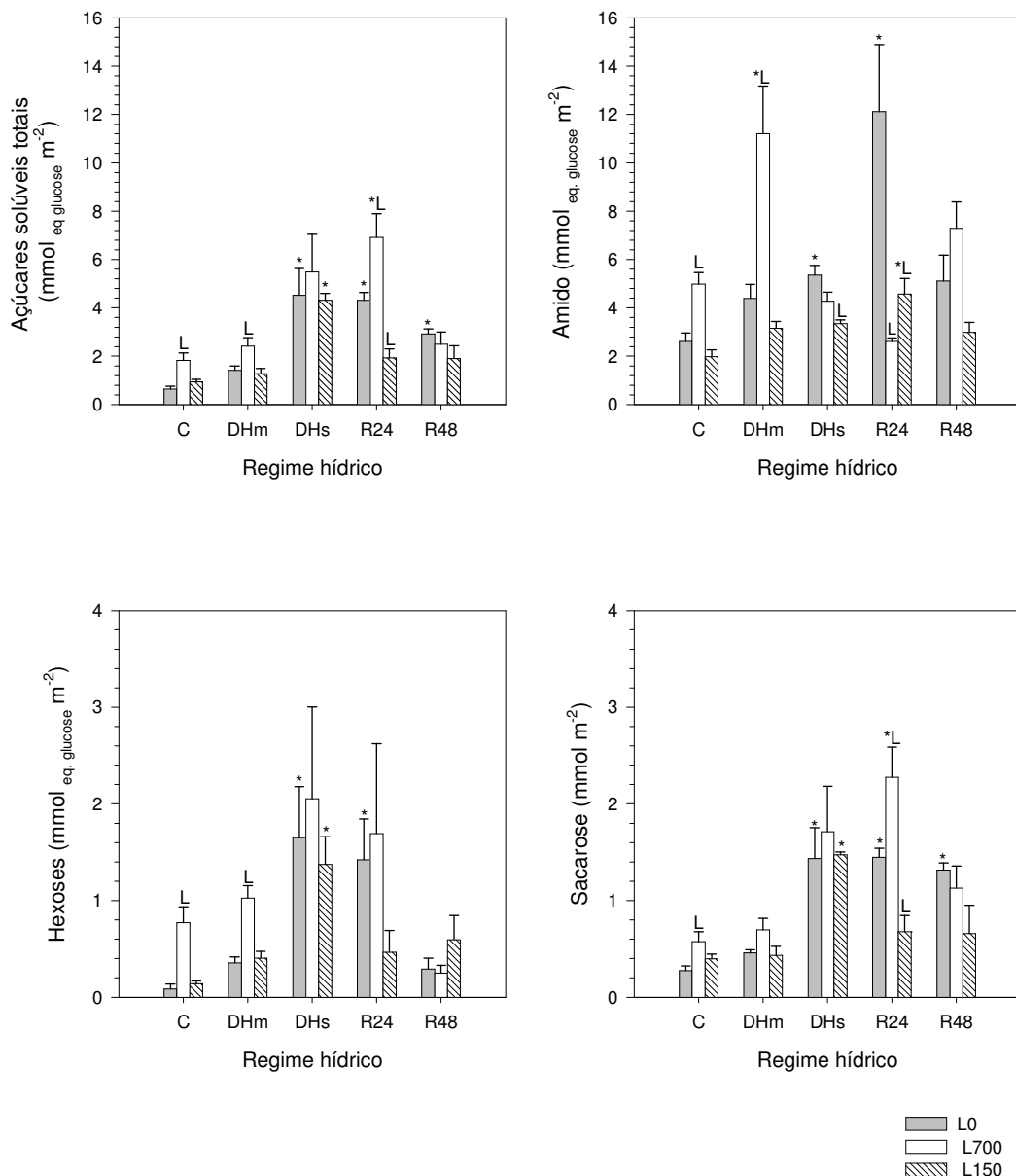


Figura 4.10 – Teor foliar de açúcares solúveis totais, hexoses, sacarose e amido, de madrugada e a meio do dia, a 150 (L150) e a 700 (L700) μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em folhas completamente expandidas de *H. annuus* controlo (C), em défice hídrico moderado (DHm) e severo (DHs) e 24 (R24) e 48 (R48) horas após a rehidatação do substrato. Valores médios \pm erro padrão ($n=5$). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$). A letra (L) indica diferenças significativas entre as médias obtidas de madrugada e as médias obtidas a meio do dia em cada uma das intensidades luminosas (teste t de Student, $\alpha = 0.05$).

observou-se o decréscimo da proporção de sacarose para cerca de 68% que se manteve depois da rehidatação do substrato.

De madrugada, o teor foliar em amido aumentou 69% nas plantas em défice hídrico e o aumento da intensidade do stresse intensificou a acumulação de amido (106%) (Fig. 5.10), mas foi nas primeiras horas de rehidatação que ocorreu a maior acumulação de amido, para concentrações mais de quatro vezes superiores às registadas à mesma hora nas folhas controlo.

Nas 24 h seguintes de rehidratação a concentração foliar em amido aproximou-se dos valores exibidos pelas plantas controlo mas ainda assim manteve-se mais alto.

Nas plantas mantidas a alta irradiância a imposição do défice hídrico induziu a acumulação de amido a meio do dia, com um teor 125% superior ao das folhas controlo e também significativamente superior aos valores registados de madrugada (Fig. 4.10). No entanto, e apesar de de madrugada a concentração foliar de amido ter aumentado significativamente com a intensificação do défice hídrico e, sobretudo, durante as primeiras horas de rehidratação, a meio do dia decresceu e manteve-se semelhante à das plantas controlo durante toda a rehidratação. Nas plantas transferidas para irradiância baixa também foi nas primeiras horas de rehidratação que o teor foliar em amido aumentou significativamente em relação às plantas testemunha (Fig. 4.10). De um modo geral estas plantas exibiram teores foliares em amido sempre muito próximos dos valores obtidos de madrugada, excepto nas plantas em stresse mais intenso e nas primeiras 24 h de rehidratação, em que foram significativamente inferiores (Fig. 4.10).

4. 4. Discussão

O decréscimo da actividade fotossintética em plantas de girassol em défice hídrico tem sido atribuído por alguns autores a limitações na concentração de dióxido de carbono nos espaços intercelulares (C_i) impostas pela diminuição da condutância estomática (Quick *et al.* 1992). Outros autores apontam para limitações não estomáticas, ao terem constatado que a diminuição das taxas fotossintéticas nas plantas em défice hídrico pode acontecer mesmo quando C_i não é limitante, (Boyer 1971, Pankovic *et al.* 1999, Tezara *et al.* 1999).

Tal como foi referido no capítulo 3, o facto de nos ensaios realizados neste trabalho g ter sido superior a $240 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ não faz supor que os valores obtidos para C_i tenham sido sobrestimados devido ao aumento da importância relativa da transpiração cuticular relativamente à estomática (Gimenez *et al.* 1992, Cornic 2000) nas plantas em stresse ligeiro. Por outro lado, o défice hídrico foi imposto lentamente, pelo que também é pouco provável que tenha ocorrido o fecho heterogéneo dos estomas ao longo da superfície foliar, apontado como outra causa possível para a sobrestimação de C_i (Gimenez *et al.* 1992, Gunasekera e Berkowitz 1992, Cornic 2000). Acresce que, apesar de nas plantas sob stresse severo g ter atingido valores inferiores a $40 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $-1.4 \text{ MPa} < \psi < -1 \text{ MPa}$, estes foram superiores aos obtidos por Gimenez *et al.* (1992) em plantas de *H. annuus* ($\psi = 3 \text{ MPa}$ e $g = 10 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), às quais o stresse foi imposto ao longo de quatro dias sem que os autores tenham detectado heterogeneidade no padrão do fecho dos estomas ao longo da superfície foliar. Não

havendo razões para considerar que C_i possa ter sido sobrestimado, o decréscimo significativo da taxa fotossintética nas plantas em déficit hídrico mantidas a alta irradiância não parece ter dependido da diminuição da condutância estomática, nem mesmo nas plantas submetidas a stresse severo, já que não se observaram alterações significativas de C_i .

A reacção de Mehler (Asada 2000, Niyogi 2000) e a fotorrespiração (Osmond e Grace 1995, Wingler *et al.* 1999, 2000, Niyogi 2000) têm sido apontados como sumidouros importantes dos electrões resultantes da energia de excitação em excesso. No entanto, alguns autores têm referido que a fotorrespiração decresce em plantas sob déficit hídrico (Biehler e Fock 1996), sendo a eficácia da reacção de Mehler na protecção dos fotossistemas também bastante controversa, considerada até por vários autores como insuficiente (Brestic *et al.* 1995, Valentini *et al.* 1995, Wiese *et al.* 1998) ou mesmo nula (Flexas e Medrano 2002). Sendo aceite que, nas plantas C_3 , além da fotossíntese, a fotorrespiração (Krall e Edwards 1992, Wingler *et al.* 1999) e a reacção de Mehler (Osmond e Grace 1995, Biehler e Fock 1996, Niyogi 2000, Wingler *et al.* 1999, 2000) são os principais destinos do fluxo de electrões dependente do PSII, o decréscimo de NP registado nas plantas em déficit hídrico mantidas a alta irradiância, além de se dever à inibição do ciclo de Calvin como mostram os resultados de A_{max} (capítulo 3, Fig. 3.2), pode também ter estado relacionado com o aumento da actividade fotorrespiratória e/ou da reacção de Mehler, que justificariam a manutenção de ETR.

A reacção de Mehler e a fotorrespiração são duas das vias metabólicas em que são produzidas espécies reactivas de oxigénio (Polle 1996, Asada 1999, 2000, Noctor *et al.* 2002), sendo de esperar que o aumento da sua ocorrência contribua para o aumento de stresse oxidativo, detectado através do incremento da concentração de MDA (Weber *et al.* 2004). Nas plantas em déficit hídrico mantidas a intensidade luminosa alta, o decréscimo de NP juntamente com a manutenção de ETR foram acompanhados pelo aumento do teor foliar em MDA, que nas plantas em déficit hídrico severo foi significativamente mais alto do que nas plantas controlo. O mesmo não se passou nas plantas transferidas para intensidade luminosa mais baixa, nas quais o déficit hídrico não induziu alterações em NP ou em ETR relativamente às plantas testemunha nas mesmas condições (em que NP e ETR já eram bastante baixos, limitados pelo baixo fluxo quântico). A transferência das plantas para uma densidade de fluxo quântico baixa teve como resultado a manutenção de baixos teores em MDA, significativamente inferiores aos exibidos pelas plantas mantidas sob irradiância mais alta. Estes resultados evidenciam a potenciação que os altos fluxos quânticos exercem sobre os efeitos do déficit hídrico, tal como também foi observado por Sofo *et al.* (2004, 2005) em plântulas de oliveira e em diversos híbridos de prunóideas com cerca de um ano de idade.

Apesar dos decréscimos de NP e de A_{\max} registados nas plantas em stresse severo mantidas sob intensidade luminosa alta, F_v/F_m manteve-se inalterado e sempre acima de 0.840, o que demonstra que não ocorreu fotoinibição (Osmond 1994). No entanto, nestas plantas, e sobretudo nas plantas transferidas para a intensidade luminosa mais baixa, observou-se o acréscimo do NPQ relativamente às plantas controlo nas mesmas condições. Embora NPQ seja normalmente associado ao aumento do índice de desepoxidação dos pigmentos do ciclo das xantofilas (Adams e Demmig-Adams 1992, Demmig-Adams e Adams 1992, Demmig-Adams *et al.* 1996, Medrano *et al.* 2002), neste trabalho não se observou qualquer relação entre aqueles dois parâmetros (correlação de Spearman, $P = 0.250$), tendo ambos apresentado correlações positivas com a intensidade luminosa (correlação de Spearman, $P < 0.001$). Estes resultados, e o facto de NPQ e o índice de desepoxidação dos pigmentos do ciclo das xantofilas terem sido sempre superiores nas plantas mais iluminadas, confirmam a relação positiva do índice de desepoxidação do ciclo das xantofilas e de NPQ relativamente à luz. No presente trabalho, os índices de desepoxidação obtidos foram muito baixos, tendo atingido médias máximas de cerca de 0.3, enquanto no trabalho apresentado por Medrano *et al.* (2002), por exemplo, a relação entre o NPQ e o índice de desepoxidação foi estabelecida a partir de uma gama de valores entre cerca de 0.1 e 0.9. Esta observação sugere que quando o ciclo das xantofilas apresenta uma dinâmica mais baixa, as plantas dissipam a energia em excesso através de outras vias e que pode haver situações, como o défice hídrico, em que NPQ pode ter outras origens que não a dissipação térmica através do ciclo das xantofilas.

O NPQ, ou 'quenching' não fotoquímico da fluorescência da clorofila *a*, reflecte a energia dissipada por via não fotoquímica e engloba todos os mecanismos que atenuam a fluorescência emitida pela clorofila *a*. Vários autores sugeriram outras fontes de NPQ, além da desepoxidação dos pigmentos do ciclo das xantofilas, como a extinção dos estados excitados da clorofila e do singleto de oxigénio levadas a cabo pelos carotenóides das antenas (Pogson *et al.* 1998, Choudhury e Behera 2001, Li *et al.* 2002a, Jung 2004), a activação da reacção de Mehler que provoca o aumento do gradiente de pH trans-tilacoidal (ΔpH) (Asada *et al.* 1998, Makino *et al.* 2002) e a activação, devida ao aumento do ΔpH , da PsbS, uma proteína intrínseca do fotossistema II (Li *et al.* 2000a, 2002b) que alguns autores defendem que poderá ser activada para possibilitar o funcionamento do ciclo de desepoxidação da violaxantina a anteraxantina e zeaxantina (Li *et al.* 2002a, 2002b). Recentemente Matsubara *et al.* (2002) e Gilmore *et al.* (2003) referiram ainda um outro mecanismo de dissipação, independente do ΔpH , conhecido por CHB (cold-hard-band). No entanto o CHB não deve ser considerado como fonte de NPQ no âmbito deste trabalho, já que consiste numa banda extra de emissão

de fluorescência na zona dos 715 nm e, até à data, só foi identificada em folhas de perenifólias durante a aclimação a temperaturas baixas, na ordem de 1°C (Matsubara *et al.* 2002, Gilmore *et al.* 2003).

A dissipação de energia por inactivação do tripleto da clorofila *a* ($^3\text{Chl}^*$) ou de espécies reactivas de oxigénio como o singleto ($^1\text{O}_2^*$) pode ser executada por carotenóides como a luteína (Pogson *et al.* 1998, Niyogi 2000) o β -caroteno (Choudhury e Behera 2001) e a neoxantina (Jung 2004) e contribuir para o NPQ (Choudhury e Behera 2001, Niyogi 2000). Nas plantas transferidas para a intensidade luminosa mais baixa, o défice hídrico severo induziu o aumento significativo no teor foliar em β -caroteno, luteína e neoxantina relativamente às plantas controlo nas mesmas condições. Este aumento poderia ser atribuído ao aumento também significativo da massa foliar específica (SLM). No entanto não parece ser esse o caso porque este parâmetro aumentou significativamente menos nas plantas L150 do que nas L700, e no entanto foi nas primeiras que se observaram os maiores acréscimos nos teores dos carotenóides referidos relativamente às plantas testemunha. Deste modo o défice hídrico parece poder induzir por si só o aumento do potencial antioxidante, uma vez que as plantas transferidas para baixa intensidade luminosa apresentaram teores nos pigmentos com características antioxidantes iguais aos exibidos pelas plantas mantidas à intensidade luminosa de crescimento. Durante a rehidratação das plantas mantidas a intensidade luminosa alta, apesar de ter ocorrido o aumento significativo do índice de desepoxidação dos pigmentos do ciclo das xantofilas relativamente ao verificado nas plantas testemunha, aquele índice não ultrapassou 0.3 o que poderá justificar o facto de não se ter reflectido em valores altos de NPQ. Por outro lado, a transferência das plantas para intensidade luminosa mais baixa reverteu completamente esta situação, evidenciando mais uma vez a relação entre a intensidade luminosa e a activação do ciclo de desepoxidação das xantofilas.

