



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Unidade de Ciências e Tecnologias Agrárias

**EFEITOS DO STRESS HÍDRICO NO METABOLISMO
FOTOSSINTÉTICO DE *Lupinus albus* L.**

Maria Manuela David

18058

Efeitos do stress hídrico no
metabolismo fotossintético
de L. David.



TESES
SD

Faro
1995



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Unidade de Ciências e Tecnologias Agrárias

**EFEITOS DO STRESS HÍDRICO NO METABOLISMO
FOTOSSINTÉTICO DE *Lupinus albus* L.**

Maria Manuela David

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

Faro
1995

61519618058
5511
DAV. Cte

ÍNDICE

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	VII
-------------------------------	-----

1. INTRODUÇÃO

2. EFEITOS DO STRESS HÍDRICO NO METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO.

ESTADO ACTUAL DO CONHECIMENTO.	5
2.1. EFEITOS AO NÍVEL DA FOLHA.	5
2.1.1. Limitação estomática	6
Difusão do CO ₂ na fase gasosa	6
2.1.2. Limitação não-estomática.	11
Difusão do CO ₂ na fase líquida.	12
Reacções fotoquímicas	13
Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase.....	15
Relações cloroplasto-citosol	18
2.2. EFEITOS AO NÍVEL DA PLANTA INTEIRA.	23
2.2.1. Crescimento e partição da biomassa	23
2.2.2. Efeitos em folhas de diferentes idades.....	24
2.3. EFEITOS DA REHIDRATAÇÃO APÓS STRESS.	28

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1. MATERIAL VEGETAL	31
<i>Lupinus albus</i> L.	31
<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Rosaki	31
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	31
<i>Chenopodium rubrum</i> L. - cultura de células heterotróficas.	32
3.2. MÉTODOS	32
3.2.1. Aplicação e avaliação dos défices hídricos	32
3.2.2. Índice de plastocrono foliar (LPI)	33
3.2.3. Trocas gasosas (CO ₂ e H ₂ O) em folhas intactas.....	33
3.2.4. Capacidade fotossintética	34
3.2.5. Taxa de consumo de O ₂	35
3.2.6. Fluorescência da clorofila <i>a</i>	35
3.2.7. Partição dos assimilados recentes	35
Em discos foliares	35
Em células autotróficas em suspensão.....	36
3.2.8. Quantificação da clorofila (<i>a+b</i>)	36
3.2.9. Quantificação da proteína solúvel	36
3.2.10. Quantificação de metabolitos	36
Açúcares não estruturais	37
Outros metabolitos	37

3.2.11. Actividade enzimática.....	39
Sacarose fosfato sintase	39
Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase.....	39
3.2.12. Quantificação da Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase	40
Quantificação por <i>rocket</i> imunoelectroforese.....	40
Quantificação por métodos imunoenzimáticos.....	42
3.2.13. Quantificação do azoto total	46
4. LIMITAÇÕES DA FOTOSÍNTESE EM CONDIÇÕES DE SECURA DO SOLO. IMPORTÂNCIA RELATIVA DA COMPONENTE ESTOMÁTICA E NÃO-ESTOMÁTICA.	47
4.1. EM FOLHAS RECENTEMENTE EXPANDIDAS	47
Condições experimentais	47
Resultados	48
Tremoceiro (I).....	48
Tremoceiro (II)	51
Videira	55
Eucalipto	58
Discussão	60
4.2. EM FOLHAS DE DIFERENTES IDADES FISIOLÓGICAS.....	65
Condições experimentais	65
Resultados	66
Discussão	70
5. EFEITOS DO STRESS HÍDRICO NO METABOLISMO FOTOSINTÉTICO DA SACAROSE E DO AMIDO	73
5.1. PARTIÇÃO DOS ASSIMILADOS RECENTES EM TECIDOS <i>SINK</i>	73
Condições experimentais	73
Resultados	74
Discussão	79
5.2. PARTIÇÃO DOS ASSIMILADOS RECENTES EM TECIDOS <i>SOURCE</i>	81
Condições experimentais	81
Resultados	81
Discussão	85
6. EFEITOS DO STRESS HÍDRICO NA QUANTIDADE E ACTIVIDADE DA RUBISCO.	89
1º Ensaio (Junho de 1990)	89
Condições experimentais	89
Resultados	90
2º Ensaio (Maio de 1991)	95
Condições experimentais	95
Resultados	95
3º Ensaio (Fevereiro de 1992).....	98
Condições experimentais	98
Resultados	99
Discussão	102

7. CONCLUSÕES GERAIS	105
BIBLIOGRAFIA	107
RESUMO	127
ABSTRACT	129
AGRADECIMENTOS	131

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A	taxa de fotossíntese aparente
A_{\max}	taxa de fotossíntese aparente a irradiância ou a concentração de dióxido de carbono saturantes
A_{sat}	taxa de fotossíntese aparente a irradiância e a concentração de dióxido de carbono saturantes
A	absorvância
ABA	ácido abscísico
APAD	acetil piridina-adenina dinucleótido
ATP	adenosina trifosfato
Bq	becquerel (= uma transformação nuclear por segundo)
C	coeficiente de controle
C_3	via fotossintética de formação do ácido 3-fosfoglicérico (3 carbonos)
C_4	via fotossintética de formação dos ácidos dicarboxílicos com 4 carbonos
CA1P	carboxiarabinitol 1-fosfato
DO	densidade óptica
DTT	ditio-treitol
E	taxa de transpiração
EDTA	ácido etileno diamina tetracético
EGTA	ácido etileno glicol tetracético
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
f	factor multiplicativo
F_0	fluorescência basal
F_m	fluorescência máxima
F_v	fluorescência variável
FBP	frutose 1,6-bisfosfato
FBPase	frutose 1,6-bisfosfatase
Fru6P	frutose 6-fosfato
F26BP	frutose 2,6-bisfosfato
F26BPase	frutose 2,6-bisfosfatase
g	condutância à difusão do vapor de água
g_s	condutância estomática à difusão do vapor de água
g'	condutância à difusão do dióxido de carbono
g'_s	condutância estomática à difusão do dióxido de carbono
g'_m	condutância do mesófilo à difusão do dióxido de carbono
Glc	glucose
Glc1P	glucose 1-fosfato
Glc6P	glucose 6-fosfato
h	hora
IRGA	analisador de gases por infravermelho
LHCII	complexo colector de luz do fotossistema dois
LPI	índice de plastocrono foliar

m	metro
m_f	massa foliar fresca
m_s	massa foliar seca
m_t	massa foliar túrgida (máxima hidratação)
NADH	nicotinamida dinucleótido
NADPH	nicotinamida dinucleótido fosfato reduzida
NADP+	nicotinamida dinucleótido fosfato oxidada
p	nível de significância estatística
p_i	pressão parcial do dióxido de carbono nos espaços intercelulares
PAR	radiação fotossinteticamente activa
PEPC'ase	fosfoenolpiruvato carboxilase
PFP	pirofosfato: frutose 6-fosfato fosfotransferase
PGA	ácido fosfoglicérico
PSI	fotossistema um
PSII	fotossistema dois
RuBisCO	ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase
r^2	quadrado do coeficiente de correlação
RWC	teor relativo em água
s	segundo
SPS	sacarose fosfato sintase
T_f	temperatura da folha
TP	trioses fosfato
UDP	uridina difosfato
v	volume
ϵ	módulo de elasticidade
λ	comprimento foliar de referência
λ'	comprimento foliar de referência para plantas em défice hídrico
Φ	rendimento quântico em função dos <i>quanta</i> incidentes
Φ_a	rendimento quântico em função dos <i>quanta</i> absorvidos
Ψ	potencial da água
Ψ_s	potencial osmótico

1. INTRODUÇÃO

A distribuição geográfica e a produtividade das plantas resultam da interação do potencial genético das populações com os factores ambientais, força selectiva que conduz a alterações nos padrões de desenvolvimento e de funcionamento orgânico, de carácter adaptativo ou aclimatativo. As alterações nos processos biológicos provocados pelo stress ambiental ocorrem a diferentes níveis de funcionamento (metabólico, fisiológico e morfológico) e de organização (do celular à comunidade), e ainda a diferentes escalas temporais (minutos a meses).

Numa grande parte do nosso país, nomeadamente no Algarve, as plantas encontram-se sujeitas a condições climáticas do tipo Mediterrâneo. A precipitação média anual é inferior a 700 mm e não tem regularidade estatística interanual e intra-anual (Daveau, 1988). Irradiâncias elevadas estão normalmente associadas a temperaturas também elevadas e longos períodos de seca (no Verão) ou a temperaturas relativamente baixas (no Inverno e na Primavera). Tais condições propiciam a fotoinibição e conjuntamente com os défices hídricos constituem as principais limitações à produtividade fotossintética das regiões mediterrâneas (Poole *et al.*, 1981; Björkman e Powles, 1984).

O transporte da água no *continuum* solo-planta-atmosfera dá-se a favor do gradiente termodinâmico de potenciais hídricos. Ao nível da interface folha-atmosfera a água é transportada no estado vapor em função da diferença de pressão de vapor nos espaços intercelulares e no ar fora da folha, dependendo do balanço energético da folha. A evaporação da água ao nível da folha, utilizando essencialmente a energia da radiação solar, constitui a força motriz do fluxo em massa da água, do solo até à folha. O estado hídrico da planta depende então quer da capacidade do solo em fornecer água, quer da capacidade evaporativa do ar. O decréscimo no teor de água no solo e a secura do ar conduzirão ao estabelecimento de deficiências hídricas nas plantas. Estas, no entanto, podem exercer algum contróle sobre o fluxo de água transportada, quer no curto quer no médio prazo, através de alterações nas resistências ao fluxo, nos componentes do potencial hídrico e no balanço de calor, respostas estas de grande importância para a sobrevivência em condições ambientais indutoras de deficiências hídricas.

Ao nível da planta inteira os efeitos dos défices hídricos que podem afectar a produção (na área foliar, na partição dos fotoassimilados e no padrão de desenvolvimento) dependem da intensidade e da duração dos défices hídricos e da fase do ciclo da planta em que ocorrem (Hsiao *et al.*, 1976). Ao nível da folha, as interações fundamentais entre os processos determinantes da assimilação do carbono em condições de secura são, *grosso modo*, conhecidas: reconhecida a resistência do aparelho fotoquímico aos défices hídricos, a taxa fotossintética diminui para baixos teores relativos em água devido a alterações quer no funcionamento dos estomas quer no metabolismo do mesófilo (Chaves, 1991; Cornic e Briantais, 1992). Os estomas são estruturas epidérmicas especializadas nas trocas gasosas cujo funcionamento, do ponto de vista evolutivo, responde ao "compromisso" bifuncional da assimilação do dióxido de carbono do ar e da transpiração. Se por um lado, o encerramento dos estomas foi considerado o passo mais limitante à assimilação fotossintética do

carbono em condições de stress hídrico (Hsiao, 1973), por outro lado, estudos efectuados na ausência da limitação estomática (e.g. Kaiser, 1982; Dietz e Heber, 1983) evidenciaram a importância do mesófilo na regulação da actividade fotossintética naquelas condições. A capacidade e a rapidez de recuperação após rehidratação dependem, sobretudo, do genótipo e do grau de severidade do défice hídrico. A turgidez do tecidos restabelece-se rapidamente, mas o alívio do stress restaura diferencialmente os vários processos fisiológicos afectados.

O produto final da fotossíntese são trioses fosfato que são utilizadas na regeneração da molécula aceitadora do dióxido de carbono e em vias biossintéticas, principalmente da sacarose e do amido. A sacarose constitui, para a maioria das espécies, o açúcar translocável mais abundante no floema, enquanto o amido é o principal hidrato de carbono de reserva. Durante a fotossíntese cerca de 50% do carbono fixado vai localizar-se nas moléculas de sacarose e de amido (Gifford *et al*, 1984). Ao nível da folha, a partição do carbono entre as vias biossintéticas daqueles dois hidratos de carbono, ou seja, a partição do carbono entre o cloroplasto e o citoplasma, é regulada por condições que directamente afectam a taxa fotossintética (e.g., a luz), ou por outros mecanismos internos mediados por metabolitos-chave (e.g. frutose 2,6-bisfosfato), em sintonia com o desenvolvimento fenológico da planta (e.g., frutificação), ou despoletados por situações de stress. Nas plantas sujeitas a défices hídricos a síntese e a mobilização dos fotoassimilados são afectadas envolvendo modificações nas relações *source-sink*. Os efeitos a este nível podem ter origem na redução da taxa de transporte devido a alterações nas relações hídricas dos tecidos e/ou em mecanismos mediados ou regulados pelo decréscimo no crescimento e na actividade metabólica dos tecidos *source* e *sink*. Não só o padrão de distribuição dos assimilados pelas raízes, caules, folhas e órgãos reprodutores é alterado, como também ocorrem modificações metabólicas ao nível da folha conducentes a alterações na partição dos assimilados recentes.

Apresentam-se neste trabalho os resultados de um conjunto de estudos efectuados no âmbito dos efeitos do stress hídrico nas trocas gasosas e no metabolismo fotossintético do carbono das plantas superiores C₃. Tentou-se integrar informação obtida a diferentes níveis de organização (da célula à planta inteira) e em diferentes aspectos da fisiologia vegetal (da bioquímica à ecofisiologia). Parte dos resultados dos ensaios efectuados em colaboração, integrados em projectos de investigação mais amplos, foram já publicados.

Grande parte dos estudos dos efeitos da carência de água do solo nas trocas gasosas e no metabolismo fotossintético apresentados neste trabalho foram realizados em tremoço (*Lupinus albus* L.). Efectuaram-se também alguns estudos comparativos com outras espécies, videira (*Vitis vinifera*, cv. Rosaki) e eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) que contribuíram para o esclarecimento da importância relativa da componente estomática e não estomática na regulação da actividade fotossintética em condições de secura. Os estudos efectuados em folhas de tremoço de diferentes idades (diferentes fases de desenvolvimento) permitiram avaliar os efeitos do stress hídrico e da subsequente rehidratação no crescimento da parte aérea e no metabolismo fotossintético do carbono, em interacção com o do azoto.

Com o objectivo de identificar, ao nível da partição dos assimilados, alguns pontos de regulação do metabolismo do carbono em tecidos sujeitos a défices hídricos, realizaram-se dois conjuntos de experiências: i. com folhas, representativas dos tecidos *source*; ii. com culturas de células heterotróficas de *Chenopodium rubrum*,

que constituem um modelo simplificado para o estudo do metabolismo do carbono em tecidos *sink*.

2. EFEITOS DO STRESS HÍDRICO NO METABOLISMO FOTOSINTÉTICO. ESTADO ACTUAL DO CONHECIMENTO

As plantas superiores têm mecanismos fisiológicos de elevado grau de integração e de regulação. Daí que as respostas da planta inteira possam revestir-se de uma tão grande complexidade de interpretação que, como comenta Geiger (1987), nem sempre deixam perceber as subjacentes "regras de jogo", por mais simples que cada uma, *per se*, possa ser.

Na pesquisa dessas leis de funcionamento das plantas nas suas relações com os factores ambientais há que isolar a acção, e/ou parte do organismo, seguir apenas um tipo de resposta, ou acompanhar a sequência de alterações das várias respostas, tentando inferir relações causais entre elas (Munns, 1993). Estas abordagens experimentais colocam, no entanto, o investigador na situação difícil de extrapolar a informação obtida em partes do sistema, para a planta inteira no seu cenário natural. Contudo, o comportamento de todo o sistema não é a soma das funções-resposta de cada processo afectado nos diferentes órgãos e o padrão de resposta varia com a intensidade e a duração do stress. Por outro lado, ocorre frequentemente interacção (sinérgica ou antagonística) entre diferentes factores de stress, por exemplo, défices hídricos, elevadas irradiâncias, temperatura e deficiências nutritivas (Chaves, 1991).

2.1. EFEITOS AO NÍVEL DA FOLHA.

A taxa fotossintética diminui em condições de secura. É de supor que as possíveis limitações da fotossíntese devam estar associadas à actividade e/ou à estrutura dos sub-processos. Os mais importantes são: a difusão do CO₂; as reacções bioquímicas no estroma; o transporte electrónico e iónico ao nível dos tilacóides; as reacções fotoquímicas nas estruturas pigmentares; e ainda as relações cloroplasto-citosol (Berry e Dowton, 1982; Sharkey, 1985a).

Dados da bibliografia reunidos em diversas revisões têm considerado a redução da concentração intercelular do CO₂, imposta pelo fecho dos estomas, o principal factor determinante do decréscimo da taxa de assimilação do CO₂ em condições de défice hídrico (Hsiao, 1973; Hanson e Hitz, 1982; Chaves, 1991; Cornic *et. al.*, 1992), embora a inibição da fotossíntese em folhas intactas naquelas condições seja função quer do aumento da resistência estomática quer de alterações ao nível do mesófilo. Estas, no entanto, parecem revestir-se de maior importância relativa apenas em situações de défice hídrico muito severo (Kaiser, 1987a).

Tal como noutras vias metabólicas, a regulação da taxa fotossintética é compartilhada por vários componentes e a contribuição relativa de cada um deles depende das condições externas (Stitt, 1991). Considere-se então, por razões históricas e metodológicas, o conjunto das limitações à taxa fotossintética agrupadas em duas categorias: limitação estomática e limitação não estomática. A primeira está associada à difusão do CO₂ na fase gasosa, i.e., da atmosfera até aos espaços intercelulares. A segunda inclui não só a limitação à difusão do CO₂ na fase líquida, como também todos os processos foto- e bioquímicos envolvidos, que dependem da

disponibilidade de CO₂ e de luz, e da capacidade de utilização do CO₂, da luz e das trioses fosfato (TP).

2.1.1. LIMITAÇÃO ESTOMÁTICA

No *continuum* hídrico solo-plantas-atmosfera é na interface folha-atmosfera que ocorre normalmente uma maior diferença de potencial hídrico (Ψ). A resistência foliar é a resistência física mais importante ao fluxo de vapor de água e, para a maior parte das plantas, é uma propriedade das epidermes dominada sobretudo pelo número, dimensões e funcionamento dos estomas, se exceptuarmos os casos de copados muito fechados em que a resistência da camada limite é uma componente importante da resistência total (Jones, 1992).

Os estomas são pequenas aberturas nos órgãos aéreos das plantas superiores, entre células epidérmicas especiais diferenciadas das restantes - células guarda - cujos movimentos regulam o grau de abertura do poro. É através da abertura estomática que tanto o CO₂ como o vapor de água se difundem e, se se considerarem apenas as diferenças relativas nos seus gradientes de difusão, resulta inevitavelmente uma maior perda de água que absorção de CO₂ (Schulze *et al.*, 1987). Por outro lado, o coeficiente de difusão do vapor de água é superior ao do dióxido de carbono, de que resulta, para percursos idênticos, uma resistência à difusão do dióxido de carbono em fase gasosa cerca de 1.6 vezes superior à resistência à difusão da água. Os conhecimentos fundamentais acerca da fisiologia dos estomas são tratados, por exemplo, em Meidner e Mansfield (1968), em Schulze e Hall (1982), Zeiger *et al.* (1987) e em Mansfield *et al.* (1990).

Difusão do CO₂ na fase gasosa

Os estudos no âmbito das trocas gasosas que se podem encontrar na bibliografia das duas últimas décadas são extremamente influenciados pelo modelo de Cowan e Farquhar (1977), desenvolvido por Farquhar e Sharkey (1982). Estes modelos matemáticos tentam integrar o funcionamento estomático com o metabolismo e o ambiente ao nível da folha, e possibilitam o estudo do papel dos estomas na regulação das trocas gasosas. O CO₂ e o vapor de água difundem-se através dos estomas e o compromisso entre a manutenção de elevadas taxas de fixação de carbono e a restrição da perda de água por transpiração dependerá de vários factores ambientais, nomeadamente dos défices hídricos.

A variação da abertura estomática resulta em diferentes graus de limitação da difusão do CO₂ para o interior da folha. A pressão parcial de CO₂ intercelular - p_i - não pode ser medido directamente mas pode ser calculada a partir de medições simultâneas das trocas gasosas de CO₂ e de H₂O. De acordo com von Caemmerer e Farquhar (1981),

$$A = g_{t(ca)} (c_a - c_i) - c^* E \quad (1)$$

em que $g_{t(ca)}$ é a condutância total (estomática e camada limite) para a difusão do CO₂ (expressa em mol m⁻² s⁻¹) e é ~1.6 vezes a condutância total para a difusão do vapor de água [$g_{t(wa)}$]; esta última condutância é calculada a partir da taxa de transpiração

(E) e da diferença de concentração de vapor de água no ar e nos espaços intercelulares. A é a taxa de assimilação por unidade de área projectada (expressa em mol m⁻² s⁻¹); c_a e c_i são, respectivamente, a fracção molar do CO₂ no ar e no interior da folha. O factor (c* E) considera as interacções entre os fluxos de CO₂ e de vapor de água, em que c* é a fracção molar média do CO₂ (c* = c_a + c_i / 2) e E corresponde à taxa de transpiração por unidade de área foliar projectada (expressa em mol m⁻² s⁻¹).

Rearranjando a equação (1) e substituindo c*,

$$c_i = [(g_{t(ca)} - E/2) c_a] / [(g_{t(ca)} + E/2)] - A \quad (2)$$

A pressão parcial de CO₂ intercelular, p_i (expressa em Pa) obtem-se da equação (2) e (3),

$$p_i = c_i P \quad (3)$$

em que P é a pressão atmosférica (expressa em Pa).

Calculado o p_i, é possível avaliar a resposta da fotossíntese ao CO₂ independentemente da abertura estomática. Se colocarmos a hipótese de que os défices hídricos não alteram a componente não-estomática da fotossíntese, esperar-se-à um decréscimo na pressão parcial de CO₂ intercelular à medida que os estomas fecham.

A variação na taxa de assimilação aparente em condições de défice hídrico inclui as alterações, não só ao nível fotossintético, como também ao nível da fotorrespiração e da respiração mitocondrial à luz. O encerramento estomático exerce uma diferente limitação relativa nos fluxos de CO₂ e de O₂ porque são também diferentes os gradientes de difusão destes gases e a sensibilidade daqueles processos metabólicos a baixos p_i.O₂. À medida que o p_i.CO₂ decresce, inicialmente, a actividade relativa da função oxigenase da RuBisCO aumenta; posteriormente, com a redução paralela de p_i.O₂, a libertação de CO₂ fotorrespirado diminui também e vai contribuindo cada vez menos, relativamente ao CO₂ de origem mitocondrial, para o aumento do ponto de compensação (Dietz e Heber, 1983; Lawlor, 1983).

A importância da condutância estomática (g_s) na restrição da taxa fotossintética (A) em condições de stress hídrico parece óbvia em virtude da variação paralela daqueles dois parâmetros. Relações lineares, que passam pela origem, entre A e g_s, embora não impliquem necessariamente uma relação causal ou um acoplamento fisiológico entre os dois processos, significam que p_i é mantido constante. Nesse caso, a fotossíntese ao nível do cloroplasto variaria proporcionalmente com a limitação imposta pelos estomas (Schulze e Hall, 1982).

O modelo de Cowan e Farquhar (1977) propôs o que os autores designaram por funcionamento optimizante dos estomas, que se traduz na manutenção de uma limitação estomática relativa constante, mesmo quando variam os factores ambientais que directamente afectam a fotossíntese. Por outras palavras, para uma dada variação da condutância estomática os custos marginais em água transpirada igualam os ganhos marginais em carbono fixado. Os trabalhos de Wong *et al.* (1979; 1985) deram suporte experimental a este modelo. Alterando as taxas de assimilação do CO₂ através da manipulação de diversos factores (luz, água no solo, nutrição, aplicação de DCMU) aqueles autores mostraram que g_s variava na mesma proporção que A, de tal modo que p_i se mantinha constante. Concluíram que a abertura estomática dependia

da capacidade intrínseca do mesófilo em fixar o CO₂, e sugeriram que podia ser regulada por um metabolito da fotossíntese. No entanto quando os tratamentos fizeram variar apenas ou sobretudo a abertura estomática (aplicação de ácido abscísico, decréscimo na humidade relativa, ou imposição de stress hídrico rápido) resultou uma relação A/g_s não linear (p_i não se mantém constante), o que é consistente com a hipótese de que g_s responde independentemente de A (Throughton e Slayter, 1969; Schulze *et al.*, 1972; Dubbe *et al.*, 1978; Lawlor, 1978; Wong *et al.*, 1979). Nas experiências de aplicação de stress hídrico conduzidas por Wong *et al.* (1979), a manutenção de p_i constante está explicada pelo facto do défice hídrico ter sido induzido lentamente e, nestas condições, a fixação fotossintética do carbono é afectada não só pela redução na condutância estomática como também por reduções na actividade fotossintética ao nível do mesófilo.

Os dados na bibliografia acerca da contribuição relativa da componente estomática nas limitações da fotossíntese são controversos sobretudo por razões metodológicas. Farquhar e Sharkey (1982) apresentaram alguns exemplos de sobrevalorização dos efeitos estomáticos na fotossíntese em condições de stress hídrico em virtude da chamada "análise de resistências linear". Este tipo de análise considera a limitação dos estomas como a contribuição relativa da difusão do CO₂ na fase gasosa na resistência total à fixação do carbono, sem ter em consideração a não linearidade da resposta de A a p_i.