O grande decréscimo de NP observado nas plantas mantidas a alta irradiância em défice hídrico severo, reflectiu-se numa menor acumulação de açúcares solúveis e amido durante o dia. Apesar disso, a concentração foliar em hexoses e em sacarose aumentou nas plantas em défice hídrico severo relativamente às plantas testemunha. A maior parte do carbono fixado durante o processo fotossintético é transportada através do sistema vascular da planta para os órgãos importadores, sendo a sacarose o metabolito mais representativo neste sistema de redistribuição de recursos (Chiou e Bush 1998). As alterações do teor foliar em sacarose podem resultar de alterações nas taxas de síntese de sacarose ou de exportação (Chaves 1991), havendo registos de que a actividade da sintase da sacarose-fosfato (SPS) decresce significativamente em plantas em défice hídrico (Sharkey e Seemann 1989, Vassey e

Sharkey 1989). Assim, e apesar de a capacidade de exportação (Huber *et al.* 1984) e de o transporte floémico (Sung e Krieg 1979) serem menos afectados pelo défice hídrico do que a taxa de fixação do carbono, o aumento significativo nas concentrações em açúcares solúveis e em amido de madrugada nas plantas mantidas a alta irradiância poderá ter sido o reflexo da inibição das taxas de exportação, previamente observada por vários autores em condições de défice hídrico (Quick *et al.* 1992, Pelleschi *et al.* 1997). O decréscimo de exportação induzido pela secura perdurou, aparentemente, durante as primeiras horas de rehidratação, uma vez que o teor em açúcares solúveis e o teor em amido, determinados nas primeiras horas depois da rehidratação do substrato (R24), não decresceram relativamente aos valores determinados ao meio-dia do dia anterior, em nenhum dos grupos de plantas. 48 h depois do início da rehidratação, não se observou aumento do teor em hidratos de carbono durante o dia, comparativamente com as plantas controlo, apesar de NP ser semelhante nos dois grupos de plantas, pelo que, aparentemente, o prosseguimento da rehidratação permitiu que se restabelecessem as taxas de exportação. O aparente aumento nas taxas de exportação durante o dia pode ter estado relacionado com o aumento da demanda por fotoassimilados devido ao retomar do crescimento após o alívio do défice hídrico (Chaves 1991). Durante a rehidratação, a transferência das plantas para intensidades luminosas mais baixas não interferiu com a acumulação de amido foliar mas a representatividade do teor foliar em sacarose relativamente à totalidade dos açúcares solúveis diminuiu, o que, juntamente com o facto de o teor em sacarose ter diminuído da madrugada para o meio-dia, sugere que nestas folhas tenha sido estimulada a exportação. Neste trabalho, a imposição do défice hídrico afectou também a contribuição relativa dos açúcares solúveis e do amido no total dos hidratos de carbono: em resposta à secura do substrato, a proporção de amido decresceu de madrugada e não ocorreu o aumento do teor foliar em amido durante o dia. Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados por Freeden *et al.* (1991), Zrenner e Stitt (1991) e Quick *et al.* (1992), que mostraram que os défices hídricos inibem a síntese de amido e induzem a alteração na partição dos hidratos de carbono recentes em açúcares solúveis. No fim das primeiras horas de rehidratação, a concentração foliar de amido foi superior aos valores encontrados nas plantas sob stresse severo, mostrando que o efeito inibidor do défice hídrico na síntese do amido é rapidamente revertido depois da rehidratação, tal como Zrenner e Stitt (1991) propuseram.

Os resultados obtidos mostram que, nas plantas transferidas para intensidade luminosa baixa, a redução da actividade fotoquímica impôs limitações à fixação de CO₂ em todos os regimes hídricos. Por oposição, nas plantas mantidas sob intensidade luminosa alta, a redução acentuada de NP observada nas plantas sob stresse severo, foi resultado da sinergia entre o

défice hídrico e a irradiância e também da possível indução do aumento das taxas de fotorrespiração ou da reacção de Mehler. Daqui decorreu que as plantas sob stresse, colocadas sob baixos níveis de fluxo quântico, enfrentaram menos stresse oxidativo, o que é confirmado pelos baixos teores foliares em MDA, tendo sido estimulada a protecção antioxidante, evidenciada pelo aumento da concentração foliar em pigmentos antioxidantes relativamente às plantas bem hidratadas nas mesmas condições de iluminação.

A activação de vias metabólicas como a fotorrespiração ou a reacção de Mehler contribuem para o aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio (Polle 1996, Asada 1999). Estas formas reduzidas de oxigénio promovem a degradação de proteínas, lípidos e ácidos nucleicos mas, diversas evidências demonstraram já que fazem também parte de um importante sistema de sinalização interna das plantas (Foyer e Noctor 2005). Entre estes encontra-se a indução de genes relacionados com stresse abiótico, como os que codificam para a superóxido dismutase, a ascorbato peroxidase e para as desidrinas (Weber *et al.* 2004), ou a modificação da condutividade hidráulica das membranas, através da inibição reversível das aquaporinas pelos radicais hidroxilo, que pode evitar a desidratação celular excessiva (Henzler *et al.* 2004). Se por um lado o aumento da produção de espécies reduzidas de oxigénio pode ser favorável à planta em situações de défice hídrico devido às suas funções de sinalização interna, esse aumento parece estar dependente da exposição a intensidade luminosa alta o que poderá constituir uma desvantagem da imposição do défice hídrico ou da rehidratação sob densidades de fluxo quântico baixas.

Os dados obtidos indicam que é possível que NPQ nem sempre esteja directamente relacionado com o índice de desepoxidação do ciclo das xantofilas, e de que ambos dependem directamente da densidade de fluxo quântico. Adicionalmente, sob défice hídrico, os mecanismos de dissipação de energia alternativos ao ciclo das xantofilas podem contribuir para o aumento do NPQ. Entre estes mecanismos, a dissipação efectuada pelos carotenóides das antenas (Govindjee 1995), induzida pelo défice hídrico por si só, e também a reacção de Mehler (Asada 1999, Makino *et al.* 2002), podem ser particularmente importantes, enquanto as condições de défice hídrico se impõem, contribuindo para a manutenção da integridade do aparelho fotossintético, ao participarem na eliminação de energia de excitação em excesso sob formas inofensivas para o aparelho fotossintético.

O aumento do teor foliar em sacarose e da sua importância relativa na composição foliar em açúcares solúveis nas plantas em défice hídrico poderão estar relacionados com as funções de protecção que lhe são atribuídas em situações de desidratação, na manutenção da estrutura das proteínas e da actividade enzimática (Ingram e Bartels 1996, Hoekstra *et al.*

2001). No entanto, nas folhas mantidas sob irradiância alta, a manutenção de teores altos de sacarose nas plantas em déficit hídrico e durante a rehidratação, não evitou que, 48 h depois do início da rehidratação, as taxas fotossintéticas não tivessem recuperado para valores semelhantes aos exibidos pelas plantas controlo. Por outro lado, a limitação de NP juntamente com o facto de a exportação de fotoassimilados ser aparentemente estimulada nas folhas transferidas para baixa intensidade luminosa, leva a considerar a hipótese de que a rehidratação levada a cabo sob baixa irradiância pode conduzir à inibição do crescimento. Os resultados obtidos não apontam para vantagens em proceder à rehidratação a baixa intensidade luminosa, sobretudo se for prolongada.

4.5. Referências Bibliográficas

- Adams III W. W., Demmig-Adams B. (1992). Operation of the xanthophyll cycle in higher plants in response to diurnal changes in incident sunlight. *Planta*, **186**: 390-398.
- Asada K., Endo T., Mano J., Miyake C. (1998). Molecular mechanism for relaxation of and protection from light stress. In Satoh K., Murata N. (eds.) *Stress Responses of Photosynthetic Organisms. Molecular mechanisms and molecular regulations*. Elsevier Science B. V., Amsterdão, p. 37-52.
- Asada K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**: 601-639.
- Asada K. (2000). The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, **355**: 1419-1431.
- Bartoli C. G., Simontacchi M., Tambussi E., Beltrano J., Montaldi, Puntarullo S. (1999). Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. *Journal of Experimental Botany*, **50**: 375-383.
- Biehler K., Fock H. (1996). Evidence for the contribution of the Mehler-Peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. *Plant Physiology*, **112**: 265-272.
- Ben G.-Y., Osmond C. B., Sharkey T. D. (1987). Comparisons of photosynthetic responses of *Xanthium strumarium* and *Helianthus annuus* to chronic and acute water stress in sun and shade. *Plant Physiology*, **84**: 476-482.
- Boyer J. S. (1971). Nonstomatal inhibition of photosynthesis in sunflower at low leaf water potentials and high light intensities. *Plant Physiology*, **48**: 532-536.
- Brestic M., Cornic G., Fryer M. J., Baker N. R. (1995). Does photorespiration protect the photosynthetic apparatus in French bean leaves from photoinhibition during drought stress? *Planta*, **196**: 450-457.

- Collett H., Butowt R., Smith J., Farrant J., Illing N. (2003). Photosynthetic genes are differentially transcribed during the dehydration-rehydration cycle in the resurrection plant, *Xerophyta humilis*. *Journal of Experimental Botany*, **54**: 2593-2595.
- Chaves M. M. (1991). Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*, **42**: 1-16.
- Chiou T.-J., Bush D. R. (1998). Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**: 4784-4788.
- Choudhury N. K., Behera R. K. (2001). Photoinhibition of photosynthesis: Role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents. *Photosynthetica*, **39**: 481-488.
- Cornic G. (2000). Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture - not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science*, **5**: 187-188.
- Daie J. (1996). Metabolic adjustments, assimilate partitioning, and alterations in source-sink relations in drought stressed plants. In Zamski E., Schaffer A. A. (eds.) *Photoassimilate distribution in plants and crops*. Marcel Dekker, New York, p. 407-420.
- Dalla Vecchia F., El Asmar T., Rascio N., Vazzana C. (1998). Morphological and ultrastructural aspects of dehydration and rehydration in leaves of *Sporobolus stapfianus*. *Plant Growth Regulation*, **24**: 219-228.
- David M. M., Coelho D., Barrote I., Correia M. J. (1998). Leaf age effects on photosynthetic activity and sugar accumulation in droughted and rewatered *Lupinus albus* plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, **25**: 299-306.
- Demmig-Adams B., Adams III W. W. (1992). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **43**: 599-626.
- Demmig-Adams B., Adams III W. W. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, **1**: 21-26.
- Demmig-Adams B., Adams III W. W., Barker D. H., Logan B. A., Bowling D. R., Verhoeven A. S. (1996). Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum*, **98**: 253-264.
- Di Blasi S., Puliga S., Losi L., Vazzana C. (1998). *S. stapfianus* and *E. curvula* cv. *Consol* *in vivo* photosynthesis, PSII activity and ABA content during dehydration. *Plant Growth Regulation*, **25**: 97-104.
- Dreesmann D. C., Harn C., Daie J. (1994). Expression of genes encoding Rubisco in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants subjected to gradual desiccation. *Plant Cell Physiology*, **35**: 645-653.
- Flexas J., Medrano H. (2002). Energy dissipation in C₃ plants under drought. *Functional Plant Biology*, **29**: 1209-1215.

- Foyer C., Noctor G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*, **28**: 1056-1071.
- Fredeen A. L., Gamon J. A., Field C. B. (1991). Responses of photosynthesis and carbohydrate-partitioning to limitations in nitrogen and water availability in field-grown sunflower. *Plant Cell and Environment*, **14**: 963-970.
- Gilmore A. M., Matsubara S., Ball M. C., Barker D. H., Itoh S. (2003). Excitation energy flow at 77K in the photosynthetic apparatus of overwintering evergreens. *Plant, Cell and Environment*, **26**: 1021-1034.
- Gimenez C., Mitchell V. J., Lawlor D. W. (1992). Regulation of photosynthetic rate of two sunflower hybrids under water stress. *Plant Physiology*, **98**: 516-524.
- Govindjee (1995). Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll *a* fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology*, **22**: 131-160.
- Gunasekera D., Berkowitz G. A. (1992). Heterogenous stomatal closure in response to leaf water deficits is not a universal phenomenon. *Plant Physiology*, **98**: 660-665.
- Heckathorn S. A., DeLucia E. H., Zielinski R. E. (1997). The contribution of drought-related decreases in foliar nitrogen concentration to decreases in photosynthetic capacity during and after drought in prairie grasses. *Physiologia Plantarum*, **101**: 173-182.
- Henzler T., Ye Q., Steudle E. (2004). Oxidative gating of water channels (aquaporins) in *Chara* by hydroxyl radicals. *Plant, Cell and Environment*, **27**: 1184-1195.
- Hoekstra F. A., Golovina E. A., Buitink J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, **6**: 431-438.
- Hsiao T. C. (1973). Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*, **24**: 519-570.
- Huber S. C., Rogers H. H., Mowry F. L. (1984). Effects of water stress on photosynthesis and carbon partitioning in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) plants grown in the field at different CO₂ levels. *Plant Physiology*, **76**: 244-249.
- Ingram J., Bartels D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**: 377-403.
- Jung S. (2004). Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. *Plant Science*, **166**: 459-466.
- Kaiser W. M. (1987). Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum*, **71**: 142-149.
- Krall J. P., Edwards G. E. (1992). Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves. *Physiologia Plantarum*, **86**: 180-187.

- Kranner I., Beckett R. P., Wornik S., Zorn M., Pfeifhofer H. W. (2002). Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. *Plant Journal*, **31**: 13-24.
- Li X. P., Bjorkman O., Shih C., Grossman A. R., Rosenquist M., Jansson S., Niyogi K. K. (2000). A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature*, **403**: 391-395.
- Li X.-P., Gilmore A. M., Niyogi K. K. (2002a). Molecular and global time-resolved analysis of a psbS gene dosage effect on pH- and xanthophyll cycle-dependent nonphotochemical quenching in photosystem II. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**: 33590-33597.
- Li X. P., Muller-Moule P., Gilmore A. M., Niyogi K. K. (2002b). PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**: 15222-15227.
- Loggini B., Navari-Izzo F., Izzo R. (1997). Has glutathione a key role in the resistance to oxidative stress in durum wheat? *Phyton - Annales Rei Botanicae*, **37**: 151-156.
- Loggini B., Scartazza A., Bruognoli E., Navari-Izzo F. (1999). Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiology*, **119**: 1091-1099.
- Makino A., Miyake C., Yokota A. (2002). Physiological functions of the water-water cycle (Mehler reaction) and the cyclic electron flow around PSI in rice leaves. *Plant and Cell Physiology*, **43**: 1017-1026.
- Matsubara S., Gilmore A. M., Ball M. C., Anderson J. M., Osmond C. B. (2002). Sustained downregulation of photosystem II in mistletoes during winter depression of photosynthesis. *Functional Plant Biology*, **29**: 1157-1169.
- Medrano H., Bota J., Abadia A., Sampol B., Escalona J. M., Flexas J. (2002). Effects of drought on light-energy dissipation mechanisms in high-light-acclimated, field-grown grapevines. *Functional Plant Biology*, **29**: 1197-1207.
- Morosinotto T., Caffarri S., Dall'Osto L., Bassi R. (2003). Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids. *Physiologia Plantarum*, **119**: 347-354.
- Munns R., Weir R. (1981). Contribution of sugars to osmotic adjustment in elongating and expanded zones of wheat leaves during moderate water deficits at two light levels. *Australian Journal of Plant Physiology*, **8**: 93-105.
- Navari-Izzo F., Ricci F., Vazzana C., Quartacci M. F. (1995). Unusual composition of thylakoid membranes of the resurrection plant *Boea hygroskopica*: Changes in lipids upon dehydration and rehydration. *Physiologia Plantarum*, **94**: 135-142.
- Niyogi K. K. (2000). Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**: 455-460.
- Noctor G., Veljovic-Jovanovic S., Driscoll S., Novitskaya L., Foyer C. (2002). Drought and oxidative load in the leaves of C₃ plants: a predominant role for photorespiration? *Annals of Botany*, **89**: 841-850.

- Olsson M., Nilsson K., Liljenberg C., Hendry G. A. F. (1996). Drought stress in seedlings: Lipid metabolism and lipid peroxidation during recovery from drought in *Lotus corniculatus* and *Cerastium fontanum*. *Physiologia Plantarum*, **96**: 577-584.
- Ort D. R. (2001). When there is too much light. *Plant Physiology*, **125**: 29-32.
- Osmond C. B. (1994). What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In Baker N. R., Bowyer J. R. (eds.) *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, p. 1-23.
- Osmond C. B., Grace S. C. (1995). Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*, **46**: 1351-1362.
- Pankovic D., Sakac Z., Kevresan S., Plesnicar M. (1999). Acclimation to long-term water deficit in the leaves of two sunflower hybrids: photosynthesis, electron transport and carbon metabolism. *Journal of Experimental Botany*, **50**: 127-138.
- Pelleschi S., Rocher J.-P., Prioul J.-L. (1997). Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. *Plant, Cell and Environment*, **20**: 493-503.
- Pogson B. J., Niyogi K. K., Bjorkman O., DellaPenna D. (1998). Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in *Arabidopsis* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**: 13324-13329.
- Polle A. (1996). Mehler reaction: friend or foe in photosynthesis? *Botanica Acta*, **109**: 84-89.
- Premachandra G. S., Joly R. J. (1992). Solutes contributing to osmotic potential in young *versus* mature leaves of cacao seedlings. *Journal of Plant Physiology*, **139**: 355-360.
- Proctor M. C. F., Tuba Z. (2002). Poikilohydry and homoihydry: antithesis or spectrum of possibilities? *New Phytologist*, **156**: 327-349.
- Quick W. P., Chaves M. M., Wendler R., David M., Rodrigues M. L., Passarinho J. A., Pereira J. S., Adcock M., Leegood R. C., Stitt M. (1992). The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant Cell and Environment*, **15**: 25-35.
- Riga P., Vartanian N. (1999). Sequential expression of adaptive mechanisms is responsible for drought resistance in tobacco. *Australian Journal of Plant Physiology*, **26**: 211-220.
- Sharkey T. D., Seemann J. R. (1989). Mild water stress effects on carbon-reduction-cycle intermediates, ribulose biphosphate carboxylase activity, and spatial homogeneity of photosynthesis in intact leaves. *Plant Physiology*, **89**: 1060-1065.
- Sheen J. (1990). Metabolic repression of transcription in higher plants. *The Plant Cell*, **2**: 1027-1038.