Sharkey (1985a) propôs um método de avaliação da limitação da difusão gasosa do CO₂ na fotossíntese, representada por uma medida relativa da limitação estomática que se obtém, conhecendo a curva de resposta de A a p_i, através da relação entre a taxa de assimilação real e aquela que ocorreria se fosse nula a resistência à difusão do CO₂ na fase gasosa. Este método ignora os efeitos da transpiração nas trocas gasosas ao nível do poro estomático e na capacidade fotossintética, além de criar uma situação artificial em que uma das resistências é completamente eliminada (Jones, 1973).

Jones (1985) fez uma revisão crítica dos métodos de avaliação das limitações estomática e não-estomática da fotossíntese, sugerindo a utilização do método diferencial de análise da sensibilidade da taxa de assimilação do CO₂ a pequenas alterações na resistência à difusão do CO₂ na fase gasosa. Baseada em "coeficientes de regulação de fluxos" (*) (Kacser e Burns, 1973), este tipo de análise tem sido utilizado não só para quantificar a limitação estomática mas também outras componentes limitantes da fotossíntese (Woodrow *et al.*, 1990; Neuhaus *et al.*, 1990; Stitt *et al.*, 1991; Quick *et al.*, 1991).

O decréscimo conjunto de A e de p_i pode ser um indicador de que os estomas são responsáveis pela redução da taxa de assimilação para as condições ensaiadas, mas não prova necessariamente que a limitação estomática se alterou, como por exemplo, se o tipo de curva de resposta de A ao p_i se modificar (Jones, 1985). O aumento ou a constância de valores estimados de p_i associados aos decréscimos de A em condições de défice hídrico foi interpretado por diversos autores como evidência de que a fotossíntese ao nível do cloroplasto também era afectada, e que a limitação estomática teria uma menor importância relativa nas reduções da taxa de assimilação

* O coeficiente (C) é uma medida que relaciona as alterações num fluxo J com pequeníssimas alterações numa variável independente P:

$$C_p = dJ/J / dP/P$$

(e.g. Mooney *et al.*, 1977; Matthews e Boyer, 1984; Huber *et al.*, 1984; Raschke e Resemann, 1986; Sen Gupta e Berkowitz, 1988). Mas Farquhar *et al.* (1987) fizeram notar que o valor estimado de p_i , calculado a partir de medições das trocas gasosas, só é real se a abertura estomática for uniforme ao longo da superfície foliar.

A heterogeneidade (ou não-uniformidade) da abertura estomática significa que parte dos estomas estão fechados e parte estão parcialmente abertos. O valor de p_i para as zonas com estomas encerrados não pode ser determinado pelas medições de trocas gasosas (ver equação 2). Aquele parâmetro sendo obtido a partir da condutância estomática e da taxa fotossintética médias por unidade de área, sobrevaloriza o p_i real no caso de heterogeneidade da abertura estomática.

Terashima (1992) fez uma revisão bastante exaustiva sobre a ocorrência de não-uniformidade fotossintética e estomática, detectada por diferentes métodos em diversas espécies e em folhas sujeitas a diferentes tratamentos: stress hídrico, stress salino, baixa humidade relativa, poluentes, aplicação de ABA. A anatomia foliar pode contribuir para acentuar a não uniformidade do ambiente gasoso nos espaços intercelulares, dificultando a difusão lateral do CO_2 , como no caso das folhas heterobáricas, das folhas de muitas monocotiledoneas com nervação paralela e com bainhas perivasculares, ou ainda em folhas com baixa frequência estomática. Contudo, nem todas as plantas, com folhas homo- ou heterobáricas, demonstram este tipo de resposta, ou o demonstram para diferentes intensidades ou regimes de indução dos défices hídricos (Scheuermann *et al.*, 1991; Gunasekera e Berkowitz, 1992; Ni e Pallardy, 1992).

A hipótese de zonas com estomas fechados poderem constituir áreas de dissipação de energia metabólica em excesso com grande economia hídrica foi colocada por Scheurman *et al.* (1991) face aos resultados da análise do *quenching* fotoquímico e não-fotoquímico nessas áreas foliares. A refixação do CO_2 fotorespirado ou outros tipos de reacções, como a via das pentoses-fosfato associada ao transporte de electrões pseudocíclico e à remoção do peróxido de hidrogénio, foram as vias sugeridas por aqueles autores para o consumo da energia em excesso (ATP e NADPH). Neste sentido a heterogeneidade estomática poderia constituir uma importante divisão espacial de tarefas fisiológicas, mas serão necessários novos estudos que permitam esclarecer melhor os mecanismos subjacentes aos fenómenos de heterogeneidade estomática e fotossintética, e sua relevância ecofisiológica.

Apesar da não universalidade do fenómeno da heterogeneidade estomática e fotossintética, é genericamente aceite que as relações A/p_i devam ser cautelosamente analisadas (Van Kraanningen, 1990; Cheeseman, 1991; Terashima, 1992). A sobrevalorização de p_i implica a interpretação de que a fotossíntese é inibida sobretudo por efeitos não-estomáticos, mas esta aparente inibição é revertida em condições de concentração de dióxido de carbono saturantes. Neste sentido, o trabalho de Robinson *et al.* (1988) mostrou ser possível a medição da capacidade fotossintética independentemente da limitação estomática, utilizando o eléctrodo de oxigénio a concentrações de dióxido de carbono extremamente elevadas (na ordem dos 5% - 15%, dependendo das condições e das espécies). Esta técnica apresenta-se como alternativa metodológica na discriminação dos efeitos estomáticos e não estomáticos na fotossíntese.

Após alguma clarificação de ordem metodológica no âmbito da avaliação das limitações da fotossíntese em condições de stress hídrico, alguns trabalhos recentes têm atribuído à componente estomática o papel mais importante no decréscimo da

actividade fotossintética de folhas intactas, quer em condições de secura do solo (Sharkey e Seemann, 1989; Frederick *et al.*, 1990; Epron e Dreyer, 1990; Ellsworth e Reich, 1990; Quick *et al.*, 1992; Pereira *et al.*, 1992) quer de secura do ar (Loreto e Sharkey, 1990; Dai *et al.*, 1992; Ellsworth e Reich, 1992). Outros trabalhos revelam, a este respeito, a diversidade de respostas entre espécies e variedades (Quick *et al.*, 1991; Ni e Pallardy, 1992; Tsuchiya *et al.*, 1992), ou salientam o envolvimento da componente não estomática (Vu *et al.*, 1987; Kaiser, 1987; Bunce, 1988; Quick *et al.*, 1989; Sundari e Raghavendra, 1990; Martin e Ruiz-Torres, 1992). Daí justificar-se neste trabalho o estudo das respostas fotossintéticas aos défices hídricos do solo efectuado em diferentes espécies.

2.1.2. LIMITAÇÃO NÃO-ESTOMÁTICA

A fotossíntese é um processo fisiológico complexo que utiliza a energia da radiação solar principalmente na redução do dióxido de carbono. Sabidos os mecanismos físicos e bioquímicos gerais da fotossíntese, pouca informação poderá ser obtida acerca dos mecanismos reguladores unicamente por simples medições de taxas fotossintéticas em condições naturais. É sobretudo quando um sistema metabólico é perturbado, conduzido a actividades extremas em resposta aos factores de que depende mais directamente (*e.g.*, em resposta a variações de luz ou à concentração do CO_2), que os mecanismos de regulação são levados a um estado de "desequilíbrio", em que um predomina sobre os restantes, o que permitirá reconhecer os diversos passos limitantes do processo (Leegood, 1984).

Uma das metodologias mais utilizadas no estudo das limitações da fotossíntese é a análise das curvas de resposta da fotossíntese à variação na concentração de CO_2 e à irradiância, associada ao modelo desenvolvido por Farquhar *et al.* (1980). Neste modelo está integrada informação do funcionamento dos diversos componentes bioquímicos da assimilação fotossintética do carbono, cujas previsões são compatíveis com resultados obtidos por medições de trocas gasosas.

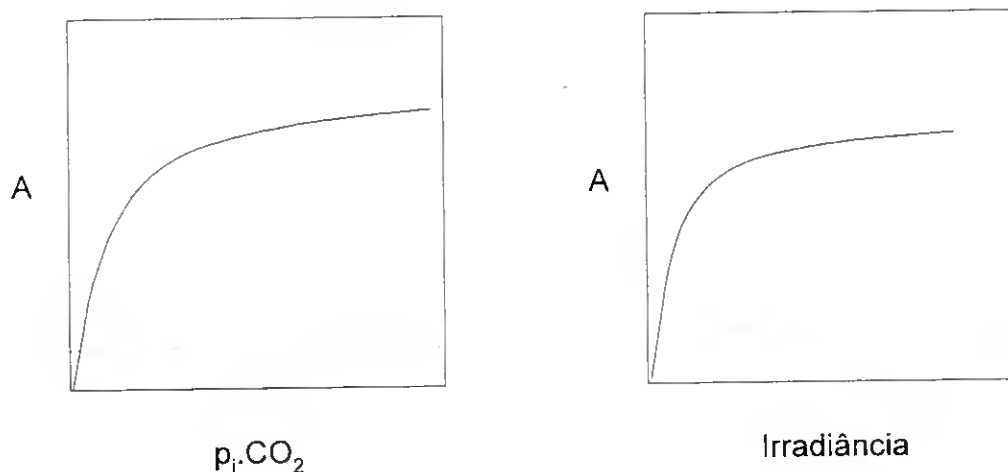


FIGURA 2.1 - Resposta fotossintética à irradiância e ao CO_2 . As curvas apresentadas são idealizadas; A representa a taxa fotossintética aparente e $p_i \cdot \text{CO}_2$ a pressão parcial intercelular de CO_2 .

Na curva A/p_i , por exemplo (FIG. 2.1), a fase inicial, em que A responde quase linearmente aos incrementos na pressão parcial de CO_2 , reflecte a limitação na carboxilação da ribulose 1,5-bisfosfato (RuBP). Esta depende sobretudo das características cinéticas da ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) mas também é afectada pela difusão do CO_2 na fase líquida. Quando A se torna independente de p_i a fotossíntese é limitada pela regeneração da RuBP no ciclo de

Calvin e, neste caso, depende da actividade das enzimas do ciclo e das reacções fotoquímicas ao nível do transporte de electrões e da fotofosforilação. Sobrepõe-se a estas limitações (regeneração vs. carboxilação da RuBP) a que advem da capacidade de utilização das trioses fosfato (TP). Esta depende da taxa de conversão dos intermediários fosforilados em produtos fotossintéticos finais não fosforilados (e.g. sacarose, amido) e vai afectar a disponibilidade de ortofosfato (Pi) no cloroplasto (Sharkey, 1985). Muitas plantas em condições naturais (vejam-se exemplos em Evans, 1989 e em Stitt, 1991) operam na zona de inflecção da curva de resposta da fotossíntese ao p_i e, tal como é proposto no modelo de Farquhar e von Caemmerer (1982), a regeneração e a carboxilação da RuBP co-limitam as taxas fotossintéticas.

As alterações na actividade fotossintética ao nível do mesófilo também podem ser avaliadas através da análise das curvas de resposta da fotossíntese à luz (FIG. 2.1). A taxa fotossintética responde quase linearmente à irradiância na fase inicial da curva de resposta cujo declive é uma medida da eficiência fotossintética da utilização da luz, designado rendimento quântico (Φ). O rendimento quântico expresso em função dos *quanta* absorvidos (Φa) é independente das características espectrais das folhas e é muito semelhante para todas as folhas saudáveis, expandidas e com a mesma via de assimilação de CO₂ (Björkman, 1981). A taxa fotossintética máxima em condições saturantes de luz (A_{max}) - correspondente à limitação pela carboxilação da RuBP - é também independente dos factores que determinam a eficiência de absorção da luz. A_{max} é potencialmente determinada pelos passos enzimáticos do metabolismo fotossintético do carbono, pelo transporte de electrões e fotofosforilação, e pela condutância da folha à difusão do CO₂.

Difusão do CO₂ na fase líquida

A difusão gasosa intercelular no interior da folha constitui apenas uma pequena proporção da quebra de p_i entre a cavidade subestomática e o estroma (von Caemmerer e Evans, 1991) embora, como foi referido, o ambiente gasoso intercelular possa ser heterogéneo em virtude das diferenças anatómicas das folhas (Terashima, 1992). Já o meio aquoso e lipídico do mesófilo constitui uma importante barreira física à difusão do CO₂ no interior da folha, porque o coeficiente de difusão deste gás na água é quatro ordens de grandeza inferior ao coeficiente de difusão no ar. Jones (1992) considera a condutância do mesófilo (g'_m) um termo complexo que inclui não só a componente de difusão do CO₂ na fase líquida, como uma componente bioquímica dominada pela enzima de carboxilação, e neste sentido constitui uma medida da eficiência de carboxilação. Outros autores consideram g'_m apenas no sentido mais restrito do fenómeno de difusão física (von Caemmerer e Evans, 1991; Harley *et al.*, 1992), e é neste sentido que este parâmetro é aqui utilizado.

Assumindo uma condutância finita para a difusão do CO₂ na fase líquida (g'_m), a pressão parcial de CO₂ no cloroplasto junto aos locais de carboxilação será inferior à pressão parcial no ar dos espaços intercelulares e, em condições não saturantes, poderá constituir uma limitação adicional da fotossíntese. No entanto, esta limitação potencial é mais ou menos reduzida pela elevada superfície das células do mesófilo relativamente à área foliar: cerca de 30m².m⁻², variando com as espécies e com as condições de crescimento (Björkman, 1981). Considerada em muitos casos desprezável (Farquhar *et al.*, 1980; Björkman, 1981; Seemann e Berry, 1982), uma importante limitação na difusão do CO₂ no mesófilo foi, contudo, sugerida face à

relação curvilínea encontrada em algumas espécies entre a actividade da RuBisCO e a fase inicial (a baixos p_i) da resposta A/p_i (Evans, 1983). Lloyd *et al.* (1992) também atribuíram à existência de uma substancial resistência à difusão do CO_2 na fase líquida as baixas taxas de assimilação exibidas por algumas espécies lenhosas, que não estavam limitadas nem pela actividade *in vitro* da RuBisCO, nem pela capacidade de transporte electrónico.

Von Caemmerer e Evans (1991) encontraram uma boa correlação entre a condutância do mesófilo e a taxa de assimilação a elevadas intensidades luminosas de várias espécies com diferentes teores em azoto. Mais recentemente, Loreto *et al.* (1992) determinaram g'_m em 15 espécies por três métodos de avaliação (Harley *et al.*, 1992). Para as diversas espécies mesófitas e esclerófitas analisadas a elevadas intensidades luminosas e não sujeitas a stress, os resultados revelaram uma boa correlação entre A e g'_m , e entre g'_m e g'_s ; destas correlações foi possível estimar que $g'_m = 1,4g'_s$. Os autores concluíram, que em algumas espécies que apresentam condutâncias muito baixas, a condutância na fase líquida pode constituir uma das mais importantes limitações da taxa fotossintética e que g'_m deverá ser incorporado nos modelos de simulação ou análise de fotossíntese.

Reacções fotoquímicas

Muitas plantas tolerantes à desidratação extrema retêm os pigmentos fotossintéticos quer durante a desidratação quer durante a rehidratação, embora a perda drástica de clorofila possa ser uma das alterações nos processos celulares associados à tolerância à secura de algumas Angiospérmicas poiquilohídricas (Bewley e Krochko, 1981). Os teores em clorofila total não se correlacionam com A_{max} em diversas espécies de sol e de sombra que cresceram sob diferentes regimes luminosos (Björkman, 1981); as características espectrais das folhas (teores em pigmentos, morfologia das epidermes foliares) poderão, sim, alterar a irradiância necessária para atingir a taxa fotossintética saturada pela luz.

As deficiências hídricas têm um efeito pouco significativo na integridade das membranas do cloroplasto (Fellows e Boyer, 1976; Vapaavuori *et al.*, 1984) e no teor em clorofilas (Bradford e Hsiao, 1981; Vapaavuori *et al.*, 1984; Stuhlfauth *et al.*, 1990; Frederick *et al.*, 1990; Gimenez *et al.*, 1992). No estudo conduzido por Stuhlfauth *et al.* (1990) sobre os efeitos do stress hídrico nos pigmentos fotossintéticos de *Digitalis lanata*, apesar de não terem sido observadas alterações nos teores de carotenóides totais, o β -caroteno aumentou relativamente às xantofilas. Os carotenóides são componentes essenciais dos complexos pigmentos-proteína dos fotossistemas, cujo papel protector das proteínas D1 e do LHCII contra a fotodestruição está bem demonstrado por Sandmann *et al.* (1993) em mutantes de *Anacistys* com diferentes quantidades de carotenóides, e em culturas de *Scenedesmus* na presença de um inibidor da biossíntese dos carotenóides. Também Stuhlfauth *et al.* (1990) discutiram as possíveis implicações daquele tipo de modificações metabólicas, nomeadamente, as vantagens adaptativas da protecção dos centros de reacção (com o aumento da síntese do β -caroteno relativamente à das xantofilas) em detrimento da máxima captação de energia radiante via xantofilas (Duckham *et al.*, 1991).

Um conjunto de trabalhos conduzidos por Kaiser (Kaiser, 1982; 1983b; 1987a; Kaiser *et al.*, 1981) evidenciaram o facto da capacidade fotossintética de discos foliares sujeitos a desidratação osmótica, ou de folhas destacadas em desidratação

evaporativa, se manter inalterada para valores de teor relativo em água de 80% - 60%. Por outro lado, tanto A_{\max} como Φ determinados em plantas em déficit hídrico decrescem só a partir de um limiar correspondente à perda de turgescência (Lawlor, 1993). O rendimento quântico determinado em condições saturantes de CO_2 (Φ_{\max}) é afectado apenas para défices hídricos severos, superiores a 30% (Cornic *et al.*, 1989). A ausência de alterações na taxa fotossintética máxima saturada pelo CO_2 , que reflecte a capacidade de regeneração da RuBP e depende da taxa de utilização da TP e das reacções fotoquímicas, faria supor que os efeitos directos, não-estomáticos, na capacidade fotossintética ocorrerão apenas para elevados défices hídricos. Kaiser (1987b) salientou numa pequena revisão da bibliografia que os resultados de alguns trabalhos dos anos 70-80 que relatavam danos induzidos pelos défices hídricos ao nível das reacções fotoquímicas, justificavam-se sobretudo por razões metodológicas, ou por interacção dos défices hídricos com outros factores ambientais, nomeadamente luz e temperatura.

Baseados em observações preliminares da interacção de elevadas densidade de fluxo fotónico com o stress hídrico (Björkman *et al.*, 1981), Björkman e Powles (1984) observaram que a inibição fotossintética (no rendimento quântico e na taxa saturada pela luz) de folhas de *Nerium oleander* com baixos potenciais hídricos foliares, em condições naturais de campo, está associada a este tipo de interacção. Concluíram que, nestas condições, os danos fotoinibitórios são uma componente importante das quebras na actividade fotossintética.

A eficiência fotoquímica do fotossistema II (PSII), determinada por parâmetros de fluorescência da clorofila, é muito resistente aos défices hídricos (Kaiser, 1987b; Cornic *et al.*, 1989; Epron *et al.*, 1992). Havaux (1992) observou alterações no Φ_{\max} apenas para $\text{RWC} < 40\%$ e $\Psi < -4.0\text{MPa}$. Mostrou ainda, neste estudo, os efeitos da interacção antagonista do stress hídrico com as temperaturas elevadas na susceptibilidade à fotoinibição em duas espécies de Solanáceas: para temperaturas superiores a 40°C a inibição do funcionamento do PSII das folhas em déficit hídrico é menor relativamente à observada nas folhas hidratadas. O autor sugere que o stress hídrico contribui para aumentar a tolerância do PSII ao stress das temperaturas elevadas associado a intensidades luminosas também elevadas, possivelmente, através da acumulação induzida pelo déficit hídrico de compostos protectores das membranas tilacoidais.

Na ausência deste tipo de interacções as reacções ao nível dos tilacóides são extremamente tolerantes ao stress hídrico e apenas são significativamente inibidas para défices hídricos muito severos (Berkowitz e Gibbs, 1982; Sharkey e Badger, 1982; Dietz e Heber, 1983; Stuhlfauth *et al.*, 1988; Epron e Dreyer, 1990; Quick *et al.*, 1992; Epron *et al.*, 1992; Martin e Ruiz-Torres, 1992; Havaux, 1992).

O gradiente protónico transtilacoidal (ΔpH) é uma medida do estado de energização das folhas que reflecte a razão ATP/ADP (Kobayashi *et al.*, 1982). Dietz e Heber (1983) determinaram o ΔpH de folhas intactas ou de folhas desprovidas de epidermes. Verificaram que aquele parâmetro se mantém elevado e inalterado para teores relativos em água de 80% - 20%. As elevadas razões ATP/ADP, apesar da assimilação do CO_2 ter sido sensível ao déficit hídrico mesmo em folhas desprovidas de epiderme, reflectiram o decréscimo no consumo de ATP.

Se nem o transporte electrónico, nem a separação de cargas no espaço intratilacoidal são significativamente afectados pelo stress hídrico, não obstante a redução na taxa de assimilação de CO_2 , o excesso de energia absorvida e

fotoconvertida em ATP e NADPH deverá ser consumido em vias metabólicas alternativas, de forma a evitar os danos causados por excesso de poder redutor propiciador da fotoinibição e da fotoredução do oxigénio molecular. Como já referi, a análise dos parâmetros de fluorescência da clorofila, nomeadamente os *quenching* fotoquímico e não-fotoquímico, permite revelar alterações no funcionamento dos fotossistemas e do transporte electrónico, fornecendo indicações se a dissipação do excesso de energia se efectua devido a alterações ao nível das reacções luminosas envolvendo, por exemplo, mecanismos de relaxação térmica do PSII (Demming e Björkman, 1987), rearranjos na composição dos pigmentos acessórios dos complexos captadores de luz dos fotossistemas (Stuhlfauth *et al.*, 1990) e/ou por modificações metabólicas envolvendo, por exemplo, o aumento da fotorrespiração (Dietz e Heber, 1983). A importância relativa do uso dos diversos mecanismos dissipadores de energia em condições de stress hídrico parece variar entre espécies e entre plantas C₃ e C₄ (Scheurman *et al.*, 1991).

Não estão bem esclarecidos os efeitos dos défices hídricos na fotofosforilação porque o gradiente protónico transtilacoidal não constitui evidência experimental da eficiência de produção de ATP (Scheurman *et al.*, 1991; Lawlor, 1993). Dados recentes sugerem que a síntese de ATP possa ser inibida em resultado de processos, induzidos pelos défices hídricos, de desactivação enzimática do complexo ATP'ase (Ortiz-Lopez *et al.*, 1991; Meyer e Kouchkovsky, 1992). Estes dados são concordantes com a hipótese de Kaiser (1983a; 1987a;) e de Kaiser e Heber (1981) de que os locais de inibição do metabolismo fotossintético do carbono mediados pela desidratação são reacções enzimáticas na fase aquosa, ou na interface aquosa das membranas, no cloroplasto e no citosol. À medida que os tecidos perdem água, o volume dos protoplastos diminui e aumenta passivamente a concentração de solutos, alguns dos quais poderão ser críticos nos processos de activação/desactivação das enzimas, ou ainda devido à cristalização das proteínas enzimáticas quando a concentração destas excede o poder de solubilização do meio.

Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase

Ao nível bioquímico a fotossíntese é dominada pelo ciclo de redução do carbono, que pode ser considerado dividido em três grandes passos: a fixação do dióxido de carbono numa molécula orgânica, o 3-fosfoglicerato; a redução do 3-fosfoglicerato; utilização desta forma mais reduzida de carbono na regeneração do aceitador de dióxido de carbono ou nas vias biossintéticas. Nesta revisão não são focadas todas as características de regulação deste ciclo face aos défices hídricos, mas apenas aquelas que mais directamente se relacionaram com o trabalho experimental.

A RuBisCO (EC 4.1.1.39) é a enzima responsável em todos os organismos fotossintéticos pela fixação do CO₂ que será posteriormente reduzido a açúcares e é a proteína mais abundante na natureza. De facto ela constitui 25%-60% da proteína solúvel foliar, e a sua actividade catalítica correlaciona-se com a concentração nos extractos foliares (Ku *et al.*, 1979; Quick *et al.*, 1991). É uma enzima bifuncional: como carboxilase ela actua no ciclo fotossintético de redução do carbono, catalizando a adição do CO₂ à RuBP formando-se 3-fosfoglicerato; como oxigenase adiciona O₂ à RuBP originando-se 2-fosfoglicolato e 3-fosfoglicerato no ciclo fotorrespiratório de oxidação do carbono (Lorimer *et al.*, 1977).

As características moleculares, as propriedades catalíticas e os mecanismos de actividade da RuBisCO, assim como os mecanismos de regulação desta enzima no quadro geral da regulação dos processos bioquímicos da fotossíntese, foram descritos em diversas revisões bibliográficas (Jensen e Bahr, 1977; Lorimer, 1981; Woodrow e Berry, 1988; Salvucci, 1989; Seemann *et al.*, 1990; Gutteridge, 1990; Portis, 1992).