- Sofa A., Dichio B., Xiloyannis C., Masia A. (2004). Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Science*, **166**: 293-302.
- Sofa A., Tuzio A. C., Dichio B., Xiloyannis C. (2005). Influence of water deficit and rewatering on the components of the ascorbate-glutathione cycle in four interspecific *Prunus* hybrids. *Plant Science*, **169**: 403-412.
- Sung F. J. M., Krieg D. R. (1979). Relative sensitivity of photosynthetic assimilation and translocation of ¹⁴carbon to water stress. *Plant Physiology*, **64**: 852-856.
- Tezara W., Mitchell V. J., Driscoll S. D., Lawlor D. W. (1999). Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, **401**: 914-917.
- Valentini R., Epron D., De Angelis P., Matteucci G., Dreyer E. (1995). *In situ* estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant Cell and Environment*, **18**: 631-640.
- Vassey T. L., Sharkey T. D. (1989). Mild water stress of *Phaseolus vulgaris* plants leads to reduced starch synthesis and extractable sucrose phosphate synthase activity. *Plant Physiology*, **89**: 1066-1070.
- Veneklaas E. J., den Ouden F. (2005). Dynamics of non-structural carbohydrates in two *Ficus* species after transfer to deep shade. *Environmental and Experimental Botany*, **54**: 148-154.
- Wang Z., Quebedeaux B., Stutte G. W. (1994). Osmotic adjustment: effect of water stress on carbohydrates in leaves stems and roots of Apple. *Australian Journal of Plant Physiology*, **22**: 747-754.
- Weber H., Chételat A., Reymond P., Farmer E. E. (2004). Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *The Plant Journal*, **37**: 877-888.
- Wiese C., Shi L. B., Heber U. (1998). Oxygen reduction in the Mehler reaction is insufficient to protect photosystems I and II of leaves against photoinactivation. *Physiologia Plantarum*, **102**: 437-446.
- Wingler A., Quick W. P., Bungard R. A., Bailey K. J., Lea P. J., Leegood R. C. (1999). The role of photorespiration during drought stress: an analysis utilizing barley mutants with reduced activities of photorespiratory. *Plant Cell and Environment*, **22**: 361-373.
- Wingler A., Lea P. J., Quick W. P., Leegood R. C. (2000). Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, **355**: 1517-1529.
- Zhao D., Oosterhuis D. (1998). Cotton responses to shade at different growth stages: nonstructural carbohydrate composition. *Crop Science*, **38**: 1196-1203.
- Zrenner R., Stitt M. (1991). Comparison of the effect of rapidly and gradually developing water-stress on carbohydrate metabolism in spinach leaves. *Plant Cell and Environment*, **14**: 939-946.

Capítulo 5

Efeitos do défice hídrico e da rehidratação na actividade fotossintética e nos mecanismos de fotoprotecção de *Helianthus annuus* L. e de *Lupinus albus* L.

5.1. Introdução

Nas plantas submetidas a défice hídrico criam-se condições propícias ao aparecimento de stresse oxidativo (Irigoyen *et al.* 1992, Moran *et al.* 1994, Zhang e Kirkham 1996, Krieger-Liskay 2005). Por stresse oxidativo entende-se o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, a favor dos oxidantes, potencialmente condutor ao aparecimento de danos fisiológicos e/ou estruturais (Azzi *et al.* 2004). No entanto, têm sido recolhidas evidências de que o stresse oxidativo pode também ser benéfico, fazendo parte de um importante sistema de sinalização interna nas plantas que lhes permite adequar o seu metabolismo às condições a que são sujeitas (Foyer e Noctor 2005). As evidências recolhidas incluem a indução de genes que codificam para a superóxido dismutase, a ascorbato peroxidase ou as desidrinas (Weber *et al.* 2004) e a inibição reversível das aquaporinas pelos radicais hidroxilo, que pode evitar a desidratação excessiva (Henzler *et al.* 2004). Adicionalmente, a senescência foliar, processo fisiológico altamente regulado e que conduz à morte das folhas, parece também ser despoletada pelo stresse oxidativo em plantas sob défice hídrico (Munné-Bosch e Alegre 2004). A senescência das folhas mais velhas, induzida em condições de défice hídrico, constitui uma estratégia de sobrevivência importante para a planta, porque reduz a demanda por água ao nível da planta inteira e permite a reciclagem dos nutrientes que são exportados das folhas em senescência para os tecidos em crescimento ou para os órgãos de reserva (Munné-Bosch e Alegre 2004).

Nas plantas, são diversas as substâncias consideradas antioxidantes, no sentido em que evitam o stresse oxidativo ou eliminam espécies reactivas de oxigénio. Os carotenóides constituem uma primeira fase de defesa das plantas contra o stresse oxidativo, e intervêm neste processo pelo menos de dois modos importantes: a) por meio da activação do ciclo das xantofilas, evitando a formação do tripleto da clorofila (${}_3\text{Chl}^*$) (Demmig-Adams e Adams 1996, Niyogi *et al.* 1998) através do sequestro prévio do singleto da clorofila (${}_1\text{Chl}^*$) (Foyer e Harbinson 1999) e b) pela acção do β -caroteno (Foyer e Harbinson 1999, Choudhury e Behera 2001), da luteína (Pogson *et al.* 1998, Niyogi 2000) e da neoxantina (Jung 2004) que, devido à sua proximidade com as clorofilas nos complexos pigmento/proteína, podem sequestrar directamente o ${}_3\text{Chl}^*$ e o singleto de oxigénio (${}^1\text{O}_2^*$) (Foyer e Harbinson 1999). Enquanto o ciclo das xantofilas tem de ser activado e é altamente regulado estando a sua activação dependente da acidificação do lúmen dos tilacóides (Demmig-Adams e Adams 1996), a função de inactivação de ${}_3\text{Chl}^*$ e de ${}^1\text{O}_2^*$ pelo β -caroteno, luteína e neoxantina é constitutiva e não regulada (Foyer e Harbinson 1999). O funcionamento de ambos os processos pode induzir o aumento do 'quenching' não fotoquímico (NPQ) (Govindjee 1995),

que poderá resultar na redução da eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reacção abertos (F'_v/F'_m) (Baker 1991) e, conseqüentemente, na redução do rendimento quântico do PSII adaptado à luz (Φ_{PSII}) (Genty *et al.* 1989).

Apesar da existência da protecção antioxidante por parte dos carotenóides, vários autores referiram que em plantas sob défice hídrico ocorre a activação da fotorrespiração e o aumento do transporte cíclico de electrões (Wingler *et al.* 1999, Golding e Johnson 2003), bem como da reacção de Mehler (Biehler e Fock 1996) sendo que, em condições de stresse, esta última pode ser responsável pela eliminação de até 30% dos electrões resultantes da captura de energia pelos pigmentos fotossintéticos (Polle 2001). O transporte cíclico de electrões (Makino *et al.* 2002) e a reacção de Mehler (Foyer e Harbinson 1999) contribuem para a acidificação do lúmen dos tilacóides, promovendo deste modo a dissipação de energia sob a forma de calor, ao contribuir para a activação do ciclo das xantofilas (Demmig-Adams e Adams 1996). Contudo, embora a fotorrespiração e a reacção de Mehler permitam aliviar a circulação de electrões em excesso decorrente das reacções da fotossíntese que ocorrem nos tilacóides, têm como produtos finais espécies reactivas de oxigénio como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), que podem ser responsáveis pela ocorrência de stresse oxidativo (Wingler *et al.* 1999, Polle 1996) do qual a degradação das membranas tilacoidais, a desnaturação da Rubisco e de outras proteínas e a indução de mutações no DNA são algumas das conseqüências (Bowler *et al.* 1992, Tambussi *et al.* 2000). O peróxido de hidrogénio pode ser decomposto em água e oxigénio molecular por enzimas como a catalase e as peroxidases (Larson 1988, Bowler *et al.* 1992). A catalase encontra-se predominantemente nos peroxissomas e glioxissomas das células vegetais (Havir e McHale 1987, Bowler *et al.* 1992) e o seu papel principal consiste na metabolização do H_2O_2 proveniente da fotorrespiração (Bowler *et al.* 1992). De entre as peroxidases, a peroxidase do ascorbato encontra-se predominantemente no cloroplasto (Bowler *et al.* 1992, Sen Gupta *et al.* 1993) e é indispensável na sua protecção e na de outros constituintes celulares (Asada 1992).

Durante a reacção de Mehler ocorre a redução do oxigénio molecular a superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) (Foyer e Harbinson 1999) e a enzima dismutase do superóxido (SOD) catalisa a dismutação do superóxido a peróxido de hidrogénio e oxigénio molecular (Asada 1999). O H_2O_2 e o $\text{O}_2^{\cdot -}$ reagem facilmente com iões metálicos gerando o radical hidroxilo, muito reactivo e altamente destruidor, numa reacção conhecida como reacção de Haber-Weiss (Bowler *et al.* 1992, Benov 2001, Van Breusegem *et al.* 2001). No entanto, o H_2O_2 formado no cloroplasto pode ser reduzido a água pelo ascorbato numa reacção catalisada pela peroxidase

do ascorbato (Polle 2001). A peroxidase do ascorbato utiliza o ascorbato como dador de electrões, oxidando-o a monodesidroascorbato, pelo que, para que a eliminação de H_2O_2 possa prosseguir no cloroplasto, é necessária a regeneração do ascorbato (Asada 1992). A regeneração do ascorbato depende em grande medida da actividade das enzimas redutase do monodesidroascorbato, redutase do desidroascorbato e redutase da glutathione (Hossain e Asada 1985, Polle *et al.* 1990, Asada 1992, Bowler *et al.* 1992, Miyake e Asada 1994, Asada 1999, Polle 2001) como foi referido em mais pormenor na Introdução geral (Capítulo 1) deste trabalho.

Nos estudos realizados sobre os efeitos dos défices hídricos na actividade das enzimas do sistema antioxidante têm-se obtido resultados muito diversos. Enquanto alguns autores detectaram aumentos na actividade daquelas enzimas (Ratnayaka *et al.* 2003, Srivalli *et al.* 2003), outros observaram que o défice hídrico induziu o seu decréscimo (Moran *et al.* 1994, Schwanz e Polle 2001) ou não a alterou (Yoshimura *et al.* 2000). Estas discrepâncias aparentes podem resultar do facto de os diferentes trabalhos terem sido realizados sob condições ambientais distintas e também do facto de a actividade das enzimas antioxidantes estar dependente do estágio de desenvolvimento da planta (Ye *et al.* 2000), da idade foliar (Sairam *et al.* 2003/04, Jung 2004), da severidade do défice hídrico (Irigoyen *et al.* 1992, Sgherri e Navari-Izzo 1995, Zhang e Kirkham 1996, Iturbe-Ormaetxe *et al.* 1998) e da estratégia do genótipo perante o stress (Sairam *et al.* 1997/98, Davenport *et al.* 2003, Sairam *et al.* 2005).

O conjunto de ensaios realizados no âmbito deste capítulo teve como objectivo principal estudar os efeitos do défice hídrico ligeiro e moderado e da rehidratação na actividade fotossintética e no sistema antioxidante de folhas de plantas em fase reprodutiva de duas espécies com estratégias distintas de fazer face aos défices hídricos: *Lupinus albus*, que tem como estratégia evitar a secura (Huyghe 1997), e *Helianthus annuus*, tolerante à secura (Zhang e Kirkham 1996).

5.2. Material e métodos

Neste estudo foram utilizados os ensaios referidos no capítulo 2 como Lup01 e Gir01.

O ensaio Lup01 decorreu entre Março e Abril de 2001 e o ensaio Gir01 decorreu entre Setembro e Outubro de 2001. As plantas desenvolveram-se sob abrigo, numa estufa com cobertura de vidro e equipada com um sistema de controlo térmico programado para evitar a subida da temperatura além dos 25°C. Esta estufa estava desprovida de qualquer sistema de aquecimento, pelo que a temperatura mínima variou de acordo com as condições exteriores. O crescimento das plantas decorreu sob condições de iluminação natural, com uma quebra de

cerca de 35%. Dada a elevada variabilidade da irradiância nos vários pontos da estufa, procedeu-se à rotação periódica dos vasos. O défice hídrico foi imposto gradualmente, através da rega, pela reposição parcial das perdas de peso por evapotranspiração. No ensaio Lup01 a imposição do défice hídrico teve início 28 dias após a sementeira e durou 18 dias (défice hídrico ligeiro, DHL) ou 24 dias (défice hídrico moderado, DHm) e no ensaio Gir01 a imposição do défice hídrico foi iniciada 26 dias após a sementeira e prolongou-se por 13 dias (défice hídrico ligeiro, DHL) ou 19 dias (défice hídrico moderado, DHm) (Tabela V.1).

Tabela V.1 – Condições em que decorreram os ensaios (das: dias após a sementeira).

Ensaio	Imposição do défice hídrico			Temperaturas médias (°C)	
	Início (das)	duração (dias)		(média ± erro padrão)	
		ligeiro	moderado	mínima	máxima
<i>Lupinus albus</i> (Mar/Abril 2001)	28	18	24	12 ± 0.7	29 ± 0.8
<i>Helianthus annuus</i> (Set/Out 2001)	26	13	19	16.8 ± 0.3	28.9 ± 0.4

As plantas testemunha (C) foram sempre regadas pela reposição de todo o peso perdido por evapotranspiração. A rehidratação do substrato foi feita através de diversas regas de modo a garantir uma hidratação homogénea de todo o substrato contido nos vasos. Em cada amostragem foram utilizadas cinco plantas, das quais foram retiradas amostras de folhas completamente expandidas e sem sinais de senescência, que se encontravam em início de expansão aquando da imposição do défice hídrico, em plantas testemunha (C), em défice hídrico ligeiro (DHL), em défice hídrico moderado (DHm) 48 h (R48) e 72 h (R72) após o início da rehidratação do substrato. Na véspera dos dias de amostragem as plantas a analisar foram transferidas para uma câmara de crescimento com irradiância máxima de $200 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 60% de humidade relativa e 18°C/22 °C de temperatura (noite/dia).

Nas plantas de *L. albus*, as folhas amostradas correspondiam a uma posição na planta, por contagem acrópeta, de 6.0 ± 1.3 num total de 14.0 ± 0.7 folhas na planta (C), 6.6 ± 0.9 num total de 14.4 ± 1.5 folhas na planta (DHL), 10.0 ± 0.7 num total de 15.2 ± 1.3 folhas na planta (DHm), 11.0 ± 1.2 num total de 20.0 ± 4.8 folhas na planta (R48) e 11.6 ± 0.9 num total de 17.0 ± 3.8 folhas na planta (R72) (valores apresentados sob a forma de média mais ou menos desvio padrão). Nesta espécie, as plantas controlo e em défice hídrico ligeiro não apresentaram folhas senescentes, mas as plantas em défice hídrico moderado apresentaram 6.8

± 1.3 folhas senescentes e as plantas reidratadas 6.2 ± 1.3 e 6.6 ± 0.5 na R48 e R72 respectivamente (valores apresentados sob a forma de média mais ou menos desvio padrão). No conjunto de cinco plantas que permaneceram bem hidratadas até ao fim do ensaio apareceram duas folhas senescentes apenas numa das plantas.

Nas plantas de *H. annuus*, as folhas amostradas correspondiam a uma posição na planta, por contagem acrópeta, de 8.2 ± 1.6 num total de 15.0 ± 2.8 folhas na planta (C), 8.6 ± 1.5 num total de 15.8 ± 3.0 folhas na planta (DHI), 9.4 ± 1.9 num total de 16.8 ± 2.9 folhas na planta (DHm), 9.8 ± 0.8 num total de 17.4 ± 1.5 folhas na planta (R48) e 10.2 ± 0.8 num total de 18.8 ± 0.8 folhas na planta (R72). Nesta espécie só as plantas em rehidratação apresentaram folhas senescentes: uma planta com três folhas senescentes na R48 e duas plantas com duas folhas senescentes na R72. As plantas mantidas bem hidratadas até ao fim do ensaio não apresentaram qualquer folha senescente.

No decorrer das amostragens ambas as espécies se encontravam em fase reprodutiva.

A caracterização do estado hídrico das plantas, a medição das trocas gasosas em condições ambiente, da capacidade fotossintética e da fluorescência da clorofila *a*, e a quantificação do teor foliar em pigmentos fotossintéticos e dialdeído malónico (MDA), bem como as determinações da actividade das enzimas do sistema antioxidante foram realizadas tal como se encontra descrito no capítulo 2, assim como o tratamento estatístico dos dados.

5.3. Resultados

Caracterização do estado hídrico das plantas

A diminuição gradual do fornecimento de água ao substrato resultou no decréscimo significativo do potencial hídrico foliar de madrugada e a meio do dia nas plantas de ambas as espécies submetidas ao nível de stresse mais intenso (Tabela V.2). À rehidratação do substrato seguiu-se a recuperação do potencial hídrico foliar para valores semelhantes aos observados na testemunha (Tabela V.2).

Nas plantas de *L. albus* o défice hídrico acelerou a senescência foliar. Estas plantas, em défice hídrico apresentaram em média 6.8 ± 1.3 (média mais ou menos desvio padrão) folhas senescentes, enquanto entre as plantas bem hidratadas apenas uma planta apresentou duas folhas senescentes. Nas plantas de *H. annuus* em défice hídrico não se detectaram folhas senescentes.

Tabela V.2 – Potencial hídrico foliar de madrugada (Ψ_{pd}) e a meio do dia (Ψ_{md}) em plantas de *L. albus* e de *H. annuus* controlo (C), em défice hídrico ligeiro (DHI), défice hídrico moderado (DHm) e 48 (R48) e 72 h (R72) após a rehidratação do substrato. Valores médios \pm erro padrão (n=5, teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo.

Regime hídrico	<i>Lupinus albus</i>		<i>Helianthus annuus</i>	
	Ψ_{pd} (MPa)	Ψ_{md} (MPa)	Ψ_{pd} (MPa)	Ψ_{md} (MPa)
C	-0.145 \pm 0.034	-0.350 \pm 0.016	-0.150 \pm 0.014	-0.270 \pm 0.022
DHI	-0.390* \pm 0.025	-0.495 \pm 0.005	-0.305 \pm 0.022	-0.445 \pm 0.046
DHm	-0.635* \pm 0.056	-0.930* \pm 0.086	-0.580* \pm 0.082	-0.655* \pm 0.100
R48	-0.231 \pm 0.026	-0.265 \pm 0.154	-0.100 \pm 0.030	-0.300 \pm 0.024
R72	-0.175 \pm 0.008	-0.292 \pm 0.011	-0.113 \pm 0.030	-0.261 \pm 0.015

Nas plantas submetidas ao nível de stresse mais intenso, o teor relativo em água foliar foi significativamente menor, embora superior a 80%, do que o exibido pelas plantas testemunha em ambas as espécies tendo, depois da rehidratação, recuperado para teores idênticos aos das plantas testemunha (Tabela V.3). Não se registaram alterações estatisticamente significativas na massa foliar específica (SLM) com os regimes hídricos em nenhuma das espécies, embora as folhas de *H. annuus* em défice hídrico moderado tenham apresentado uma SLM 13% superior à exibida pelas folhas controlo (dados não apresentados).

Tabela V.3 – Teor relativo em água foliar em plantas de *L. albus* e de *H. annuus* controlo (C), sujeitas a défice hídrico ligeiro (DHI), défice hídrico moderado (DHm) e 48 (R48) e 72 h (R72) após a rehidratação do substrato. Valores médios \pm erro padrão (n=5, teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo.

Regime hídrico	<i>Lupinus albus</i>	<i>Helianthus. annuus</i>
C	92.8 \pm 1.0	91.6 \pm 0.7
DHI	92.8 \pm 1.2	89.5 \pm 0.9
DHm	84.1* \pm 1.8	86.2* \pm 2.5
R48	91.8 \pm 1.2	93.2 \pm 0.5
R72	---	92.8 \pm 0.6

Trocas gasosas

Nas plantas de *L. albus* a condutância estomática (g), a taxa fotossintética (NP) e a pressão parcial de dióxido de carbono nos espaços intercelulares (C_i) não foram afectadas negativamente pelos défices hídricos (Fig. 5.1).

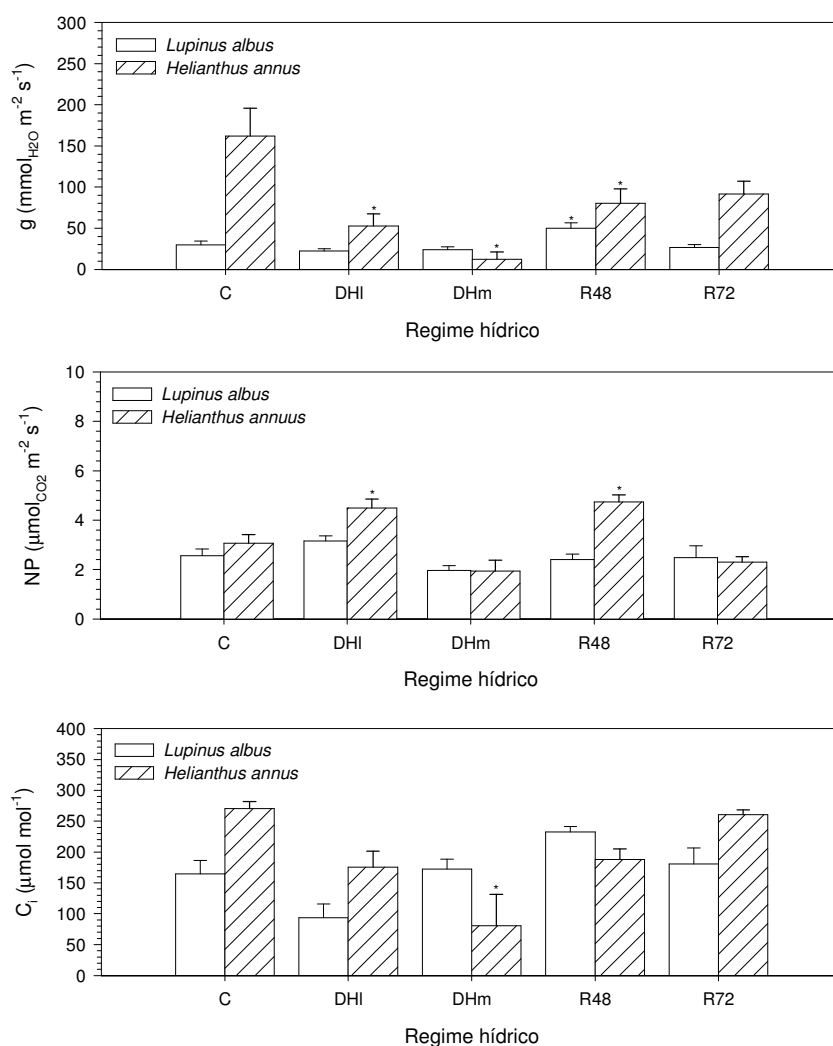


Figura 5.1 – Condutância foliar (g), taxa fotossintética líquida (NP) e pressão parcial de dióxido de carbono nos espaços intercelulares (C_i) em plantas de *L. albus* e de *H. annuus* controlo (C), submetidas a défice hídrico ligeiro (DHI) e moderado (DHm), 48 h (R48) e 72 h (R72) após a rehidratação. Valores médios \pm erro padrão (n = 5). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$).

Nas plantas de *H. annuus* verificou-se o decréscimo significativo de g, 67% nas plantas submetidas ao défice hídrico ligeiro e 92% nas plantas em stresse mais intenso (Fig. 5.1). Nestas plantas, apesar dos decréscimos de g e de C_i (35% nas folhas em défice hídrico ligeiro e 70% nas plantas em défice hídrico moderado), a taxa fotossintética não foi afectada negativamente pelos défices hídricos (Fig. 5.1). 48 h depois da rehidratação do substrato, C_i já tinha recuperado para valores semelhantes aos exibidos pelas plantas testemunha mas g ainda se mantinha 50 % inferior. Após 72 h de rehidratação g e C_i apresentaram valores semelhantes aos exibidos pelas plantas controlo (Fig. 5.1).

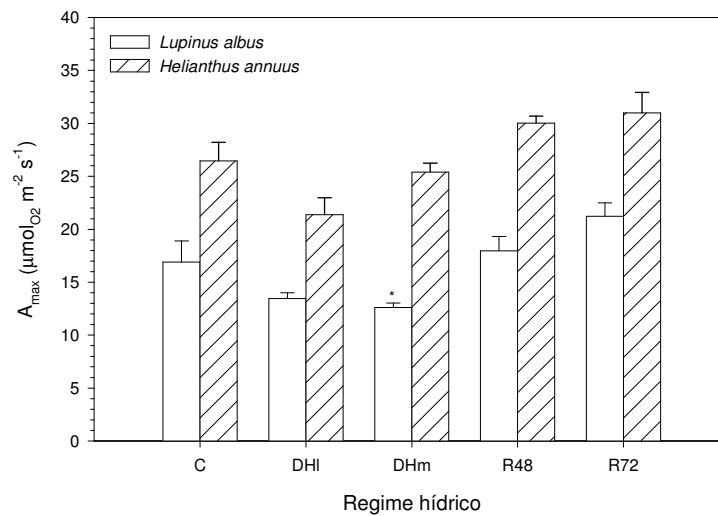


Figura 5.2 – Capacidade fotossintética (A_{max}) em plantas *L. albus* e de *H.annuus* controlo (C), submetidas a défice hídrico ligeiro (DHl) e moderado (DHm) 48 h (R48) e 72 h (R72) depois da rehidratação do substrato). Valores médios \pm erro padrão ($n = 5$). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$).

Nas plantas de *L. albus* em défice hídrico moderado a capacidade fotossintética (A_{max}) decresceu significativamente nas folhas amostradas (Fig. 5.2). Não foram observados efeitos significativamente negativos dos regimes hídricos na capacidade fotossintética de *H. annuus*, embora nas plantas em défice hídrico ligeiro A_{max} tenha decrescido 20 % relativamente às folhas controlo. No entanto, este decréscimo não se verificou nas plantas submetidas ao défice hídrico mais intenso (Fig. 5.2). As folhas de *H. annuus* apresentaram sempre A_{max} superior à das folhas de *L. albus*, independentemente do regime hídrico (Fig. 5.2).

Teor foliar em Rubisco

O teor foliar em Rubisco não foi afectado pelos diferentes regimes hídricos em qualquer uma das espécies (Fig. 5.3).

As plantas de *L. albus* apresentaram sempre teor foliar em Rubisco superior ao observado nas plantas de *H. annuus* (Fig. 5.3).

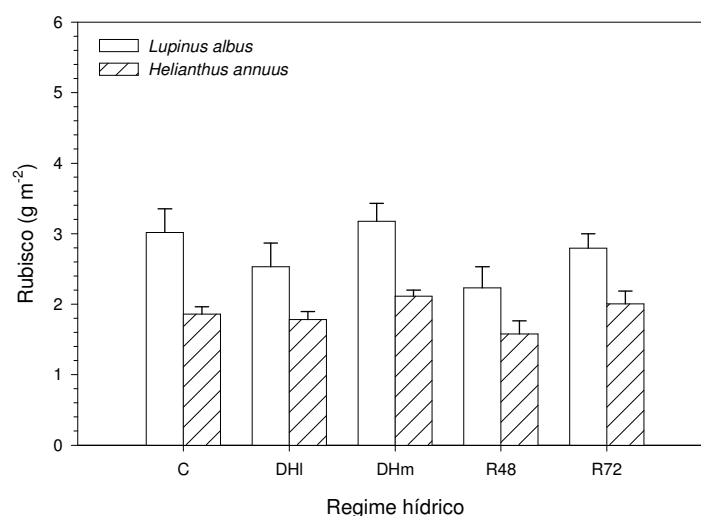


Figura 5.3 – Teor foliar em ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) em plantas de *L. albus* e de *H.annuus* submetidas a défice hídrico ligeiro e moderado com subsequente rehidratação (C - controlo, DHI - défice hídrico ligeiro, DHm - défice hídrico moderado, 48 h (R48) e 72 h (R72) depois da rehidratação do substrato). Valores médios \pm erro padrão (n = 5). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$).

Fluorescência da clorofila a

Nas plantas de *L. albus* o rendimento quântico real (Φ_{PSII}) não foi afectado pelo défice hídrico, mas decresceu significativamente 72 h depois do início da rehidratação do substrato relativamente aos valores exibidos pelas plantas testemunha (Fig. 5.4). Este decréscimo deveu-se essencialmente à diminuição da eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reacção do PSII abertos (F'_v/F'_m), já que o ‘quenching’ fotoquímico (qP) não se alterou com nenhum dos regimes hídricos (Fig. 5.4). Nas plantas submetidas ao nível de stresse mais severo, F'_v/F'_m também decresceu significativamente em comparação com as plantas testemunha, mas este decréscimo não se reflectiu em Φ_{PSII} . A submissão das plantas de *L. albus* aos diferentes regimes hídricos não provocou qualquer alteração significativa na taxa de transporte de electrões dependente do fotossistema II (ETR) nem no seu rendimento quântico potencial (F_v/F_m). Nestas plantas, o ‘quenching’ não fotoquímico (NPQ) também não sofreu alterações estatisticamente significativas com a aplicação dos diferentes regimes hídricos mas, nas plantas sob défice hídrico mais intenso, registou-se a sua subida em cerca de 20% (Fig. 5.4).

Nas plantas de *H. annuus*, os regimes hídricos não afectaram negativamente nenhum dos parâmetros de fluorescência da clorofila a (Fig. 5.4). Nas folhas rehidratadas, NPQ exibiu valores significativamente inferiores aos registados nas folhas controlo (Fig. 5.4).

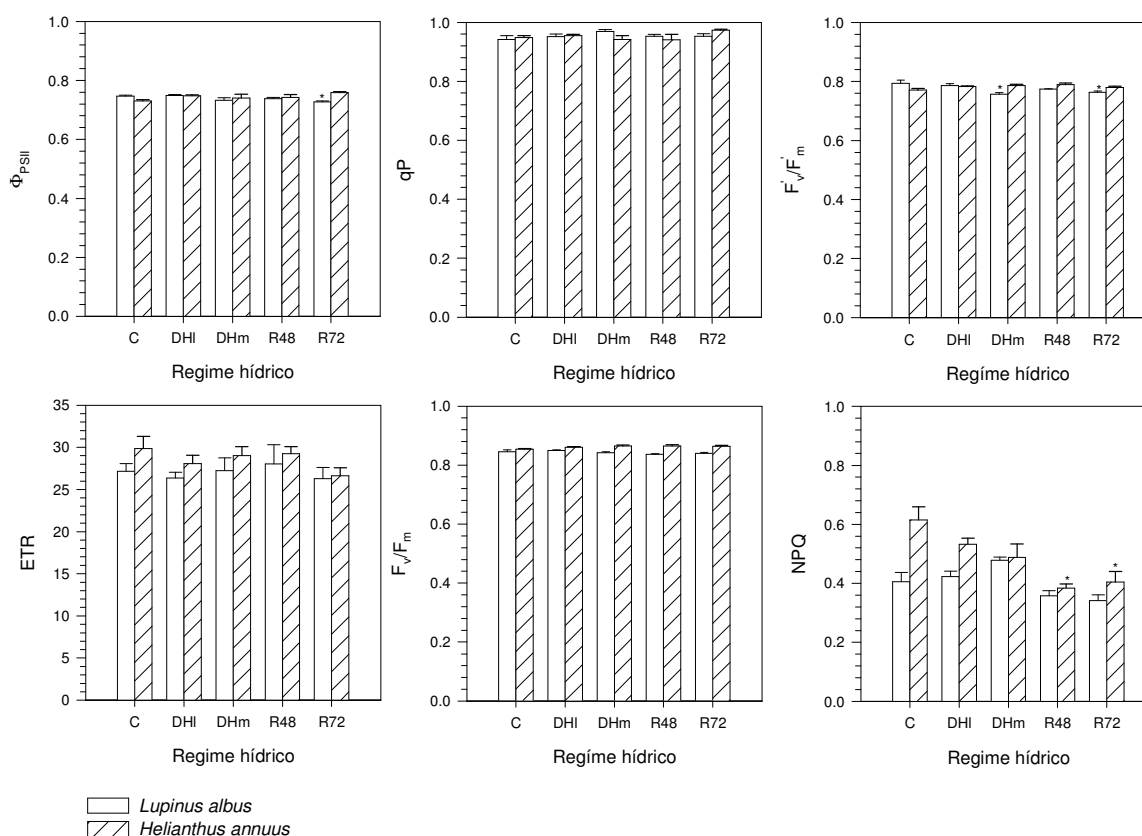


Figura 5.4 - Rendimento quântico real do fotossistema II (Φ_{PSII}), ‘quenching’ fotoquímico (qP), eficiência fotoquímica dos centros de reacção do fotossistema II abertos (F_v/F_m), taxa de transporte de electrões (ETR), rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m), e ‘quenching’ não fotoquímico (NPQ) em folhas de *L. albus* e *H. annuus* submetidas a défice hídrico moderado e severo com subsequente rehidratação (C - controlo, DHI - défice hídrico ligeiro, DHm - défice hídrico moderado, 48 h (R48) e 72 h (R72) depois da rehidratação do substrato). Valores médios \pm erro padrão (n = 5). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$).

De um modo geral, nas folhas de *H. annuus* registaram-se valores de NPQ superiores aos exibidos por *L. albus*, excepto nas plantas sob stresse mais intenso em que se igualaram (Fig. 5.4).