A RuBisCO só é cataliticamente activa com a formação de um carbamato em que o CO₂ é adicionado ao grupo amina de um resíduo de lisina, seguido da adição de um ião metálico divalente (Mg²⁺ ou Mn²⁺); a molécula de CO₂ envolvida na carbamilação é distinta das que são subsequentemente fixadas (CO₂-substrato) durante a carboxilação, e vão ocupar diferentes locais da enzima (Lorimer, 1981). Mas a actividade desta enzima não é simplesmente regulada por alterações nas concentrações dos substratos ou dos produtos. Está sujeita a um complexo mecanismo de regulação e de modulação em resposta às condições ambientais, principalmente à luz, estando posta de lado a ideia inicial de que a activação da RuBisCO era apenas mediada por alterações de pH e de Mg²⁺ no estroma mediadas pela luz (Portis, 1992).

A carbamilação constitui o mecanismo primário de activação da RuBisCO ocorrendo lentamente de uma forma espontânea, ou cataliticamente pela acção da RuBisCO activase na presença de RuBP e de ATP (Sommerville *et al.*, 1982; Salvucci, *et al.* 1986). Algumas espécies sintetizam um inibidor da actividade da RuBisCO, o 2-carboxyarabinitol 1-fosfato (CA1P) que bloqueia a ligação da enzima carbamilação à RuBP. O CA1P não afecta portanto o estado de carbamilação mas a capacidade catalítica, o que significa que a percentagem de activação não se altera, mas a actividade total diminui (Seemann *et al.*, 1990).

À RuBisCO ligam-se ainda outros compostos fosforilados (PGA e NADPH) que interagem com os locais activos, inviabilizando temporariamente a ligação com a RuBP. A RuBisCO pode funcionar como tampão metabólico capaz de sequestrar metabolitos (Salvucci, 1989) e ter um papel importante em determinadas condições (*e.g.* nas transições luz-escuro ou em condições de baixas irradiância) impedindo a saída desses metabolitos para fora do cloroplasto (Walker *et al.*, 1986).

O uso conjunto de diferentes métodos de avaliação da actividade fotossintética (como a medição das trocas gasosas, da capacidade fotossintética e da fluorescência da clorofila) e a análise de parâmetros bioquímicos (teores em determinados metabolitos e medição da actividade enzimática), tem permitido identificar os locais reguladores da actividade fotossintética mais susceptíveis aos défices hídricos. Por exemplo, a limitação pela baixa utilização das TP está tipicamente associada à insensibilidade da fotossíntese ao p_iO₂ (Sharkey, 1985b; Sharkey *et al.*, 1986b) acompanhada de teores elevados de PGA, de baixas razões ATP/ADP e da desactivação parcial da RuBisCO (Sharkey e Seeman, 1989; Stitt e Quick, 1989). Por outro lado, a limitação pela RuBisCO é acompanhada por um elevado estado de activação desta enzima, por excesso de RuBP, por baixos teores de PGA e por elevadas razões ATP/ADP (Sage *et al.*, 1990; Quick *et al.*, 1991).

Em condições de stress hídrico, paralelamente ao decréscimo na taxa fotossintética, a razão PGA/RuBP diminui (Loske e Raschke, 1988; Sharkey e Seemann, 1989) ou mantem-se constante (Quick *et al.*, 1989), o que conduz a interpretações contraditórias quanto ao grau de limitação imposta pela RuBisCO. A abordagem experimental a que me referi no parágrafo anterior embora permita a identificação das principais limitações da fotossíntese, não possibilita uma avaliação concreta da distribuição da regulação por vários componentes nas situações em que

ela possa ser compartilhada por diferentes factores. Nestes casos, os coeficientes de controle de fluxos constituem um utensílio de análise quantitativa extremamente útil, com vantagens adicionais se as medições forem efectuadas em plantas geneticamente manipuladas (mutantes ou transformadas), porque relacionam fluxos com diferentes quantidades de determinados produtos génicos envolvidos, e.g. enzimas (Stitt, 1991). Stitt *et al.* (1991) determinaram os coeficientes de controle de fluxo para a fotossíntese numa série de plantas com diferentes teores de RuBisCO obtidas por transformação com o RNAm *antisense* do gene nuclear para a pequena sub-unidade da RuBisCO - *rbcS* (Quick *et al.*, 1991). Na ausência de défice hídrico, o coeficiente de controle dos estomas para a fotossíntese foi sempre inferior ao da RuBisCO para as mesmas condições de luz, CO₂ e humidade relativa. Em relação à humidade, contudo, aqueles coeficientes variaram em direcções opostas, ou seja, em condições de maior secura do ar o controle exercido pela RuBisCO diminuiu cerca de 45%, enquanto que duplicou o dos estomas. Não há ainda dados disponíveis sobre a aplicação deste tipo de análise em plantas com carências hídricas.

As características da RuBisCO que poderão afectar a taxa fotossintética são as que dizem respeito à quantidade, parâmetros cinéticos, estado de activação e regulação da catálise. De que modo as carências hídricas irão afectar estas características?

A quantidade de RuBisCO, ou ainda a proporção em relação à proteína solúvel total, não parece ser significativamente alterada pelos défices hídricos moderados (Bradford e Hsiao, 1982; Vapaavuori, 1986; Gimenez *et al.*, 1992; Parry *et al.*, 1993). Este tipo de alterações foram, pelo contrário, observadas em condições de stress severo e prolongado, que possivelmente acelerarão os mecanismos de senescência foliar e subsequente mobilização do azoto foliar (Wittenbach, 1979). As folhas depois de completarem a expansão apresentam teores de azoto cada vez mais baixos, correspondentes sobretudo à degradação da RuBisCO (Dickman *et al.*, 1975; Peoples *et al.*, 1983), que representa uma fonte importante de azoto mobilizável, e em excesso em relação à taxa fotossintética (Quick *et al.*, 1991).

Alguns autores relataram reduções significativas na actividade da RuBisCO em condições de stress hídrico severo (Mayoral *et al.*, 1981; Vapaavuori, 1986; Vu *et al.*, 1987; Sharkey e Seemann, 1989). Apesar de existir uma considerável variação interespecífica no valor de Km(CO₂) (Yeoh *et al.*, 1980a; 1980b), não há indicações de que os défices hídricos afectem este parâmetro (Vu *et al.*, 1987). Os défices hídricos parecem impor sobretudo alterações no estado de activação da enzima, i.e. a razão entre a actividade inicial (determinada imediatamente após a extracção) e a actividade total (determinada após activação). Noutros trabalhos a actividade inicial e o estado de activação ou não se modificaram (Fredeen *et al.*, 1991), ou as pequenas alterações observadas não justificavam as reduções na actividade fotossintética em condições de défice hídrico (Gimenez *et al.*, 1992).

No estudo dedicado à actividade diurna da RuBisCO de tabaco realizado por Parry *et al.* (1993) em genótipos seleccionados pelas taxas fotorrespiratórias reduzidas (mas sem diferenças significativas quanto à actividade inicial e quantidade de RuBisCO), a actividade total estava reduzida em folhas a níveis saturantes de irradiância, de plantas regadas e não-regadas, mesmo quando, ao longo do dia, a taxa fotossintética era máxima. Mas as plantas sujeitas a stress hídrico apresentaram menor percentagem de activação que as plantas regadas e uma actividade catalítica, k_{cat} (em função dos locais activos) superior. Os autores concluíram que para o tabaco,

independentemente do estado hídrico, a RuBisCO é principalmente regulada por inibidores do tipo CA1P, mas os resultados sugeriam que a regulação desta enzima quer por inibidores quer por carbamilação possa responder a alterações no estado hídrico dos tecidos.

Sage (1990) apresentou um modelo de regulação da RuBisCO em resposta à luz, e ao CO₂, baseado na permissão de que a bioquímica fotossintética, em *steady state*, reflecte o equilíbrio entre o consumo e a regeneração da RuBP, e neste caso o estado de activação daquela enzima depende do p_i e da irradiância. Segundo o modelo, diminuindo a irradiância reduz-se o p_i para o qual a RuBisCO está completamente activada, enquanto que reduzindo o p_i diminui a irradiância necessária à total activação da enzima. No entanto, o modelo não permite revelar relações fundamentais nos próprios processos de regulação da RuBisCO que estão subjacentes às respostas observadas. Dados experimentais do mesmo grupo de investigadores (Sage *et al.*, 1990) estão de acordo com as previsões do modelo para espécies cuja RuBisCO é essencialmente regulada por carbamilação. A desactivação da RuBisCO observada para p_i inferiores a 100μbar (próximos do ponto de compensação) reflectiria uma limitação imposta pelo CO₂ na carbamilação pela RuBisCO-activase. Os autores sugeriram que este tipo de desactivação poderá ocorrer em situações de stress hídrico. Para outras espécies em que a RuBisCO é regulada quer por carbamilação quer pelo CA1P, os mecanismos de regulação são independentes do p_i.

A RuBisCO, pelo papel que desempenha no metabolismo fotossintético, constitui um local importante da regulação da fotossíntese face às condições ambientais, cujos processos de activação e desactivação permitiriam equilibrar o potencial de assimilação do carbono com a capacidade de regeneração da RuBP e de produção de ATP, e coordenar as taxas de síntese de amido e de sacarose com a produção de TP (Sharkey, 1985). A possibilidade da RuBisCO ser regulada por mecanismos de *feedback* via ATP/ADP ou concentração de ortofosfato permitiria explicar quer a redução na actividade desta enzima em situações de limitação no uso das TP, quer a variação paralela da activação da RuBisCO e da intensidade luminosa, atendendo à dependência da actividade da RuBisCO-activase da hidrólise de ATP (Wang e Portis, 1992) e da dependência da enzima CA1P-fosfatase (responsável pela degradação do CA1P) do NADPH e do DTT (Portis, 1992).

A escassez de dados experimentais não permite, por agora, compreender claramente se as alterações na actividade da RuBisCO em condições de stress hídrico se devem a modificações que envolvem a carbamilação e a RuBisCO-activase, ou em resultado da acção de inibidores (CA1P ou outros), e qual a importância relativa destes mecanismos.

Relações cloroplasto-citosol

O carbono fixado e reduzido durante a fotossíntese é exportado para o citosol sob a forma de trioses-fosfato (TP). Os cloroplastos são plastídeos com um duplo invólucro membranar pouco permeável (permeabilidade não específica até massas moleculares 10 KDa). Um dímero proteico situado na membrana interna - vulgarmente designado por translocador de fosfato - cataliza a troca passiva dos substratos, principalmente TP e Pi; por cada molécula transferida para o citosol uma outra é transportada para o interior do cloroplasto (Flügge e Heldt, 1991). No citosol, as TP estão envolvidas na biossíntese da sacarose, disponibilizando de novo o Pi, e no

cloroplasto são convertidas em amido, permitindo a reciclagem de Pi no estroma. Várias revisões bibliográficas apresentam e discutem os resultados da investigação recente sobre a biossíntese da sacarose e do amido, sua compartimentação e regulação (Preiss, 1982; Stitt *et al.*, 1987; Stitt e Quick, 1989; Beck e Ziegler, 1989; Hawker *et al.*, 1991; Huber e Huber, 1992).

Elevadas taxas fotossintéticas não dependem da capacidade de troca do translocador e, ao nível da folha, a taxa e direcção do fluxo das TP e de Pi resultam das concentrações relativas daqueles substratos nos dois compartimentos celulares, citosol e estroma (Gerhardt *et al.*, 1987). As reacções fotossintéticas no cloroplasto resultarão do compromisso entre concentrações suficientemente elevadas de Pi que permitam a síntese de ATP, mas relativamente baixas de modo a impedir a saída exagerada de metabolitos fosforilados que limitariam a regeneração da RuBP. Assim, se por um lado a taxa fotossintética influencia a taxa de síntese dos seus produtos finais, por outro lado, e atendendo à complexidade de regulação das vias bioquímicas da síntese de sacarose e de amido, a actividade do cloroplasto está também dependente das reacções que ocorrem no citosol (Stitt *et al.*, 1987).

A repartição dos fotoassimilados entre a sacarose e o amido parece ser regulada genética e bioquimicamente. Muitas espécies, como o espinafre e diversas monocotiledóneas, sintetizam e acumulam nas folhas, ao longo do dia, quantidades substanciais de sacarose, enquanto outras, como o tabaco e o feijoeiro, acumulam sobretudo amido (Huber e Huber, 1992). Ao nível bioquímico a regulação é exercida principalmente pelo citosol (Sharkey *et al.*, 1988; Neuhaus *et al.*, 1989; Vasey *et al.*, 1991) e mediada por metabolitos e enzimas chave (Gerhardt *et al.*, 1987; Neuhaus *et al.*, 1989; Huber e Huber, 1992). Daí que o esclarecimento das questões relacionadas com a limitação da fotossíntese pelo uso das TP seja sobretudo dirigida para o estudo dos mecanismos bioquímicos que regulam a síntese da sacarose e que alteram o fluxo de carbono entre o cloroplasto e o citosol.