Teor foliar em pigmentos fotossintéticos e pigmentos do ciclo das xantofilas

Nas plantas de *L. albus* o teor foliar em clorofila total não foi afectado significativamente pelos diferentes regimes hídricos nem de madrugada nem ao meio-dia (Tabela V.4). O mesmo se verificou relativamente aos teores foliares em β -caroteno, luteína, neoxantina, pigmentos do ciclo das xantofilas e carotenóides totais, bem como na razão clorofila *a/b*. Nestas plantas, a razão entre o teor em clorofila total e o teor em carotenóides

Tabela V.4 – Teor foliar em pigmentos fotossintéticos em plantas de *L. albus* e de *H. annuus* controle (C), em déficit hídrico ligeiro (DHI) e moderado (DHm), 48h (R48) e 72h (R72) depois da rehidratação do substrato. Valores médios \pm erro padrão (n = 5). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controle (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$). A letra L indica diferenças significativas entre as médias de madrugada e a meio do dia (teste *t* de Student, $\alpha = 0.05$). (V - violaxantina; A - anteraxantina; Z - zeaxantina;)

	Regime hídrico	<i>Lupinus albus</i>		<i>Helianthus annuus</i>	
		Madrugada	Meio-dia	Madrugada	Meio-dia
Clorofila total ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	C	313.0 \pm 27.4	293.5 \pm 23.5	306.5 \pm 33.1	261.2 \pm 50.5
	DHI	267.3 \pm 11.7	286.4 \pm 34.0	323.6 \pm 29.3	302.8 \pm 32.9
	DHm	263.0 \pm 29.1	256.8 \pm 10.1	410.8* \pm 24.0	354.0 \pm 25.8
	R48	271.0 \pm 7.3	275.6 \pm 16.1	300.8 \pm 14.1	342.6 \pm 19.6
	R72	306.4 \pm 12.1	279.0 \pm 11.0	333.8 \pm 19.9	390.2 \pm 21.8
Clorofila a/b	C	3.74 \pm 0.10	3.72 \pm 0.11	3.33 \pm 0.05	3.52 \pm 0.11
	DHI	3.78 \pm 0.09	3.71 \pm 0.02	3.46 \pm 0.07	3.62 \pm 0.08
	DHm	3.70 \pm 0.06	3.75 \pm 0.03	3.53 \pm 0.05	3.56 \pm 0.17
	R48	3.77 \pm 0.08	3.86 \pm 0.08	3.58 \pm 0.10	3.52 \pm 0.06
	R72	3.85 \pm 0.01	3.83 \pm 0.04	3.58 \pm 0.10	3.68 \pm 0.06
Carotenóides ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	C	118.9 \pm 9.3	111.3 \pm 9.2	86.4 \pm 7.5	65.5 \pm 12.2
	DHI	102.6 \pm 4.8	109.6 \pm 12.7	84.4 \pm 7.7	75.9 \pm 8.2
	DHm	102.8 \pm 10.8	101.8 \pm 1.6	102.7 \pm 3.2	85.7 ^L \pm 5.5
	R48	109.6 \pm 2.3	112.4 \pm 6.7	70.4 \pm 4.7	81.8 \pm 4.1
	R72	120.1 \pm 4.1	112.2 \pm 4.8	79.3 \pm 5.3	93.7 \pm 5.2
β -caroteno ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	C	39.9 \pm 3.9	37.9 \pm 3.2	32.7 \pm 2.6	24.9 \pm 4.6
	DHI	34.9 \pm 2.0	36.8 \pm 4.4	32.1 \pm 2.6	29.2 \pm 2.9
	DHm	33.3 \pm 3.7	32.3 \pm 1.5	38.2 \pm 2.1	34.6 \pm 2.3
	R48	35.8 \pm 1.1	37.6 \pm 1.9	28.4 \pm 1.3	32.5 \pm 1.6
	R72	39.8 \pm 1.3	37.1 \pm 1.6	30.6 \pm 1.8	37.3 ^L \pm 1.5
Luteína ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	C	42.0 \pm 2.6	39.8 \pm 3.3	27.4 \pm 2.6	21.6 \pm 4.1
	DHI	37.8 \pm 1.4	40.4 \pm 4.8	28.1 \pm 2.7	25.1 \pm 3.4
	DHm	39.1 \pm 3.7	39.1 \pm 0.8	35.1 \pm 0.17	27.4 ^L \pm 1.9
	R48	41.3 \pm 1.0	40.8 \pm 2.5	23.2 \pm 2.0	27.0 \pm 1.5
	R72	43.4 \pm 2.8	40.2 \pm 0.9	26.5 \pm 1.8	29.8 \pm 2.4
Neoxantina ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	C	8.99 \pm 0.68	7.78 \pm 1.08	6.60 \pm 0.86	5.32 \pm 0.92
	DHI	7.77 \pm 0.47	8.47 \pm 1.13	6.94 \pm 0.74	5.68 \pm 0.80
	DHm	7.25 \pm 0.84	7.21 \pm 0.21	7.99 \pm 0.64	6.42 \pm 0.53
	R48	7.73 \pm 0.46	8.22 \pm 0.87	5.24 \pm 0.53	6.24 \pm 0.44
	R72	7.87 \pm 0.19	7.58 \pm 0.53	6.12 \pm 0.46	7.37 \pm 0.56
(V+A+Z) ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	C	27.5 \pm 2.2	24.8 \pm 1.6	18.6 \pm 1.6	12.8 \pm 2.5
	DHI	22.1 \pm 1.2	23.4 \pm 2.4	16.3 \pm 1.7	14.8 \pm 1.4
	DHm	22.8 \pm 2.9	22.8 \pm 1.3	20.2 \pm 0.4	16.1 ^L \pm 1.3
	R48	24.3 \pm 1.3	25.4 \pm 2.0	12.6* \pm 1.1	14.7 \pm 0.9
	R72	28.2 \pm 0.9	26.5 \pm 2.0	14.8 \pm 1.2	17.8 \pm 1.0
Clorofila/ Carotenóides	C	2.62 \pm 0.04	2.64 \pm 0.02	3.55 \pm 0.10	3.94 \pm 0.13
	DHI	2.61 \pm 0.03	2.62 \pm 0.02	3.82 \pm 0.11	4.02 \pm 0.20
	DHm	2.55 \pm 0.04	2.52 \pm 0.08	4.00 \pm 0.14	4.14 \pm 0.19
	R48	2.47 \pm 0.06	2.45* \pm 0.04	4.32* \pm 0.14	4.22 \pm 0.17
	R72	2.55 \pm 0.02	2.49 \pm 0.03	4.22* \pm 0.15	4.18 \pm 0.16

totais decresceu significativamente 48 h depois do início da rehidratação (e manteve-se baixo durante o restante período de rehidratação), quando comparados com as plantas testemunha, devido sobretudo ao ligeiro decréscimo no teor em clorofila total (Tabela V.4).

Nas plantas de *H. annuus* submetidas ao nível de stresse mais severo, registou-se, de madrugada, o aumento significativo do teor foliar em clorofila total (34%) relativamente às plantas testemunha, bem como aumentos no teor foliar em pigmentos antioxidantes como o β -caroteno (17%), a luteína (28%), a neoxantina (21%) e os carotenóides totais (20%) (Tabela V.4). Estas alterações no teor foliar em pigmentos não são atribuíveis a aumentos na massa foliar específica, uma vez que esta não variou significativamente com os regimes hídricos (dados não apresentados). Nas plantas de *H. annuus* sob défice hídrico moderado ocorreu, entre a madrugada e o meio do dia, o decremento generalizado dos teores em pigmentos, especialmente dos teores em luteína, pigmentos do ciclo das xantofilas (V+A+Z) e carotenóides totais (Tabela V.4). No entanto, tal como de madrugada, a meio do dia também se registaram aumentos dos teores foliares em clorofila total (36%), carotenóides totais (31%) e ainda nos carotenóides β -caroteno (39%), luteína (27%), neoxantina (21%), assim como no teor foliar em pigmentos do ciclo das xantofilas nas plantas em stresse mais intenso relativamente ao controlo. Embora nas plantas rehidratadas, de madrugada, o teor foliar em carotenóides totais e, de entre eles, o teor foliar em luteína, β -caroteno, neoxantina e carotenóides do ciclo das xantofilas tenha retomado valores semelhantes aos exibidos pelas plantas testemunha à mesma hora, a meio do dia os teores nestes pigmentos, especialmente em β -caroteno, mantiveram-se superiores aos exibidos pelas plantas controlo (Tabela V.4).

Nas plantas de girassol a razão entre a clorofila *a* e a clorofila *b* não foi influenciada pelos diferentes regimes hídricos, mas registou-se o aumento do teor foliar em clorofila total relativamente aos carotenóides nas plantas rehidratadas principalmente de madrugada (Tabela V.4).

De um modo geral, as plantas testemunha de *L. albus* apresentaram teores foliares em carotenóides superiores aos exibidos pelas plantas de *H. annuus*, especialmente em luteína e nos pigmentos do ciclo das xantofilas (Tabela V.4). No entanto esta diferença desapareceu nas plantas sob stresse, em que devido aos aumentos observados nas folhas de *H. annuus*, os teores foliares em carotenóides se igualaram nas duas espécies.

Nas folhas de *L. albus*, o défice hídrico induziu o aumento significativo do índice de desepoxidação da violaxantina em anteraxantina e zeaxantina $[(A+Z)/(V+A+Z)]$ de madrugada relativamente às plantas testemunha (Fig. 5.5). A meio do dia ocorreu também o aumento para aproximadamente o dobro daquele índice nas mesmas plantas. Depois da

rehidratação do substrato $(A+Z)/(V+A+Z)$ voltou a decrescer para valores próximos dos exibidos pelas plantas testemunha. Não foram registadas diferenças entre $(A+Z)/(V+A+Z)$ de madrugada e a meio do dia.

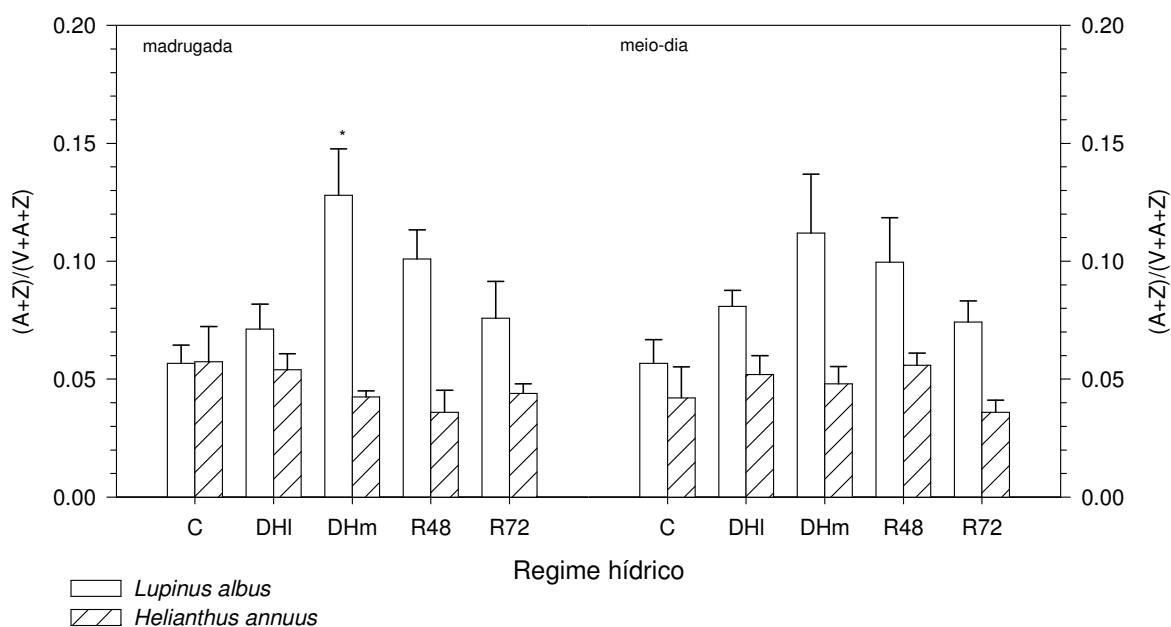


Figura 5.5 – Índice de desepoxidação $[(A+Z)/(V+A+Z)]$ em folhas de *L. albus* e de *H. annuus* submetidas a défice hídrico ligeiro e moderado e subsequente rehidratação (C - controlo, DHI - défice hídrico ligeiro, DHm – défice hídrico moderado, 48 h (R48) e 72 h (R72) depois da rehidratação do substrato). Valores médios \pm erro padrão (n = 5). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$).

Nas plantas de *H. annuus* a razão $(A+Z)/(V+A+Z)$ não sofreu alterações relacionadas com os regimes hídricos nem com a hora de amostragem independentemente do nível de stress aplicado (Fig. 5.5).

Os índices de desepoxidação da violaxantina em anteraxantina e zeaxantina foram muito baixos em ambas as espécies devido ao facto de as amostras terem sido colhidas a baixa intensidade luminosa.

Enzimas do sistema antioxidante e teor em dialdeído malónico (MDA)

Nas folhas de *L. albus* em défice hídrico observou-se o decréscimo significativo da actividade da peroxidase do ascorbato (Apx), bem como o decréscimo significativo da actividade da redutase do desidroascorbato (DHAR) e da redutase do monodesidroascorbato (MDHAR) nas folhas em défice hídrico mais intenso (Fig. 5.6). Nas folhas em stress, a actividade da redutase da glutathione (GR) não se alterou significativamente mas aumentou durante a R48

(Fig. 5.6). A actividade das enzimas Apx, MDHAR e DHAR recuperou para valores semelhantes aos registados nas plantas testemunha a partir da R48, tendo acontecido o mesmo com a actividade da GR na R72 (Fig. 5.6). A actividade da dismutase do superóxido (SOD) subiu 46% nas plantas em défice hídrico mais ligeiro, mas esse aumento não se manteve quando se intensificou o stresse, tendo a actividade desta enzima nas plantas em stresse moderado sido inferior (41%) à exibida pelas folhas controlo (Fig. 5.6). Durante o período de rehidratação a actividade da SOD apresentou, em média, valores semelhantes aos exibidos pelas plantas testemunha (Fig. 5.6). Os regimes hídricos não impuseram alterações significativas à actividade da catalase (Cat) nas folhas de *L. albus* (Fig. 5.6).

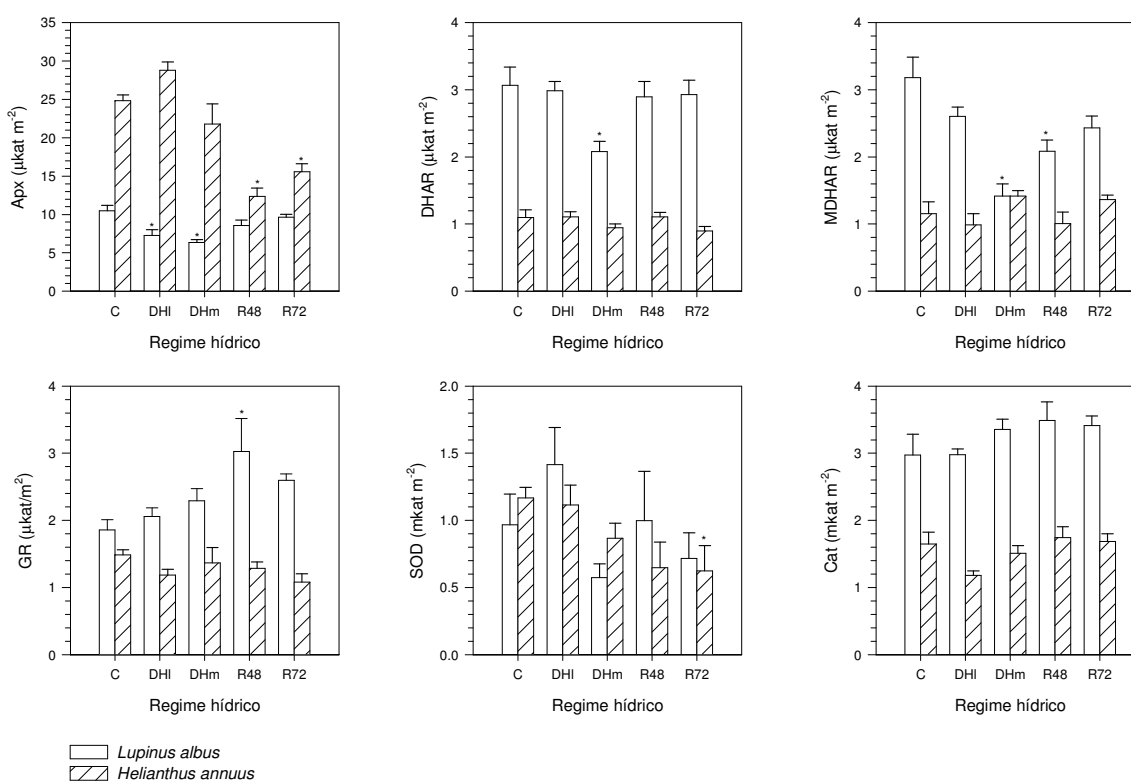


Figura 5.6 – Actividade das enzimas do sistema antioxidante em folhas de *L. albus* e de *H. annuus* submetidas a défice hídrico ligeiro e moderado e subsequente rehidratação (C - controlo, DHI - défice hídrico ligeiro, DHm – défice hídrico moderado, 48 h (R48) e 72 h (R72) depois da rehidratação do substrato; GR - redutase da glutatona, DHAR - redutase do desidroascorbato, MDHAR - redutase do monodesidroascorbato, Cat - catalase, SOD - dismutase do superóxido, Apx - peroxidase do ascorbato). Valores médios \pm erro padrão (n = 5). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnnett, $\alpha = 0.05$).

Nas plantas de *H. annuus* não se observaram alterações significativas nas actividades da Apx, DHAR, MDHAR e GR impostas pelos regimes hídricos (Fig. 5.6). Nestas plantas, a actividade da SOD nas folhas em défice hídrico ligeiro manteve-se igual à observada nas

folhas controlo, mas nas folhas em défice hídrico mais intenso decresceu para valores inferiores aos exibidos pelas folhas controlo (Fig. 5.6). Durante a rehidratação, a actividade desta enzima continuou a decrescer, tendo na R72 atingido valores significativamente inferiores (47%) aos exibidos pelas folhas controlo (Fig. 5.6). A actividade da catalase decresceu 28% nas folhas sob défice hídrico ligeiro, mas nas folhas sob défice hídrico moderado readquiriu actividade semelhante à exibida pelas folhas controlo, que se manteve durante todo o período de rehidratação (Fig. 5.6).

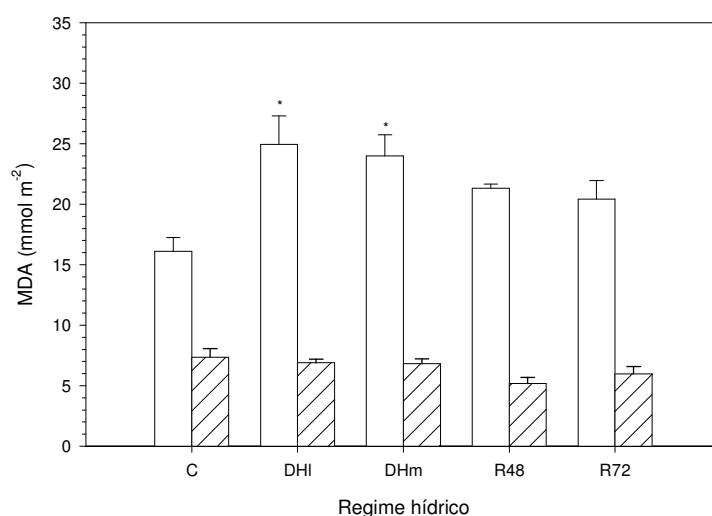


Figura 5.7 - Teor foliar em dialdeído malónico (MDA) em plantas *L. albus* e *H. annuus* submetidas a défice hídrico ligeiro e moderado com subsequente rehidratação (C - controlo, DHI - défice hídrico ligeiro, DHm – défice hídrico moderado, 48 h (R48) e 72 h (R72) depois da rehidratação do substrato). Valores médios \pm erro padrão (n = 5). O símbolo (*) indica diferenças significativas entre as médias de cada regime hídrico e o controlo (teste de Dunnett, $\alpha = 0.05$).

Nas plantas de *L. albus* em défice hídrico moderado e em défice hídrico severo verificou-se o aumento significativo do teor foliar em MDA (Fig 5.7). Depois do alívio do stresse o teor foliar em MDA decresceu, tornando-se semelhante ao das plantas testemunha.

Nas plantas de *H. annuus* não se observaram alterações significativas no teor em MDA relacionadas com os regimes hídricos (Fig. 5.7).

5.4. Discussão

Os valores de potencial hídrico de madrugada obtidos para as duas espécies, *L. albus* e *H. annuus* indicam que ambas foram submetidas a défice hídrico ligeiro e, com a continuação da imposição do stresse, submetidas a défice hídrico moderado. Apesar de em nenhuma das espécies se terem observado efeitos negativos dos défices hídricos nas taxas fotossintéticas em

condições ambiente nem ter ocorrido fotoinibição, nas plantas de *L. albus* em stresse moderado registou-se o decréscimo significativo da capacidade fotossintética. Este decréscimo não esteve associado a efeitos do défice hídrico sobre o teor em Rubisco, uma vez que este não foi afectado. No entanto, nas mesmas plantas ocorreu o decréscimo significativo da eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reacção abertos (F_v^2/F_m^2), que se manteve nas plantas rehidratadas, onde se repercutiu num menor rendimento quântico do PSII adaptado à luz (Φ_{PSII}). Nas plantas de *L. albus* em stresse moderado, o decréscimo de F_v^2/F_m^2 terá sido reflexo do aumento de NPQ (Baker 1991), o qual poderá ter estado relacionado com o aumento do índice de desepoxidação dos pigmentos do ciclo das xantofilas (Adams e Demmig-Adams 1992, Demmig-Adams e Adams 1992, Demmig-Adams *et al.* 1996). Esta activação do ciclo das xantofilas foi muito ligeira, uma vez que se traduziu num índice de desepoxidação muito baixo, provavelmente devido à baixa intensidade luminosa a que foram recolhidas as amostras (Demmig-Adams e Adams 1992, Demmig-Adams *et al.* 1998), e não foi suficiente para evitar o aumento da peroxidação dos lípidos das membranas associado ao aumento da produção de espécies reduzidas de oxigénio (Weber *et al.* 2004) em condições de défice hídrico (Sgherry e Navari-Izzo 1995, Bartosz 1997, Fu e Huang 2001, Munné-Bosch *et al.* 2001).

O facto de NP não ter diminuído e de ETR, que nas plantas C_3 é repartido predominantemente entre a fotossíntese e a fotorrespiração (Krall e Edwards 1992, Wingler *et al.* 1999) se ter mantido em ambas as espécies em défice hídrico, não dá indicações de que possa ter ocorrido o aumento da taxa de fotorrespiração nestas plantas. Apesar de a reacção de Mehler também poder escoar parte dos electrões de ETR, entre 2%, em condições normais, até 30%, em condições de stresse (Polle 2001), é plausível que possa ocorrer um aumento da taxa desta reacção sem que haja alterações significativas de ETR.

Enquanto o ciclo das xantofilas está envolvido em evitar a formação do triplete da clorofila ($_3\text{Chl}^*$) (Demmig-Adams e Adams 1996, Niyogi *et al.* 1998) através do ‘quenching’ prévio do singleto da clorofila ($_1\text{Chl}^*$) (Foyer e Harbinson 1999), os carotenóides como o β -caroteno (Foyer e Harbinson 1999, Choudhury e Behera 2001), a luteína (Pogson *et al.* 1998, Niyogi 2000) e a neoxantina (Jung 2004) têm a capacidade de inactivar o $_3\text{Chl}^*$ bem como o singleto do oxigénio ($^1\text{O}_2^*$). A diferença fundamental entre estes dois mecanismos é a de que, enquanto o ciclo das xantofilas tem de ser activado e está sujeito a regulação, a função de inactivação de $_3\text{Chl}^*$ e de $^1\text{O}_2^*$ pelos carotenóides é constitutiva e não regulada (Foyer e Harbinson 1999). A activação do ciclo das xantofilas foi muito débil nas plantas de *L. albus* em défice hídrico e não foram registadas alterações do teor em pigmentos antioxidantes em

resposta à imposição de défice hídrico, ligeiro ou moderado, além de que os dados de fluorescência de clorofila *a* não indicam que tenham aumentado as condições de redução junto ao fotossistema II. Pelo contrário, nas plantas de *H. annuus*, em que os dados de fluorescência da clorofila *a* também não indicam o aumento das condições de redução junto ao fotossistema II, não houve activação do ciclo das xantofilas em qualquer um dos regimes hídricos, mas registaram-se aumentos consideráveis no teor foliar em carotenóides totais, especialmente no teor foliar em β -caroteno, luteína, neoxantina e também no conjunto de pigmentos pertencentes ao ciclo das xantofilas, nas plantas em défice hídrico moderado. O facto de as plantas de *L. albus* terem apresentado, de um modo geral, teor foliar em carotenóides superior ao observado em *H. annuus*, excepto nas plantas em défice hídrico moderado, revela que aquelas plantas possuem alguma protecção constitutiva (Ratnayaka *et al.* 2003) contra os efeitos da sobreexcitação da clorofila, enquanto as plantas de *H. annuus* revelaram aptidão para melhorar a sua capacidade de sequestrar $^3\text{Chl}^*$ e $^1\text{O}_2^*$ em resposta ao défice hídrico. A transferência directa de electrões para os carotenóides é apontada como uma das fontes de ‘quenching’ não fotoquímico (Govindjee 1995), mas nas plantas de *H. annuus* o aumento do teor em carotenóides não se repercutiu no aumento de NPQ. Este facto sugere que o aumento no teor em carotenóides constitua uma resposta induzida pelo défice hídrico nas plantas de *H. annuus*, mas que nas condições de baixa intensidade luminosa e de défice hídrico pouco intenso em que as plantas se encontravam não tenha aumentado o ‘quenching’ directo de $^3\text{Chl}^*$ e de $^1\text{O}_2^*$.

Nas plantas de *L. albus* em défice hídrico ligeiro registou-se o aumento da actividade da dismutase do superóxido (SOD), já observada em plantas em défice hídrico por vários autores (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 1998, Yu e Rengel 1999, Fu e Huang 2001, Lima *et al.* 2002, Srivalli *et al.* 2003, Jung 2004) em que Yu e Rengel (1999) registaram o aumento preferencial de Cu/ZnSOD e FeSOD, isoformas existentes no cloroplasto, em plantas de *Lupinus angustifolius*. O aumento da actividade da dismutase do superóxido nas plantas de *L. albus* em défice hídrico ligeiro aponta para que, apesar de não terem sido detectadas diminuições nas taxas fotossintéticas em simultâneo com modificações de ETR, tenha sido estimulada a reacção de Mehler no fotossistema I, facto mencionado anteriormente por vários autores para diversas espécies em condições de défice hídrico (Osmond e Grace 1995, Biehler e Fock 1996, Wingler *et al.* 1999, 2000). No decorrer da reacção de Mehler forma-se superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Foyer e Harbinson 1999). A SOD catalisa a dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ a peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e oxigénio molecular (O_2) (Asada 1999). O H_2O_2 formado no cloroplasto poderá

depois ser eliminado, através da sua redução a água, por acção da peroxidase do ascorbato (Apx). Esta enzima utiliza o ascorbato como substrato, oxidando-o a monodesidroascorbato. Para que o ciclo de eliminação de H_2O_2 continue, é necessária a regeneração do ascorbato. Esta pode resultar da re-redução do monodesidroascorbato, com electrões provenientes da ferredoxina (Miyake e Asada 1994), do NADPH ou do NADH (Hossain e Asada 1985), catalisada pela enzima redutase do monodesidroascorbato (MDHAR), ou da reacção de oxidação-redução do monodesidroascorbato em ascorbato e desidroascorbato (Polle 2001). O desidroascorbato assim formado pode ser reciclado em ascorbato por via do ciclo ascorbato-glutationa com participação das enzimas redutase do desidroascorbato (DHAR) e redutase da glutatona (GR) (Polle *et al.* 1990, Asada 1992, Bowler *et al.* 1992, Asada 1999, Foyer e Harbinson 1999, Polle 2001). No entanto, nas plantas de *L. albus* em défice hídrico ligeiro, a actividade da peroxidase do ascorbato diminuiu e as enzimas DHAR e MDHAR, necessárias à regeneração do ascorbato, não foram activadas, sendo muito provável que tenha ocorrido acumulação de peróxido de hidrogénio, como foi observado em plantas de *Medicago sativa* (Irigoyen *et al.* 1992), de *Triticum aestivum* (Sairam *et al.* 1998) e de *Oryza sativa* (Srivalli *et al.* 2003) em défice hídrico, na sequência da activação da SOD, até porque a actividade da catalase, outra enzima capaz de eliminar o H_2O_2 (Larson 1988), também não se alterou nas plantas de *L. albus* em défice hídrico.

A acumulação de H_2O_2 poderá ter sido a origem possível do stresse oxidativo que se verificou nas folhas de *L. albus* em défice hídrico ligeiro, uma vez que na presença de iões metálicos e de superóxido o peróxido de hidrogénio reage, formando-se o radical hidroxilo (reacção de Haber-Weiss) (Bowler *et al.* 1992, Benov 2001, Van Breusegem *et al.* 2001), espécie química muito reactiva, responsável pela peroxidação de lípidos, desnaturação de proteínas e por mutações no DNA (Bowler *et al.* 1992). De facto, Sairam e Srivastava (2000) observaram que a degradação da clorofila, o aumento da peroxidação de lípidos e o decréscimo da estabilidade das membranas foram induzidas pelo aumento da concentração de peróxido de hidrogénio, em folhas de *Triticum aestivum* bem hidratadas, quando mergulhadas em soluções com diversas molaridades de peróxido de hidrogénio.

Nas plantas de *L. albus* em défice hídrico moderado continuou a ocorrer stresse oxidativo, apesar da diminuição da actividade da SOD. Este facto pode em parte dever-se à continuação da diminuição da actividade da Apx, que poderá ter provocado um desequilíbrio entre a taxa de formação de H_2O_2 por acção da SOD, e a taxa de eliminação, por parte da Apx, independentemente de as actividades enzimáticas de DHAR, MDHAR terem voltado a ser semelhantes às observadas nas folhas controlo, ou mesmo de a actividade da GR ser

superior à observada nas plantas controlo. Na verdade, sem a activação da Apx não ocorre a redução do H_2O_2 a água nem o ascorbato é reduzido, pelo que alterações na actividade das enzimas que participam no processo de regeneração do ascorbato como a DHAR, MDHAR e GR não terão influência na gestão das espécies reactivas de oxigénio.

Ao contrário do que se verificou em *L. albus*, nas folhas de *H. annuus* o défice hídrico não induziu qualquer alteração na actividade de nenhuma das enzimas do sistema antioxidante. No entanto, Zhang e Kirkham (1996) observaram o aumento da actividade da Apx, DHAR, MDHAR e da catalase em plantas de *H. annuus* em défice hídrico. As diferenças existentes entre estes resultados residem talvez no facto de estes autores terem submetido as plantas em défice hídrico a intensidades luminosas mais altas. O trabalho realizado por Sgherri e Navari-Izzo (1995) confirma de algum modo esta hipótese, já que estes autores também observaram aumentos na actividade da Apx e do teor foliar em H_2O_2 , num ensaio conduzido no campo, em que as plantas em défice hídrico tinham um teor relativo em água foliar semelhante aos atingidos nos nossos ensaios. Adicionalmente, Yoshimura *et al.* (2000), num trabalho realizado com *Spinacea oleracea* submetida a défice hídrico, stresse por excesso de salinidade ou stresse por excesso de luz, só registaram aumento na actividade da Apx nas plantas submetidas a irradiância alta.

Não tendo aumentado a actividade da SOD e não havendo indícios de que a fotorrespiração tenha sido estimulada, não parecem ter-se reunido condições nas folhas de *H. annuus* para a acumulação de H_2O_2 , tendo estas plantas tido a capacidade de evitar o stresse oxidativo, como é demonstrado pela manutenção de níveis baixos de dialdeído malónico (MDA).

Durante a rehidratação das plantas de *L. albus* verificou-se um ligeiro decréscimo do teor foliar em clorofila total e também um ligeiro aumento da proporção dos carotenóides relativamente à clorofila total. Este decréscimo, indicadores de entrada em senescência foliar (Smart 1994, Merzlyak e Gitelson 1995), não foram estatisticamente significativos, mas as folhas amostradas nas plantas reidratadas tinham uma posição na planta cerca de duas folhas acima das folhas anteriormente amostradas nas plantas em défice hídrico moderado. Nas folhas de *L. albus* iniciadas ao mesmo tempo que as folhas amostradas sob condições de défice hídrico moderado, foram observados sintomas evidentes de senescência, que incluíram o seu amarelecimento e queda, tal como Pinheiro *et al.* (2001) já tinham observado ser induzidos pelo défice hídrico nesta espécie. Nas plantas de *H. annuus* não foi observado qualquer sintoma de indução de senescência foliar pelos défices hídricos.

O declínio nas defesas enzimáticas antioxidantes, como as ocorridas nas folhas de *L. albus* em déficit hídrico, foi apontado como a possível causa para a senescência foliar em diversas espécies (Ye *et al.* 2000, Prochazkova *et al.* 2001, Munné-Bosch *et al.* 2001). Assim, é possível que o stresse oxidativo detectado nas plantas de *L. albus* em déficit hídrico tenha despoletado o processo de senescência foliar e de abscisão observados.

A senescência foliar é o resultado de um processo programado e altamente coordenado ao nível molecular, celular bioquímico e fisiológico, que envolve toda a planta. A aceleração da senescência foliar em plantas em déficit hídrico pode ser vantajosa para a planta como um todo, já que permite reduzir a área foliar e proceder ao desmantelamento organizado de proteínas, lípidos e de outras macromoléculas e à sua exportação para tecidos em crescimento ou para órgãos de reserva (Munné-Bosch e Alegre 2004). Por outro lado, em trabalhos realizados com genótipos de *Triticum aestivum* tolerantes e susceptíveis à secura, Sairam *et al.* (1998) verificaram que, nas plantas em déficit hídrico, no genótipo tolerante, as actividades da catalase e da peroxidase do ascorbato eram superiores e ocorria menor acumulação de H₂O₂ e menor peroxidação de lípidos (avaliada pelo teor em dialdeído malónico) que as registadas no genótipo susceptível, o qual exibiu menor actividade daquelas enzimas e teores em H₂O₂ e dialdeído malónico superiores. Noutro trabalho, Sairam *et al.* (1997/98) obtiveram resultados semelhantes e verificaram o decréscimo do teor foliar em clorofila total e em carotenóides totais no genótipo susceptível.