Têm sido observados aumentos induzidos pelo stress hídrico na concentração de açúcares não estruturais determinados em extractos foliares de diversas espécies, por exemplo, no girassol (Fredeen *et al.*, 1991), no algodoeiro (Ackerson e Hebert, 1981), no espinafre (Zrenner e Stitt, 1991) no trigo (Drossopoulos *et al.*, 1987), na videira (Rodrigues *et al.*, 1993), no arroz (Tsuchiya *et al.*, 1992). As carências hídricas, impondo limitações na expansão e no crescimento dos tecidos (Bradford e Hsiao, 1982), deverão impor simultaneamente, através de alterações metabólicas coordenadas, novos limites de actividade "potencial" quer nos tecidos *source*, quer nos tecidos *sink*. Deste modo, será o stress hídrico capaz de exercer alguma influência ao nível da regulação da síntese dos produtos finais da fotossíntese? E quais as consequências dessas alterações metabólicas para a taxa fotossintética?

O stress hídrico parece afectar não só a partição dos assimilados recentes, privilegiando a síntese de sacarose em detrimento da de amido (Quick *et al.*, 1988; Bensari *et al.*, 1990; Zrenner e Stitt, 1991), mas também a hidrólise dos açúcares de elevada massa molecular em mono- e dissacáridos (Stewart, 1971; Virgona e Barlow, 1991). A acumulação de açúcares solúveis, bem como de alguns amino-ácidos (Bradford e Hsiao, 1982), pode ter um papel fisiológico importante em condições de *secura*: solutos citosólicos compatíveis contribuem para a regulação osmótica celular, permitindo a manutenção da turgescência para baixos potenciais hídricos (Morgan, 1984).

Alguns autores associaram a inibição da taxa fotossintética, observada em determinadas circunstâncias limitantes da actividade dos tecidos *sink*, à acumulação de hidratos de carbono na folha (Neales e Incoll, 1968; Azcón-Bieto, 1983). O processo pelo qual elevados teores de açúcares poderão inibir a fotossíntese não está contudo esclarecido. Nem sempre se encontram correlações negativas entre estes parâmetros, e o envolvimento de uma limitação imposta directamente pelos produtos finais ou por metabolitos fotossintéticos tem sido muito discutida por diversos autores (Herold, 1980; Geiger, 1987; Plaut *et al.*, 1987; Foyer, 1987) ou mesmo questionada (Stitt, 1991; Krapp *et al.*, 1991).

A sacarose é sintetizada no citosol a partir das TP exportadas pelo cloroplasto por um processo consumidor de energia sob a forma de uridina trifosfato (UTP): por cada 4 moléculas de TP convertidas em sacarose disponibilizam-se 4 Pi que poderão ser importados pelo cloroplasto. Como referi, as concentrações destes metabolitos deverão condicionar as reacções num e noutro compartimento celular.

A frutose bifosfatase (FBPase) citosólica cataliza a primeira reacção irreversível da biossíntese da sacarose e constitui, potencialmente, o primeiro local de regulação (Stitt *et al.*, 1983). A actividade desta enzima é afectada por vários metabolitos (Stitt e Heldt, 1985; Stitt *et al.*, 1985b) e de entre eles a frutose 2,6-bifosfato (F26BP) é o inibidor mais potente (Herzog *et al.*, 1984). A F26BP parece ter um papel regulador e sinalizador em todos os eucariotas (Stitt, 1990a); a concentração deste metabolito depende da actividade enzimática responsável pela sua síntese e degradação - frutose 6-fosfato,2-cinase (F6P2-cinase) e frutose 2,6-bifosfatase (F2,6BPase) - e cuja actividade relativa *in vivo* responde à concentração de Fru6P, de Pi (activadores da síntese), de PGA, de TP e de PPi (inibidores da síntese).

As já referidas variações interespecíficas de acumulação de amido ou de sacarose na folha são atribuídas quer à presença de elevada actividade da invertase no vacúolo (Huber, 1989), quer às diferenças na activação *in situ* da sacarose fosfato sintase (Huber e Huber, 1992). A utilização de tomateiros geneticamente transformados relativamente à expressão da sacarose fosfato sintase (SPS) permitiu confirmar a importância desta enzima na regulação da repartição dos fotoassimilados (Worrel *et al.*, 1992). Esta enzima está sujeita a dois mecanismos distintos de regulação: alostérica, sendo a glucose fosfato (GlcP) activador e o Pi inibidor (Dohelert e Huber, 1983); e por fosforilação/desfosforilação mediada pela luz (Weiner *et al.*, 1992). Espécies em que ocorre activação pela luz da SPS por desfosforilação proteica podem subdividir-se em duas categorias: grupo SPSI, o caso de algumas monocotiledóneas, em que os mecanismos de fosforilação/desfosforilação afectam quer a sensibilidade aos efectores, quer V_{max} ; grupo SPSII, em que a desfosforilação não afecta V_{max} mas apenas a sensibilidade aos substratos e efectores. Estas espécies tendem a acumular sacarose em contraste com as que acumulam amido (grupo III) e cuja SPS não parece ser activada pela luz (Huber *et al.*, 1990).

Stitt *et al.* (1987) sugeriram um modelo de funcionamento metabólico na regulação da síntese da sacarose envolvendo cooperativamente as actividades da FBPase e da SPS: mecanismo de *feedforward*, em resposta ao aumento da taxa fotossintética; mecanismo de *feedback* em resposta a alterações nas relações *source-sink*, designadamente à acumulação de sacarose; de *feedback*, ainda, em resposta a modificações covalentes da SPS. Um estudo de coeficientes de contróle de fluxos (Neuhaus *et al.*, 1990) indicou que estes mecanismos operam de tal forma que, a taxas fotossintéticas baixas ou moderadas a regulação do fluxo é repartida pelas duas

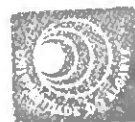
enzimas, mas para taxas elevadas a síntese da sacarose responde essencialmente aos níveis de metabolitos; nestas condições a concentração de TP parece ser o factor de regulação dominante na síntese da sacarose.

Os diferentes processos de regulação que ocorrem parecem depender quer das espécies, quer das condições ambientais. Por exemplo, no espinafre, que pertence ao grupo SPSII, a interacção de mecanismos de regulação *feedforward-feedback* e a grande sensibilidade da síntese de sacarose aos níveis de metabolitos permitem alterar a direcção do fluxo de carbono evitando efeitos inibitórios na taxa fotossintética (Neuhaus *et al.*, 1990); enquanto que espécies do grupo SPSI, como o trigo, a taxa fotossintética é inibida pela acumulação de sacarose (Azcon-Bieto, 1983). A taxa fotossintética das espécies com elevada actividade de invertase tanto ao nível da parede celular (Foyer, 1987; 1988), como ao nível do vacúolo (Goldschmidt e Huber, 1992), também é mais sensível em condições de limitação pela *sink*.

Goldschmidt e Huber (1992) analisaram os efeitos do bloqueamento floémico sobre a actividade fotossintética de folhas de diversas espécies acumuladoras de sacarose ou de amido. Concluíram que os decréscimos na capacidade fotossintética resultante da acumulação dos assimilados varia muito entre espécies, sendo as acumuladoras de amido as mais susceptíveis. Contudo, o amido *per se* não é responsável pela inibição da fotossíntese que também foi observada no mutante não-acumulador de amido de *Nicotiana sylvestris*.

A acumulação ou o fornecimento de hexoses (Stitt *et al.*, 1990; Krapp *et al.*, 1991; Schäfer *et al.*, 1992), paralelamente com a indicação de que a sacarose e a glucose poderão condicionar a transcrição de alguns genes (Sheen, 1990), sugerem a possibilidade de alguns hidratos de carbono regularem as enzimas do ciclo de Calvin, nomeadamente através de efeitos ao nível da expressão genética. Em espinafre, o aumento na razão sacarose/amido em condições de stress hídrico foi acompanhado pelo aumento da actividade da SPS e de alterações no estado de activação (Quick *et al.*, 1989; Zrenner e Stitt, 1991). No feijoeiro, Vassey e Sharkey (1989) observaram o decréscimo na actividade daquela enzima em extractos foliares brutos, mas utilizando um método que não permite a determinação selectiva das duas formas cinéticas. A inibição da actividade da SPS era, contudo, revertida por tratamento com elevada concentração de CO₂ e sem alívio dos défices hídricos (Vassey *et al.*, 1991). A SPS parece responder às reduções da taxa fotossintética em condições de stress hídrico não por um efeito directo dos défices hídricos, mas mediado pelos baixos pi.CO₂, um tipo de resposta semelhante à observada por Kaiser e Förster (1989) em relação à nitrato reductase. Ambas as enzimas estão sujeitas a uma regulação pela luz por fosforilação/desfosforilação. Embora os sistemas sejam distintos (Huber *et al.*, 1992b), são ambos modulados pela concentração de CO₂ (Kaiser e Brendle-Behnish, 1991; Vassey *et al.*, 1991) e parecem envolver alterações ao nível da transcrição e/ou da síntese proteica (Huber *et al.*, 1992a).

Há também indicações de que o stress hídrico, por efeitos mediados pela turgescência, poderá induzir alterações na expressão genética (Guerrero *et al.*, 1990; Ho e Mishkind, 1991; Reviron *et al.*, 1992; Guy *et al.*, 1992) e algumas dessas alterações estão associadas à acumulação de ABA nos tecidos sujeitos a défices hídricos (Skriver e Mundy, 1990; Bray, 1990; King *et al.*, 1992). Cheick e Brenner (1992) apresentaram uma hipótese de regulação da repartição dos fotoassimilados que envolve o ABA e as giberelinas, baseados nas alterações da actividade da FBPase e da SPS em resposta a estes reguladores de crescimento e ao stress hídrico: um primeiro



nível de regulação pela FBP correlacionada com os processos da fase inicial do metabolismo do carbono e em resposta aos níveis endógenos de ABA e/ou F26BP; um segundo nível de regulação envolvendo a SPS e a fase final do metabolismo do carbono, nomeadamente em resposta aos níveis de sacarose, GlcP, Pi e giberelinas. O modo de acção daqueles reguladores de crescimento, a este respeito, não está esclarecido, no entanto as giberelinas poderão constituir um dos sinais de regulação das alterações observadas na SPS via modificações na síntese daquela proteína (Cheik *et al.*, 1992).

A inibição ou redução da maquinaria fotossintética em resposta à acumulação ou o fornecimento de hexoses dão suporte à hipótese de uma regulação a longo-prazo pela actividade *sink*, de que a descarbamilização da RuBisCO (Sharkey *et al.*, 1986a; Sage *et al.*, 1988) e a redução do transporte electrónico associado ao aumento do *quenching* não-fotoquímico (Pammenter *et al.*, 1993) são outros exemplos, e que é considerada por Stitt (1991) como um tipo de resposta com significado "adaptativo".

2.2. EFEITOS AO NÍVEL DA PLANTA INTEIRA

Não surpreende que abordagens teóricas e experimentais ao aumento da produtividade tivessem inicialmente convergido para o estudo da assimilação fotossintética do CO₂, como mecanismo básico responsável pela produção da biomassa vegetal (Zelitch, 1975; Björkman, 1975; Mooney *et al.*, 1975). No entanto, a produção vegetal não está só condicionada pelo metabolismo fotossintético ao nível da folha, mas também pela quantidade de luz interceptada e pelas relações *source-sink*, incluindo a partição dos assimilados ao nível da planta inteira (Wareing, 1979; Wardlaw, 1980). Por outro lado, torna-se necessário integrar os conhecimentos obtidos a diferentes níveis: dos componentes do sistema, através da caracterização dos mecanismos bioquímicos e moleculares de funcionamento e de regulação (em interação com os factores externos); e da planta, no seu todo, através da caracterização e identificação das respostas "programadas", adaptativas, que resultam numa melhor integração a um determinado conjunto de variáveis ambientais (Wareing, 1979; Geiger, 1987). Por exemplo, a inibição da capacidade fotossintética dos tecidos foliares sujeitos a condições indutoras de défices hídricos correlaciona-se com a redução do volume osmótico dos protoplastos (Kaiser, 1982) ou dos cloroplastos (Kaiser, 1983a; Sen Gupta e Berkowitz, 1988) de diversas espécies, independentemente do grau de tolerância que elas exibem em condições naturais.

2.2.1. CRESCIMENTO E PARTIÇÃO DA BIOMASSA

Durante o crescimento vegetativo, a acumulação de biomassa é uma função linear da quantidade de radiação interceptada, e esta depende, essencialmente, do desenvolvimento da área foliar e da disposição das folhas no copado (Jones, 1992). Reduções na área fotossintetizante poderão significar decréscimos importantes na produtividade, mas a regulação da partição da biomassa entre tecidos fotossintéticos e não-fotossintéticos, assim como a longevidade das folhas, poderá conferir vantagens adaptativas em termos de eficiência do uso dos recursos disponíveis (Montenegro *et al.*, 1980; Field, 1981; Gulmon e Chu, 1981; Schulze, 1982). O principal efeito dos défices hídricos é reduzir a área foliar através do decréscimo da expansão das folhas (Dale, 1988), do acelerar da senescência das folhas mais velhas (Field, 1981) e, em algumas espécies, da redução da produção de novas folhas (Metcalf *et al.*, 1989). Estas respostas, consideradas ao nível da fisiologia da planta inteira, aumentam a capacidade de sobrevivência e de aclimação à secura à custa da perda de área transpirante, e mantêm o potencial produtivo da planta após rehidratação em resultado da mobilização acrópeta de azoto. A redução do crescimento induzida pelas carências hídricas devido a limitações na expansão celular é, desde há muito, reconhecida (Hsiao, 1973). As primeiras evidências deste tipo de resposta sugerem um efeito biofísico da redução do teor em água das células sobre a expansão celular, mediado por alterações na pressão de turgescência (Bradford e Hsiao, 1982). Mas, mais recentemente, há indicações do envolvimento de sinais produzidos nas raízes em resultado da alteração do teor de água no solo, antes mesmo de serem afectadas as

relações hídricas foliares (Passioura, 1988; Zhang e Davies, 1989; Saab e Sharp, 1989; Gowing *et al.*, 1990). Alguns trabalhos, contudo, relatam não haver efeitos significativos quer na duração da expansão, quer na taxa de divisão celular e iniciação dos primórdios foliares induzidos pelos défices hídricos (Lawlor e Leach, 1985; Gowing, *et al.*, 1990). Outros revelam, no entanto, efeitos dependentes da idade da folha, em função da actividade relativa ao nível da divisão e expansão celulares aquando da imposição dos défices hídricos (Randall e Sinclair, 1988; Steinberg *et al.*, 1990). Por exemplo, em soja, as folhas iniciadas durante o período de stress hídrico apresentavam menor número de células e menor área foliar, enquanto que as que se encontravam já em expansão apresentavam reduções mais significativas na área foliar do que no número de células (Randall e Sinclair, 1988).

O stress hídrico induz alterações no padrão de distribuição da biomassa na planta, por exemplo, aumenta a razão raiz-parte aérea (Bradford e Hsiao, 1982; Huck *et al.*, 1983; Steinberg *et al.*, 1990) e a massa foliar por unidade de área (Mooney *et al.*, 1978; Castel e Ferreres, 1982; Frederick *et al.*, 1990; Wise *et al.*, 1990). Apesar dos avanços realizados no estudo molecular e bioquímico dos factores de regulação da partição dos assimilados ao nível celular e foliar (Stitt e Quick, 1989; Sonnewald e Willmitzer, 1992) e de ser reconhecida a necessidade de integrar abordagens de diferentes níveis, permanece ainda por avaliar a importância de alguns desses factores ao nível da planta inteira. Como foi referido, a SPS é de certo um dos factores determinantes da regulação da partição dos assimilados na folha. Recentemente, Galtier *et al.* (1993), baseados nas modificações da distribuição da biomassa na raiz vs. parte aérea exibidas por plantas transgénicas de tomateiro com elevada actividade de SPS, concluíram que esta enzima deverá desempenhar também um papel importante na partição dos assimilados ao nível da planta inteira.

Não dispomos, por enquanto, de dados que permitam julgar acerca do envolvimento da SPS nas alterações frequentemente observada na razão raiz-parte aérea induzidas pelo stress hídrico. O mecanismo que determina o favorecimento das raízes, nestas condições, é desconhecido e é normalmente interpretado em termos da maior sensibilidade da parte aérea aos défices hídricos e, conseqüentemente, de uma maior disponibilidade de assimilados para o crescimento das raízes. O ácido abscísico (ABA), cuja concentração na maior parte dos casos aumenta nas plantas em stress hídrico, parece estar envolvido na manutenção da expansão celular ao nível das raízes e na inibição ao nível das folhas (Saab *et al.*, 1990), apesar de não haver evidências conclusivas de que se trate de um efeito directo ou isolado do ABA (Munns e Sharp, 1993).

2.2.2. EFEITOS EM FOLHAS DE DIFERENTES IDADES

A folha é um órgão com crescimento e tempo de vida limitado, e os fenómenos de emergência, desenvolvimento e senescência foliares são, do ponto de vista morfológico e fisiológico, de grande complexidade (Maksymowych, 1973). Podem definir-se, *grosso modo*, as principais fases na vida da folha associadas a determinados processos metabólicos mais característicos (Woolhouse, 1978). Por exemplo, os primórdios foliares apresentam uma elevada actividade mitótica, taxas fotossintéticas e transpiratórias praticamente nulas e as folhas jovens, até atingirem cerca de 1/3 a 1/2 da área final, são órgãos essencialmente importadores (Milthorpe e

Moorby, 1969; Ho, 1979; Dale, 1988). As folhas em maturação funcionam como órgãos exportadores de compostos orgânicos, vão apresentando teores cada vez mais reduzidos de proteína (Maksymowitch, 1973) e a taxa fotossintética depois de atingir o seu máximo, mesmo antes de estar completa a expansão foliar, vai diminuindo progressivamente (Silvius *et al.*, 1978; Lurie *et al.*, 1979; Hurewitz *et al.*, 1987; Wullschlegel e Oosterhuis, 1990; Peng e Krieg, 1991). Na fase de senescência há uma rápida degradação dos pigmentos clorofilinos, os cloroplastos apresentam modificações ultra-estruturais importantes e, em termos fisiológicos, é especialmente limitante a cessação da síntese proteica no cloroplasto (Dickman *et al.*, 1975; Woolhouse, 1978; Peoples *et al.*, 1980, 1983; Lammattina *et al.*, 1985).

Para Noodén (1988), a senescência compreende o conjunto de modificações degenerativas, controladas endogenamente, que se enquadram no padrão de desenvolvimento natural e que conduzem à morte das células, tecidos e órgãos. Os factores externos contribuem de uma forma não regulada para o envelhecimento, diminuindo a resistência às restrições ambientais, induzindo ou acelerando processos que se assemelham à síndrome da senescência. No caso das deficiências hídricas, contudo, o autor refere que este tipo de stress altera o balanço hormonal e acelera a abscisão foliar, afectando muitos processos na mesma direcção da senescência normal: fotossíntese, respiração, síntese proteica e de RNA, teores de clorofila e de proteína. Durante o envelhecimento, diminui a condutância estomática (Wullschlager e Oosterhuis, 1990; Peng e Krieg, 1991). Mas em condições de stress hídrico as folhas jovens podem apresentar condutâncias estomáticas menores relativamente às folhas adultas, o que tem sido associado a níveis de ABA mais elevados naquele tipo de folhas (Cornish e Zevaart, 1984; Correia, 1993).

O decréscimo da fotossíntese associada ao envelhecimento das folhas depende não só de factores estomáticos mas também de factores não-estomáticos (Field, 1987). Os défices hídricos moderados parecem suspender a redução das taxas fotossintéticas que acompanha o envelhecimento normal das folhas. As folhas das plantas rehidratadas apresentam taxas fotossintéticas superiores às das folhas da mesma idade cronológica de plantas regadas, mas idênticas às folhas da mesma idade fisiológica (Ludlow, 1975). Este efeito, observado numa monocotiledónea C₄, poderá radicar no decréscimo ou na paragem de crescimento induzida pelos défices hídricos e consequente manutenção temporária de compostos orgânicos nas folhas mais velhas que, de outro modo, seriam mais rapidamente mobilizados para as zonas de crescimento activo. O aparente estímulo do crescimento e da fotossíntese nas plantas rehidratadas deve-se às alterações ontogénicas induzidas pelos défices hídricos moderados (Ng *et al.*, 1975). O stress hídrico afecta não só o crescimento em termos de massa, área e longevidade, mas também induz modificações dependentes da idade na composição foliar. Reviron *et al.* (1992) descreveram as alterações nos padrões proteicos de folhas de *Brassica napus* que se desenvolveram antes e depois do estabelecimento de défices hídricos. Aqueles autores caracterizaram um polipéptido duplo, de baixa massa molecular, que se acumulava durante o stress e desaparecia após rehidratação; face às alterações morfofisiológicas apresentadas por aqueles dois tipos de folhas, os autores sugeriram que este polipéptido possa proteger as folhas mais jovens da senescência induzida pelo stress hídrico observada nas folhas mais velhas.

A expansão celular é acompanhada pela síntese activa dos compostos das paredes, membranas e organelos celulares. As paredes celulares não são perfeitamente

elásticas, e a relação, para um determinado teor hídrico, entre o volume, a pressão de turgescência e a pressão osmótica depende do módulo de elasticidade (ϵ) da parede, em consequência da sua composição e estrutura; ϵ mais reduzidos (paredes mais elásticas) são característicos das células em expansão, relativamente às células maduras, e dos mesófitos em relação aos xerófitos (Zimmerman, 1978). O valor deste parâmetro é bastante importante para a manutenção do crescimento e sobrevivência dos tecidos vegetais em condições de secura, pois reflecte a relação entre a variação do volume correspondente à variação da pressão de turgescência, determinando ainda a diferença de potenciais hídricos entre o solo e a planta e, consequentemente, a capacidade de extrair água de um solo a secar. Há diversas indicações de que ϵ varia não só em função das modificações ontogénicas da folha, mas também em resposta a factores externos, nomeadamente aos défices hídricos, embora em alguns casos seja difícil de inequivocamente estabelecer o contributo de ϵ nas relações hídricas celulares atendendo a alterações conjuntas da pressão osmótica e das características ontogénicas das paredes que se sobrepõem durante os tratamentos (Tyree e Jarvis, 1982). Em condições de secura a massa foliar por unidade de área aumenta (Castel e Ferreres, 1982; Frederick *et al.*, 1990; Wise *et al.*, 1990) devido não só ao decréscimo na área foliar (Castel e Ferreres, 1982; Sobrado, 1990; Ramalho e Chaves, 1992) mas também ao aumento da espessura (Cutler, 1977) e da maior contribuição dos hidratos de carbono foliares para as paredes celulares (Freedden *et al.*, 1991).

Há uma estreita correlação entre a composição e actividade enzimáticas, e o desenvolvimento da folha (Maksymowitch, 1973). Os mecanismos de coordenação da síntese *de novo* ou de activação das várias enzimas ao longo das alterações ontogénicas deverão fazer parte de um processo regulador do desenvolvimento, cujo mecanismo é desconhecido. O padrão de actividade das enzimas RuBisCO e SPS é paralelo ao da taxa fotossintética ao longo dos estádios de desenvolvimento da folha (Silvius *et al.*, 1978; Wittenbach, 1979; Lurie *et al.*, 1979; Hurewitz e James, 1987; Crafts-Brandner *et al.*, 1990). No tabaco a actividade da RuBisC'ase diminui basiptamente, enquanto a actividade da RuBisO'ase é menor tanto nas folhas mais jovens como nas mais velhas, sendo máxima nas intermédias.

Ao nível da planta, os estudos de produtividade têm-se centrado sobretudo em questões que relacionam a fotossíntese com as deficiências em azoto e interacção com a intensidade luminosa (Field, 1981; Gulmon e Chu, 1982; Mooney e Gulmon, 1982; DeJong e Doyle, 1985). O nível de défice hídrico capaz de despoletar os processos de senescência está provavelmente dependente da nutrição azotada e do estádio de desenvolvimento (Bradford e Hsiao, 1982), não havendo dados suficientes para avaliar os efeitos do stress hídrico no padrão de desenvolvimento das folhas no copado. As folhas depois de expandidas apresentam teores de azoto cada vez mais baixos correspondentes, sobretudo, à rápida perda de proteína, essencialmente de constituintes do cloroplasto e principalmente de RuBisCO (Hashimoto *et al.*, 1989; Vapaavuori e Vuorinen, 1989). Vão ocorrendo alterações sequenciais na estrutura e constituintes do cloroplasto, mas a clorofila, ao contrário da RuBisCO, não parece constituir fonte de azoto para as folhas mais jovens (Gepstein, 1988). Modificações na razão das clorofilas *a* e *b*, que se assemelhem à das folhas de sombra, permitirão uma melhor eficiência na captação de radiação das folhas mais velhas, que ocupam normalmente posições relativas na planta correspondentes aos locais mais ensombrados (Hashimoto *et al.*, 1989; Vapaavuori *et al.*, 1989; Olesinski *et al.*, 1989;

Wullshlager e Oostehuis, 1990). São também as folhas mais velhas, as que apresentam teores mais baixos de azoto (Gulmon e Chu, 1982; Mooney e Gulmon, 1982; DeJong e Doyle, 1985). O envelhecimento gradual dos copados e a queda das folhas mais velhas pode ser considerado adaptativamente vantajoso em termos de ganho global de carbono e de economia da água em função da área transpirante (Ludlow, 1975; Field, 1981, 1987; Castel e Fereres, 1982).