Apesar de *L. albus* ser uma espécie com alguma variabilidade genética no que respeita à tolerância ao déficit hídrico, é considerada como uma espécie que evita o déficit hídrico, ou seja, uma espécie que deve completar o seu ciclo de desenvolvimento antes do agravamento das condições de déficit hídrico (Huyghe 1997). Os resultados obtidos em *L. albus* em déficit hídrico mostraram que, se por um lado estas plantas têm a possibilidade de evitar os efeitos da sobreexcitação da clorofila por acção dos carotenóides, por outro lado o déficit hídrico induz o aumento do stresse oxidativo, o que, segundo os trabalhos de Sairam *et al.* (1997/98, 1998) é característico de plantas susceptíveis ao déficit hídrico. Deste modo, o aumento do stresse oxidativo nas plantas de *L. albus* pode corresponder a uma estratégia de sobrevivência da planta inteira, através do sacrifício de algumas das folhas mais velhas por indução da senescência foliar, que lhe permita completar o seu ciclo vegetativo.

Ao contrário de *L. albus*, a espécie *H. annuus* é considerada tolerante ao déficit hídrico (Zhang e Kirkham 1996). De facto, estas plantas reagiram ao déficit hídrico com o incremento no teor foliar em pigmentos antioxidantes, aumentando deste modo a sua capacidade de sequestrar $^3\text{Chl}^*$ e $^1\text{O}_2^*$, constituindo esta uma primeira reacção no sentido de evitar o stresse

oxidativo. Por outro lado, o facto de nas plantas de *H. annuus* a actividade da Apx ser sempre superior à verificada nas plantas de *L. albus* revela que têm uma maior capacidade de eliminar o H₂O₂. Acresce ainda que, enquanto nas plantas de *L. albus* o equilíbrio entre a actividade da Apx e da SOD foi alterado no sentido da predominância da SOD, o mesmo não se verificou nas plantas de *H. annuus*. Estes resultados apontam para a importância do equilíbrio entre a actividade destas duas enzimas antioxidantes, como Sen Gupta *et al.* (1993) sugeriram, e vão de encontro ao referido por Sairam *et al.* (1998) segundo quem os sistemas de eliminação do H₂O₂, nomeadamente aqueles em que participam a peroxidase do ascorbato e a catalase, podem ser decisivos para conferir tolerância à secura.

Os presentes resultados mostram que o défice hídrico por si só, pode induzir respostas normalmente associadas à ocorrência conjunta de défice hídrico e altas irradiâncias, tais como o stresse oxidativo que ocorreu em *L. albus* e o aumento no teor foliar em pigmentos antioxidantes que ocorreu em *H. annuus*.

5.5. Referências bibliográficas

- Adams III W. W., Demmig-Adams B. (1992). Operation of the xanthophyll cycle in higher plants in response to diurnal changes in incident sunlight. *Planta*, **186**: 390-398.
- Asada K. (1992). Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, **85**: 235-241.
- Asada K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**: 601-639.
- Azzi A., Davies K. J. A., Kelly F. (2004). Free radical biology - terminology and critical thinking. *FEBS Letters*, **558**: 3-6.
- Baker N. R. (1991). A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, **81**: 563-570.
- Bartosz G. (1997). Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, **19**: 47-64.
- Benov L. (2001). How superoxide radical damages the cell. *Protoplasma*, **217**: 33-36.
- Biehler K., Fock H. (1996). Evidence for the contribution of the Mehler-Peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. *Plant Physiology*, **112**: 265-272.
- Bowler C., Van Montagu M., Inzé D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **43**: 83-116.
- Choudhury N. K., Behera R. K. (2001). Photoinhibition of photosynthesis: Role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents. *Photosynthetica*, **39**: 481-488.

- Davenport S. B., Gallego S. M., Benavides M. P., Tomaro M. L. (2003). Behaviour of antioxidant defense system in the adaptive response to salt stress in *Helianthus annuus* L. cells. *Plant Growth Regulation*, **40**: 81-88.
- Demmig-Adams B., Adams III W. W. (1992). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **43**: 599-626.
- Demmig-Adams B., Adams III W. W. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, **1**: 21-26.
- Demmig-Adams B., Adams III W. W., Barker D. H., Logan B. A., Bowling D. R., Verhoeven A. S. (1996). Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum*, **98**: 253-264.
- Demmig-Adams B., Moeller D. L., Logan B. A., Adams W. W. (1998). Positive correlation between levels of retained zeaxanthin plus antheraxanthin and degree of photoinhibition in shade leaves of *Schefflera arboricola* (Hayata) Merrill. *Planta*, **205**: 367-374.
- Foyer C. H., Harbinson J. (1999). Relationships between antioxidant metabolism and carotenoids in the regulation of photosynthesis. In Frank H. A., Young A. J., Britton G., Cogdell R. J. (eds.) *The Photochemistry of carotenoids*. KluwerAcademic Publishers, p. 305-325.
- Foyer C., Noctor G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*, **28**: 1056-1071.
- Fu J. M., Huang B. R. (2001). Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, **45**: 105-114.
- 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 et Biophysica Acta*, **990**: 87-92.
- Golding A. J., Johnson G. N. (2003). Down-regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. *Planta*, **218**: 107-114.
- Govindjee (1995). Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll *a* fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology*, **22**: 131-160.
- Havir E. A., McHale N. A. (1987). Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, **84**: 450-455.
- Henzler T., Ye Q., Steudle E. (2004). Oxidative gating of water channels (aquaporins) in *Chara* by hydroxyl radicals. *Plant, Cell and Environment*, **27**: 1184-1195.
- Hossain M. A., Asada K. (1985). Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **260**: 12920-12926.
- Huyghe C. (1997). White lupin (*Lupinus albus* L.). *Field Crops Research*, **53**: 147-160.

- Irigoyen J. J., Emerich D. W., Sánchez-Díaz M. (1992). Alfafa leaf senescence induced by drought stress: photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evolution. *Physiologia Plantarum*, **84**: 67-72.
- Iturbe-Ormaetxe I., Escuredo P., Arrese-Igor C., Becana M. (1998). Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiology*, **116**: 173-181.
- Jung S. (2004). Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. *Plant Science*, **166**: 459-466.
- Krall J. P., Edwards G. E. (1992). Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves. *Physiologia Plantarum*, **86**: 180-187.
- Krieger-Liszka A. (2005). Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, **56**: 337-346.
- Larson R. A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, **27**: 969-978.
- Lima A. L. S., DaMatta F. M., Pinheiro H. A., Totola M. R., Loureiro M. E. (2002). Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany*, **47**: 239-247.
- Makino A., Miyake C., Yokota A. (2002). Physiological functions of the water-water cycle (Mehler reaction) and the cyclic electron flow around PSI in rice leaves. *Plant and Cell Physiology*, **43**: 1017-1026.
- Merzlyak M. N., Gitelson A. (1995). Why and what for the leaves are yellow in autumn? On the interpretation of optical spectra of senescing leaves (*Acer platanoides* L.). *Journal of Plant Physiology*, **145**: 315-320.
- Miyake C., Asada K. (1994). Ferredoxin-dependent photoreduction of the monodehydroascorbate radical in spinach thylakoids. *Plant and Cell Physiology*, **35**: 539-549.
- Moran J. F., Becana M., Iturbe-Ormaetxe I., Frechilla S., Klucas R. V., Aparicio-Tejo P. (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*, **194**: 346-352.
- Munné-Bosch S., Jubany-Marí T., Alegre L. (2001). Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts. *Plant, Cell and Environment*, **24**: 1319-1327.
- Munné-Bosch S., Alegre L. (2004). Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology*, **31**: 203-216.
- Niyogi K. K., Grossman A. R., Björkman O. (1998). Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *The Plant Cell*, **10**: 1121-1134.
- Niyogi K. K. (2000). Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**: 455-460.

Osmond C. B., Grace S. C. (1995). Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*, **46**: 1351-1362.

Pinheiro C., Chaves M. M., Ricardo C. P. (2001). Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deficit in the stems and leaves of *Lupinus albus* L. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 1063-1070.

Pogson B. J., Niyogi K. K., Bjorkman O., DellaPenna D. (1998). Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in *Arabidopsis* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**: 13324-13329.

Polle A., Chakrabarti K., Schurmann W., Rennenberg H. (1990). Composition and properties of hydrogen peroxide decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of norway spruce (*Picea abies* L., Karst). *Plant Physiology*, **94**: 312-319.

Polle A. (1996). Mehler reaction: friend or foe in photosynthesis? *Botanica Acta*, **109**: 84-89.

Polle A. (2001). Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology*, **126**: 445-462.

Prochazkova D., Sairam R. K., Srivastava G. C., Singh D. V. (2001). Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*, **161**: 765-771.

Ratnayaka H. H., Molin W. T., Sterling T. M. (2003). Physiological and antioxidant responses of cotton and spurred anoda under interference and mild drought. *Journal of Experimental Botany*, **54**: 2293-2305.

Sairam R. K., Shukla D. S., Saxena D. C. (1997/98). Stress induced injury and antioxidant enzymes in relation to drought tolerance in wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, **40**: 357-364.

Sairam R. K., Deshmukh P. S., Saxena D. C. (1998). Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biologia Plantarum*, **41**: 387-394.

Sairam R. K., Srivastava G. C. (2000). Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, **43**: 381-386.

Sairam R. K., Singh D. V., Srivastava G. C. (2003/04). Changes in activities of antioxidant enzymes in sunflower leaves of different ages. *Biologia Plantarum*, **47**: 61-66.

Sairam R. K., Srivastava G. C., Agarwal S., Meena R. C. (2005). Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, **49**: 85 - 91.

Schwanz P., Polle A. (2001). Differential stress responses of antioxidative systems to drought in pendunculate oak (*Quercus robur*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high CO₂ concentrations. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 133-143.

- Sen Gupta A., Webb R. P., Scott Holaday A., Allen R. D. (1993). Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants. *Plant Physiology*, **103**: 1067-1073.
- Sgherri C. L. M., Navari-Izzo F. (1995). Sunflower seedlings subjected to increasing water deficit stress: oxidative stress and defence mechanisms. *Physiologia Plantarum*, **93**: 25-30.
- Smart C. M. (1994). Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist*, **126**: 419-448.
- Srivalli B., Sharma G., Khanna-Chopra R. (2003). Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. *Physiologia Plantarum*, **119**: 503-512.
- Tambussi E. A., Bartoli C. G., Beltrano J., Guiamet J. J., Araus J. L. (2000). Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiologia Plantarum*, **108**: 398-404.
- Van Breusegem F., Vranová E., Dat J. F., Inzé D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, **161**: 405-414.
- Weber H., Chételat A., Reymond P., Farmer E. E. (2004). Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *The Plant Journal*, **37**: 877-888.
- Wingler A., Quick W. P., Bungard R. A., Bailey K. J., Lea P. J., Leegood R. C. (1999). The role of photorespiration during drought stress: an analysis utilizing barley mutants with reduced activities of photorespiratory. *Plant Cell and Environment*, **22**: 361-373.
- Wingler A., Lea P. J., Quick W. P., Leegood R. C. (2000). Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, **355**: 1517-1529.
- Ye Z. Z., Rodriguez R., Tran A., Hoang H., de los Santos D., Brown S., Vellanoweth R. L. (2000). The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, **158**: 115-127.
- Yoshimura K., Yabuta Y., Ishikawa T., Shigeoka S. (2000). Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology*, **123**: 223-234.
- Yu Q., Rengel Z. (1999). Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutases in narrow-leafed lupinus. *Plant Science*, **142**: 1-11.
- Zhang J., Kirkham M. B. (1996). Enzymatic responses of the ascorbate-glutathione cycle to drought in sorghum and sunflower plants. *Plant Science*, **113**: 139-147.

Capítulo 6

Considerações finais

6. Considerações finais

Em condições de déficit hídrico, a diminuição da taxa fotossintética pode ser essencialmente devida à diminuição da condutância estomática (Davies e Zhang 1991, Cornic e Fresnau 2002), a limitações ao nível do mesófilo (Chaves 1991, Gunasekera e Berkowitz 1993, Tezara *et al.* 1999, Pankovic *et al.* 1999) ou ainda à combinação de ambas (Tang *et al.* 2002), havendo quem defenda que as limitações ao nível do mesófilo surgem apenas para os níveis mais elevados de desidratação dos tecidos, correspondentes aos défices hídricos mais severos (Cornic 2000, Flexas e Medrano 2002). Enquanto a diminuição da condutância estomática terá como efeito mais imediato a diminuição da concentração de carbono nos espaços intercelulares (Chaves 1991, Cornic 2000, Chaves 2003), as limitações ao nível do mesófilo incluem a diminuição da condutância do mesófilo para o CO₂ (Chaves 2003), o decréscimo do teor foliar em ATP (Tezara *et al.* 1999), a diminuição da taxa de regeneração da RuBP (Gunasekera e Berkowitz 1993, Pankovic *et al.* 1999, Tezara *et al.* 1999) e o decréscimo da actividade da Rubisco (Pankovic *et al.* 1999). No entanto, a diminuição da taxa fotossintética devida ao decréscimo da concentração de CO₂ nos espaços intercelulares decorrente do decréscimo da condutância estomática pode implicar, só por si, a redução da frequência do ciclo de Calvin com a consequente diminuição no consumo de ATP e NADPH, inibição em 'feedback' da sua síntese e perturbação da taxa de transporte de electrões dependente do fotossistema II. Deste modo, a diminuição de NP devida à diminuição da condutância estomática poderá dar início, manter ou intensificar várias modificações no metabolismo. Sabe-se também que o déficit hídrico acelera a senescência das folhas mais velhas em plantas de várias espécies (Aparício-Tejo e Boyer 1983, O'Neill 1983, Olsson 1995), podendo este processo constituir uma estratégia de sobrevivência da planta como um todo, ao diminuir as suas necessidades em água e simultaneamente permitir a reciclagem de nutrientes pelos tecidos mais jovens ou em crescimento, ou ainda pelos órgãos de reserva (Munné-Bosch e Alegre 2004). Por outro lado, David *et al.* (1998) observaram que a actividade fotossintética de folhas mais jovens recuperou dos efeitos da imposição dos défices hídricos, ao contrário do que ocorreu em folhas mais velhas, nas quais a rehidratação pareceu agravar os efeitos do déficit hídrico sobre o desempenho do aparelho fotossintético, tal como já havia sido sugerido por Kaiser (1987) e por Dreesmann *et al.* (1994).

Os resultados deste trabalho indicam que as restrições à actividade fotossintética que ocorreram nas plantas de *H. annuus* variaram com a idade foliar e com a intensidade do déficit hídrico imposto. A acumulação de açúcares solúveis pode ter sido responsável pela inibição em 'feed-back' da actividade fotossintética nas folhas jovens e nas folhas maduras de *H. annuus*

(Sheen 1990). Adicionalmente, os resultados mostraram que, nas folhas maduras em défice hídrico, as diminuições observadas nas taxas líquidas de fotossíntese podem ter sido devidas à activação da fotorrespiração e possivelmente da reacção de Mehler (já observadas por Wingler *et al.* (1999) e por Biehler e Fock (1996) em condições de défice hídrico), independentemente da intensidade do stresse, enquanto nas folhas jovens a activação destas vias metabólicas só parece ter ocorrido nas plantas em stresse mais severo. A aparente activação da fotorrespiração e da reacção de Mehler pode ter contribuído para evitar a fotoinibição crónica (Osmond e Grace 1995, Kozaki e Takeba 1996) nas folhas em défice hídrico severo e também nas folhas maduras em défice hídrico menos intenso. As folhas jovens em défice hídrico revelaram capacidade de reforçar a sua protecção antioxidante através do incremento no teor foliar em carotenóides, enquanto as folhas maduras controladas já apresentavam teores altos destes pigmentos, que não se alteraram com a imposição do défice hídrico. O maior aumento de stresse oxidativo nas folhas mais jovens pode, em *H. annuus*, estar associado a uma melhoria na sua capacidade de resistir ao défice hídrico, dadas as funções de sinalização atribuídas a algumas espécies reactivas de oxigénio, nomeadamente na indução de genes que codificam para desidrinas e enzimas do sistema antioxidante (Weber *et al.* 2004) e na regulação do funcionamento das aquaporinas (Henzler *et al.* 2004). No entanto, a recuperação da actividade fotossintética após a rehidratação do substrato foi semelhante nas duas idades foliares, apesar das diferenças registadas durante a imposição dos défices hídricos.

Em condições de campo o défice hídrico aparece normalmente associado a irradiância alta, pelo que a interacção entre estes dois factores tem sido objecto de muitos trabalhos. Vários autores demonstraram que a exposição das plantas à acção conjunta dos défices hídricos e de altas irradiâncias induz frequentemente fotoinibição (Brestic *et al.* 1995, Valentini *et al.* 1995, Heber *et al.* 1996, Yoshimura *et al.* 2000, Jiao *et al.* 2004,) mas os resultados de Valladares e Pearcy (2002) indicam que a capacidade das plantas em recuperar dos efeitos do défice hídrico a baixa intensidade luminosa não só não aumenta como pode inclusive diminuir. Os resultados dos ensaios em que as plantas (controlo, em défice hídrico e em rehidratação) foram submetidas a diminuições transitórias da densidade de fluxo quântico mostraram que em qualquer um dos regimes hídricos ocorreu a redução da actividade fotossintética em resposta à transição para irradiâncias baixas. Nesta situação, o défice hídrico não impôs qualquer redução adicional nas taxas fotossintéticas. Nas plantas em défice hídrico severo mantidas a irradiância alta, a sinergia entre os dois factores contribuiu para uma aparente indução da fotorrespiração e/ou da reacção de Mehler e para a ocorrência de stresse oxidativo, o que não se verificou nas plantas transferidas para intensidade luminosa baixa. As espécies

reactivas de oxigénio indutoras de stresse oxidativo parecem ter um papel importante na percepção e reacção a estímulos ambientais (Foyer e Noctor 2005), pelo que a ausência de stresse oxidativo pode em si mesma constituir uma desvantagem para as plantas transferidas para irradiância baixa. Os resultados obtidos nestas plantas sugerem que o défice hídrico pode induzir por si só o aumento da protecção antioxidante através do incremento no teor foliar em carotenóides. O aumento do investimento em sacarose nas plantas em défice hídrico vai de encontro às funções de protecção contra os défices hídricos que lhe são atribuídas (Ingram e Bartels 1996, Hoekstra *et al.* 2001), mas o estímulo aparente da exportação de fotoassimilados durante a rehidratação nas folhas transferidas para baixa intensidade luminosa leva a considerar que a rehidratação levada a cabo sob baixa irradiância possa conduzir à inibição do crescimento. Deste modo, os resultados obtidos apontam para que não haja vantagem na imposição dos défices hídricos ou da rehidratação sob baixa intensidade luminosa. Neste conjunto de ensaios os dados indicaram também que nem sempre o ‘quenching’ fotoquímico está directamente relacionado com o índice de desoxidação dos pigmentos do ciclo das xantofilas, e que ambos os parâmetros dependem da intensidade luminosa.

Os estudos desenvolvidos em plantas sob stresse (e também em recuperação) têm evidenciado cada vez mais a importância da função sinalizadora das espécies reactivas de oxigénio na reacção das plantas aos estímulos externos (Foyer e Noctor 2005). No entanto, esta função implica também que haja um elevado grau de regulação dos níveis de agentes oxidantes e antioxidantes, regulação na qual as enzimas do sistema antioxidante desempenham um papel essencial (Sen Gupta *et al.* 1993, Sairam *et al.* 1998, Sofo *et al.* 2005). Nos ensaios realizados com *Lupinus albus* e com *Helianthus annuus* em fase reprodutiva verificou-se que, quando submetidas a défice hídrico, cada espécie adoptou uma estratégia distinta para enfrentar o stresse. Nas folhas amostradas das plantas *L. albus* em défice hídrico ligeiro parece ter ocorrido a activação da reacção de Mehler com a consequente activação da dismutase do superóxido (SOD), apesar do teor em carotenóides constitutivamente alto que estas plantas evidenciaram. Este aumento da actividade da SOD foi acompanhado por uma diminuição significativa da actividade da peroxidase do ascorbato e este desequilíbrio entre a actividade das duas enzimas deverá ter sido uma das origens do stresse oxidativo (Sen Gupta *et al.* 1993, Sairam *et al.* 1998) que se observou. Este poderá ter sido ainda o sinal indutor da entrada em senescência foliar (Munné-Bosch e Alegre 2004) que se verificou em seguida. Por outro lado, nas folhas de *H. annuus* em défice hídrico não ocorreu stresse oxidativo e a actividade das enzimas do sistema antioxidante também não se alterou, tendo estas plantas evidenciado aptidão para melhorar a sua capacidade de sequestrar o tripleto da clorofila ($^3\text{Chl}^*$) e o singlete

do oxigénio ($^1\text{O}_2^*$) através do aumento do teor foliar em carotenóides, o que parece ser uma resposta induzida pelo défice hídrico nesta espécie, mesmo a intensidades luminosas baixas. Os resultados obtidos por Yoshimura *et al.* (2000) indicam que a actividade da Apx aumenta em resposta ao excesso de irradiância e não em resposta ao défice hídrico ou ao stresse por salinidade, o que poderá, pelo menos parcialmente, explicar porque não aumentou a actividade de Apx nos presentes ensaios. Este comportamento pode ainda constituir uma desvantagem adicional (para algumas espécies) da imposição dos défices hídricos a baixas irradiâncias, ao contribuir para o desequilíbrio entre as actividades da SOD e da Apx.

Apesar de os níveis de défice hídrico atingidos pelas plantas de *L. albus* e de *H. annuus* não terem sido muito intensos (ensaios de 2001), o aparecimento de stresse oxidativo nas folhas de *L. albus* pode ter estado na origem da entrada em senescência foliar, iniciada pelo decréscimo dos teores em clorofila total e da razão entre os teores em clorofila total e carotenóides (Smart 1994, Merzlyak e Gitelson 1995), das folhas em rehidratação. A indução de senescência foliar foi confirmada pela visualização do amarelecimento e queda das folhas com posição correspondente às que tinham sido amostradas nas plantas em défice hídrico. Nas plantas de *Lupinus albus*, que têm como estratégia evitar a secura (Huyghe 1997), a indução da senescência foliar poderá ser a estratégia que lhes permite aumentar as probabilidades de conclusão do seu ciclo de vida em situações de défice hídrico. Ao contrário de *L. albus*, as plantas de *H. annuus*, tolerantes à secura (Zhang e Kirkham 1996), demonstraram capacidade de evitar o stresse oxidativo. No conjunto dos ensaios envolvendo plantas de *H. annuus* não foram detectados quaisquer indícios de senescência foliar nas folhas amostradas nem mesmo nos casos em que foi detectado stresse oxidativo nas folhas em défice hídrico, pelo que se sugere que nesta espécie serão necessários níveis de stresse oxidativo superiores aos atingidos para induzir senescência foliar.

Enquanto em *H. annuus* os défices hídricos aparentam induzir mecanismos de fotoprotecção que se podem manter durante a rehidratação e com isso fazer com que estas plantas adoptem níveis de produtividade mais baixos, expressos na recuperação incompleta das taxas líquidas de fotossíntese, em *L. albus* a activação dos mecanismos fotoprotectores aparenta estar incluída numa estratégia de indução de senescência foliar que poderá permitir à planta completar o seu ciclo de vida antes do agravamento das condições de stresse.

6.1. Referências bibliográficas

- Aparicio-Tejo P. M., Boyer J. S. (1983). Significance of accelerated leaf senescence at low water potentials for water loss and grain yield in maize. *Crop Science*, **23**: 1198-1202.
- Biehler K., Fock H. (1996). Evidence for the contribution of the Mehler-Peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. *Plant Physiology*, **112**: 265-272.
- Brestic M., Cornic G., Fryer M. J., Baker N. R. (1995). Does photorespiration protect the photosynthetic apparatus in French bean leaves from photoinhibition during drought stress? *Planta*, **196**: 450-457.
- Chaves M. M. (1991). Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*, **42**: 1-16.
- Chaves M. M., Maroco J. P., Pereira J. S. (2003). Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, **30**: 239-264.
- Cornic G. (2000). Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture - not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science*, **5**: 187-188.
- Cornic G., Fresneau C. (2002). Photosynthetic carbon reduction and carbon oxidation cycles are the main electron sinks for photosystem II activity during a mild drought. *Annals of Botany*, **89**: 887-894.
- David M. M., Coelho D., Barrote I., Correia M. J. (1998). Leaf age effects on photosynthetic activity and sugar accumulation in droughted and rewatered *Lupinus albus* plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, **25**: 299-306.
- Davies W. J., Zhang J. (1991). Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **42**: 55-76.
- Dreesmann D. C., Harn C., Daie J. (1994). Expression of genes encoding Rubisco in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants subjected to gradual desiccation. *Plant Cell Physiology*, **35**: 645-653.
- Foyer C., Noctor G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*, **28**: 1056-1071.
- Flexas J., Medrano H. (2002). Drought-inhibition of photosynthesis in C₃ plants: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany*, **89**: 183-189.
- Gunasekera D., Berkowitz G. A. (1993). Use of transgenic plants with Ribulose-1,5-Biphosphate Carboxylase/Oxygenase antisense DNA to evaluate the rate limitation of photosynthesis under water stress. *Plant Physiology*, **103**: 629-635.
- Heber U., Bligny R., Streb P., Douce R. (1996). Photorespiration is essential for the protection of the photosynthetic apparatus of C₃ plants against photoinactivation under sunlight. *Botanica Acta*, **109**: 307-315.

Henzler T., Ye Q., Steudle E. (2004). Oxidative gating of water channels (aquaporins) in *Chara* by hydroxyl radicals. *Plant, Cell and Environment*, **27**: 1184-1195.

Hoekstra F. A., Golovina E. A., Buitink J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, **6**: 431-438.

Huyghe C. (1997). White lupin (*Lupinus albus* L.). *Field Crops Research*, **53**: 147-160.

Ingram J., Bartels D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**: 377-403.

Jiao S., Emmanuel H., Guikema J. A. (2004). High light stress inducing photoinhibition and protein degradation of photosystem I in *Brassica rapa*. *Plant Science*, **167**: 733-741.

Kaiser W. M. (1987). Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum*, **71**: 142-149.

Kozaki A., Takeba G. (1996). Photorespiration protects C₃ plants from photooxidation. *Nature*, **384**: 557-560.

Merzlyak M. N., Gitelson A. (1995). Why and what for the leaves are yellow in autumn? On the interpretation of optical spectra of senescing leaves (*Acer platanoides* L.). *Journal of Plant Physiology*, **145**: 315-320.

Munné-Bosch S., Alegre L. (2004). Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology*, **31**: 203-216.

Olsson M. (1995). Alterations in lipid composition, lipid peroxidation and anti-oxidative protection during senescence in drought stressed plants and non-drought stressed plants of *Pisum sativum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **33**: 547-553.

O'Neill S. (1983). Role of osmotic potential gradients during water stress and leaf senescence in *Fragaria virginiana*. *Plant Physiology*, **72**: 931-937.

Osmond C. B., Grace S. C. (1995). Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*, **46**: 1351-1362.

Pankovic D., Sakac Z., Kevresan S., Plesnicar M. (1999). Acclimation to long-term water deficit in the leaves of two sunflower hybrids: photosynthesis, electron transport and carbon metabolism. *Journal of Experimental Botany*, **50**: 127-138.

Sairam R. K., Deshmukh P. S., Saxena D. C. (1998). Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biologia Plantarum*, **41**: 387 - 394.

Sen Gupta A., Webb R. P., Scott Holaday A., Allen R. D. (1993). Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants. *Plant Physiology*, **103**: 1067-1073.

Sheen J. (1990). Metabolic repression of transcription in higher plants. *The Plant Cell*, **2**: 1027-1038.

- Smart C. M. (1994). Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist*, **126**: 419-448.
- Sofo A., Dichio B., Xiloyannis C., Masia A. (2005). Antioxidant defences in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology*, **32**: 45-53.
- Tang A.-C., Kawamitsu Y., Kanechi M., Boyer J. S. (2002). Photosynthetic oxygen evolution at low water potential in leaf discs lacking an epidermis. *Annals of Botany*, **89**: 861-870.
- Tezara W., Mitchell V. J., Driscoll S. D., Lawlor D. W. (1999). Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, **401**: 914-917.
- Valentini R., Epron D., De Angelis P., Matteucci G., Dreyer E. (1995). *In situ* estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant Cell and Environment*, **18**: 631-640.
- Valladares F., Pearcy R. W. (2002). Drought can be more critical in the shade than in the sun: a field study of carbon gain and photo-inhibition in a Californian shrub during a dry El Niño year. *Plant Cell and Environment*, **25**: 749-759.
- Weber H., Chételat A., Reymond P., Farmer E. E. (2004). Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *The Plant Journal*, **37**: 877-888.
- Wingler A., Quick W. P., Bungard R. A., Bailey K. J., Lea P. J., Leegood R. C. (1999). The role of photorespiration during drought stress: an analysis utilizing barley mutants with reduced activities of photorespiratory enzymes. *Plant Cell and Environment*, **22**: 361-373.
- Yoshimura K., Yabuta Y., Ishikawa T., Shigeoka S. (2000). Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology*, **123**: 223-234.
- Zhang J., Kirkham M. B. (1996). Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist*, **132**: 361-373.

Anexos

ANEXO I

Composição das soluções de rega para *Lupinus albus*:

L1 - Macronutrientes: 0.50 mM KCl, 0.25 mM K₂SO₄ mM, 0.50 mM Ca(NO₃)₂4H₂O, 0.20 mM MgSO₄7H₂O, 0.20 mM KH₂PO₄. Micronutrientes: Solução stock A: 23.128 mM H₃BO₃, 4.573 mM MnCl₂4H₂O e 0.383 mM ZnSO₄7H₂O; Solução stock B: 1.697 mM CoSO₄7H₂O, 0.180 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄4H₂O, 1.920 mM Na₂CrO₄, 1.966 mM NH₄VO₃, 1.704 mM NiSO₄6H₂O, 3.164 mM CuSO₄5H₂O e 98.02 mM H₂SO₄. As soluções A e B foram misturadas na proporção de 1:20; a solução resultante foi incorporada na solução nutritiva final na proporção de 1:2500. Ferro: foi fornecido à solução nutritiva na proporção de 1:2500, a partir de uma solução mãe com 1.14 g de Fe por L, preparada com citrato de ferro (III) (19% de Fe III).

L2 - Macronutrientes: 1.250 mM KCl, 0.625 mM K₂SO₄ mM, 1.250 mM Ca(NO₃)₂4H₂O, 0.500 mM MgSO₄7H₂O, 0.500 mM KH₂PO₄. Micronutrientes: adicionados à solução nutritiva a partir da mesma solução de micronutrientes descrita para a solução L1 na proporção de 1:1000. Ferro: adicionado a partir da solução mãe descrita para solução L1, na proporção de 1:1000.

L3 - Macronutrientes: 2.50 mM KCl, 1.25 mM K₂SO₄ mM, 2.50 mM Ca(NO₃)₂4H₂O, 1.00 mM MgSO₄7H₂O, 1.00 mM KH₂PO₄. Micronutrientes: adicionados à solução nutritiva a partir da mesma solução de micronutrientes descrita para a solução L1 na proporção de 1:500. Ferro: adicionado a partir da solução mãe descrita para solução L1, na proporção de 1:500.

ANEXO II

Composição das soluções de rega para *Helianthus annuus*:

G1 - Macronutrientes: 0.4 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.2 mM KNO_3 , 0.07 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e 0.13 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Micronutrientes: adicionados a partir de uma solução mãe (46 mM H_3BO_3 , 9 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.8 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.02 mM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) que foi diluída na solução de macronutrientes na proporção de 1:15000. Ferro: adicionado a partir de uma solução stock com 1g de Fe por L de solução, feita com um preparado comercial, um quelato de Fe-EDTA com 13.2% de Fe, de modo a que a sua concentração final na solução de rega fosse 1.2 μM .

G2 - Macronutrientes: 0.6 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.3 mM KNO_3 , 0.105 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e 0.195 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Micronutrientes foram adicionados a partir da mesma solução mãe utilizada em G1 na proporção de 1:10000. Ferro: adicionado a partir da mesma solução stock utilizada em G1, de modo a que a sua concentração final na solução de rega fosse 1.8 μM .

G3 - Macronutrientes: 1.20 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.60 mM KNO_3 , 0.21 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e 0.39 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Micronutrientes: adicionados a partir da mesma solução mãe utilizada em G1, na proporção de 1:5000. Ferro: adicionado a partir da mesma solução stock utilizada em G1, de modo a que a sua concentração final na solução de rega fosse 3.6 μM .

G4 - Macronutrientes: 1.800 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.900 mM KNO_3 , 0.315 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e 0.585 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Micronutrientes: adicionados a partir da mesma solução mãe utilizada em G1, na proporção de 1:3333. Ferro: adicionado a partir da mesma solução stock utilizada em G1, de modo a que a sua concentração final na solução de rega fosse 5.4 μM .

G5 - Macronutrientes: 3.60 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.80 mM KNO_3 , 0.63 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e 1.17 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Μικρονυτριεντες: αδιχιοναδοσ α παρτιρ δα μεσμα σολυ| ©ο μ©ε υτιλιζαδα εμ Γ1, να προπορ| ©ο δε 1:1667. Φερρο: αδιχιοναδο α παρτιρ δα μεσμα σολυ| ©ο στοχκ υτιλιζαδα εμ Γ1, δε μοδο α θυε α συα χονχεντρα| ©ο φιναλ ν α σολυ| ©ο δε ρεγα φοσσε δε 10.8 μM .