2.3. EFEITOS DA REHIDRATAÇÃO APÓS STRESS

Ainda que os estudos dos efeitos do stress hídrico na assimilação e no metabolismo fotossintético do carbono tenham recebido considerável atenção, as respostas celulares à rehidratação após stress têm sido sobretudo estudadas em organismos tolerantes à dessecação extrema, sendo mais escassa a informação para as plantas vasculares mesofíticas ou xerofíticas. A capacidade e rapidez da recuperação após rehidratação depende das espécies, tipo de tecidos e, ainda, do grau de severidade do défice hídrico. De uma maneira geral, a seguir à rehidratação do solo restabelece-se rapidamente a turgidez dos tecidos, mas o alívio do stress restaura diferentemente os vários processos afectados. Se apesar dos défices hídricos a integridade fisiológica for mantida, o metabolismo pode ser rapidamente reactivado após rehidratação dos tecidos. Por outro lado, se os efeitos inibitórios da desidratação se situarem além de um limite variável com as plantas, após ter sido aliviado o stress a recuperação ou é lenta (porque depende de mecanismos reparadores), ou impossível (Bewley e Krochko, 1982).

No mesófilo, a inibição fotossintética em condições de stress hídrico moderado ou severo é devida quer a efeitos reversíveis do metabolismo, quer a efeitos de recuperação mais lenta, normalmente associados a alterações ultraestruturais (Kaiser *et al.*, 1981). Como foi referido, a capacidade fotossintética é extremamente tolerante aos défices hídricos, e ao nível do cloroplasto apenas parecem ocorrer danos irreversíveis para teores relativos em água inferiores a 30% (Kaiser, 1987; Chaves, 1991).

A desidratação induz modificações de estrutura e composição das membranas que resultam em efluxos transientes de diversos solutos durante o período de desidratação e após rehidratação, e cuja persistência denuncia lesões irreversíveis ou que exigem a actuação de mecanismos reparadores (Bewley e Krochko, 1982). Contrariamente ao que parece ocorrer *in vitro* ao nível celular, em que a rehidratação rápida conduz a um desarranjo das membranas e à ruptura de organelos (Kaiser e Huber, 1981), a integridade dos cloroplastos sujeitos a défices hídricos *in vivo*, a níveis inibitórios da taxa fotossintética, não parece ser grandemente afectada (Kaiser *et al.*, 1981; Vapaavuori *et al.*, 1984), apesar de, durante algum tempo após rehidratação, poderem observar-se efluxos de solutos (Kaiser *et al.*, 1981). Neste caso a recuperação incompleta das taxas fotossintéticas após rehidratação seria explicada pela fuga de metabolitos para o exterior dos cloroplastos devido a alterações na permeabilidade das membranas.

Durante a rehidratação a taxa fotossintética pode recuperar em algumas horas (Kirschbaum, 1987; Kaiser, 1987a; Ramalho e Chaves, 1992) ou ao longo de alguns dias (Loveys e Kriedmann, 1973; Vapaavuori *et al.*, 1984; Frederick *et al.*, 1989). Situações de recuperação mais lenta são justificadas pelo facto de ser frequentemente observado um atraso na reabertura estomática, relativamente à rehidratação dos tecidos foliares (Loveys e Kriedmann, 1973; Fereres *et al.*, 1979; Castel e Fereres, 1982; Gollan *et al.*, 1986; Correia e Pereira, 1994) aliado, ou não, a efeitos mais ou menos severos ao nível do mesófilo (Loveys e Kriedmann, 1973; Kaiser *et al.*, 1981; Vapaavuori *et al.*, 1984; Ghashgaie e Saugier, 1989; Ramalho e Chaves, 1992). Ainda

ao nível do mesófilo, a rehidratação parece reconduzir rapidamente o metabolismo fotossintético do carbono no sentido da reconstituição das reservas amiláceas, privilegiando a síntese do amido relativamente à da sacarose (Vapaavuori *et al.*, 1984; Bensari *et al.*, 1990).

Parece difícil generalizar a partir dos poucos dados disponíveis e atribuir maior ou menor importância a cada uma daquelas componentes na recuperação dos défices hídricos. Por exemplo, Vapaavuori *et al.* (1984) atribuiu sobretudo a alterações no mesófilo a lenta recuperação da taxa fotossintética de *Salix* sp.. O teor em azoto foliar por unidade de massa ou por unidade de área diminuiu, enquanto a condutância estomática recuperou para valores pré-stress. Estes resultados estão, de certo modo, em contradição com os obtidos por Ghashgaie e Saugier (1989) num estudo de interacção do stress hídrico com a deficiência em azoto, em *Festuca arundinacea*. Nesta espécie a recuperação da taxa fotossintética foi quase completa nas plantas deficientes em azoto, enquanto que as fertilizadas atingiram apenas 50% da taxa pré-stress e mantiveram os estomas encerrados. No entanto o valor de p_i (apesar das dúvidas que envolvem o significado deste parâmetro) recuperou completamente em ambos os tipos de plantas, e os autores admitiram, por isso, não poder ser exclusivamente atribuído ao funcionamento estomático a inibição observada na taxa fotossintética. No estudo de Dreesmann *et al.* (1994) com plantas de *Beta vulgaris* sujeitas a um ciclo de stress de 7 dias, as componentes estomática e não estomática recuperavam diferentemente após rehidratação. A limitação estomática foi aliviada 24 horas nas plantas rehidratadas mas a actividade da RuBisCO, que tinha decrescido apenas 20% durante o ciclo de secura, diminuiu ainda mais com a rehidratação e a actividade só começou a recuperar 48 horas depois. Ainda neste estudo, a análise dos teores proteicos e dos níveis de RNAm das duas sub-unidades da RuBisCO mostraram que a quantidade e a síntese *de novo* da pequena sub-unidade (e apenas desta) decresceram com os défices hídricos mais severos e recuperaram lentamente com a rehidratação.

Alguns efeitos da rehidratação após stress parecem envolver mecanismos dependentes da idade da folha. É o caso da aceleração da senescência das folhas mais velhas observada em algumas plantas como no algodoeiro (McMichael *et al.*, 1973), no tremoço (Ramalho *et al.*, 1992) e na nabíça (Reviron *et al.*, 1992). Este tipo de efeito poderá estar associado a alterações na expressão genética induzidas pelos défices hídricos e dependentes da idade da folha, que só se tornam conspícuas após o restabelecimento da turgidez dos tecidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo faz-se uma breve caracterização do material biológico utilizado e apresentam-se genericamente as metodologias usadas. Nas secções de apresentação de resultados dos capítulo seguintes são então especificadas as condições experimentais de realização de cada ensaio.

3.1. MATERIAL VEGETAL

A maior parte dos estudos realizados no âmbito deste trabalho foram efectuados no tremoceiro; a utilização de outras espécies em alguns ensaios, concretamente da videira e do eucalipto, permitiu observar a diversidade interespecífica das respostas fotossintéticas às deficiências hídricas.

3.1.1. *Lupinus albus* L..

O tremoceiro é uma terófito subespontânea de Portugal, cultivada em sistemas de agricultura de sequeiro sobretudo para aproveitamento como forragem e pelas sementes comestíveis. O género *Lupinus* compreende algumas espécies nativas da região Mediterrânea e de Portugal e tem sido alvo de especial atenção em programas de melhoramento e de conservação dos recursos genéticos de proteaginosas (Mota, 1986).

Foram utilizadas sementes de uma variedade comercial de *Lupinus albus*. Em todos os ensaios, após embebição das sementes em água corrente durante 24 horas, a sementeira foi efectuada directamente em vasos de 10-12 dm³ com uma mistura de turfa e areia (1:3), ou com uma mistura comercial de turfa e solo da Serra de Monchique. As plantas foram cultivadas em ambiente não controlado, ao ar livre ou sob abrigo, nas instalações do I.S.A., em Lisboa, ou no Horto da Universidade do Algarve, Gambelas, Faro.

3.1.2. *Vitis vinifera* L..

A videira é uma espécie cultivada para produção de fruto, de elevado interesse económico, constituindo uma das culturas mais antigas de Portugal. Utilizaram-se plantas da cv. Rosaki propagadas a partir de estaca e com um ano de enraizamento, cultivadas em vasos de 9 dm³ (2 plantas por vaso) com uma mistura de solo e areia (2:1). As plantas cresceram sob abrigo, numa estufa do I.S.A., e foram colocadas ao ar livre em aclimação duas semanas antes do início do ensaio.

3.1.3. *Eucalyptus globulus* Labill..

O eucalipto é uma espécie nativa da Tasmânia e da Austrália que tem sido utilizada em Portugal em sistemas de silvicultura intensiva. O ensaio com esta espécie foi realizado no I.S.A., em plantas com cerca de um ano cultivadas em vasos de 4 dm³ a partir de semente comercial (CELBI, Portugal).

3.1.4. *Chenopodium rubrum* L..

Para a avaliação dos efeitos dos défices hídricos no metabolismo fotossintético da sacarose e do amido dos tecidos consumidores utilizaram-se culturas em suspensão de células heterotróficas de *Chenopodium rubrum* L.. Esta cultura, obtida a partir de culturas de células fotoautotróficas (Huseman e Barz, 1977), foi mantida em crescimento heterotrófico durante 24 meses, incubada em agitação contínua, às escuras, com um suplemento de glucose no meio Murashige-Skoog (Murashige e Skooge, 1962). Estudos preliminares da cinética de consumo de glucose do meio de cultura, e de respiração, indicaram que as células apresentavam uma fase estacionária no 13º-14º dia, com baixos níveis endógenos de glucose ($1.8 \pm 0.5 \text{ mmol g}^{-1} \text{ m.f.}$), frutose ($2.5 \pm 0.2 \text{ mmol g}^{-1} \text{ m.f.}$), sacarose ($0.9 \pm 0.2 \text{ mmol g}^{-1} \text{ m.f.}$) e amido ($1.6 \pm 0.3 \text{ mmol glucose g}^{-1} \text{ m.f.}$). Assim, ao 14º dia era feita a recultura em 80 cm^3 de meio contendo 100 mol m^{-3} de glucose. Em todas as experiências foram utilizadas células com 14 dias.

3.2 MÉTODOS

3.2.1. APLICAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS DÉFICES HÍDRICOS

Nos ensaios realizados com plantas envasadas os défices hídricos foram induzidos por suspensão da rega. Como as plantas cresceram em condições não controladas de luz, temperatura e humidade relativa, a duração dos ciclos de imposição de secura variou nos diferentes ensaios em função da severidade de défice hídrico pretendido.

A severidade do défice hídrico nas plantas envasadas foi avaliada pela medição do potencial hídrico foliar (Ψ) e pelo teor relativo em água (RWC) das folhas, determinados de madrugada e ainda, apenas em alguns casos, a meio do dia. O potencial hídrico foi medido em folhas segundo o método de Scholander *et al.* (1964) com uma câmara de pressão (Manofrígido, Lisboa). O teor relativo em água das folhas, ou seja a percentagem de água presente nos tecidos relativamente à água máxima que poderão conter, foi calculado a partir dos valores de massa foliar fresca (m_f), de massa foliar seca (m_s) e de massa foliar túrgida (m_t) de acordo com a equação (4). Para esta determinação usaram-se folhas destacadas ou discos foliares.

$$RWC = (m_f - m_s) \times 100 / (m_t - m_s) \quad (4)$$

Nas experiências realizadas com culturas de células em suspensão os défices hídricos foram impostos por desidratação osmótica, através da inclusão no meio de cultura de diferentes concentrações de sorbitol. As células foram incubadas em meios com potencial osmótico de -0.28, -0.4, -0.5, -0.8, -1.5 e -2.3 MPa, correspondentes a soluções 0.1 M de glucose + a seguinte série de concentrações de sorbitol: 0 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M, 0.5 M e 0.8 M.

O grau de desidratação osmótica imposto às células de *C. rubrum* em cultura foi avaliado pela determinação do volume total dos protoplastos, adaptando o método desenvolvido por Kaiser (1982) para discos foliares. O método baseia-se no pressuposto de que, ao contrário da água que se distribui pelo simplasto e pelo apoplasto dos tecidos, o sorbitol não penetra nos protoplastos e fica confinado ao apoplasto. As células foram incubadas durante 60 minutos em meio complementado

com [^{14}C] sorbitol ($1.5 \times 10^8 \text{ Bq m}^{-3}$) e $^3\text{H}_2\text{O}$ ($1 \times 10^9 \text{ Bq m}^{-3}$); mediu-se a radioactividade nas células após rápida filtragem e sucção (sem lavagem) e o volume total dos protoplastos foi estimado pela diferença entre a marcação pelo ^3H e pelo ^{14}C .

3.2.2. ÍNDICE DE PLASTOCRONO FOLIAR (LPI)

O índice de plastocrono foliar (LPI) é uma medida morfológica da idade da folha determinado a partir do índice de plastocrono (PI) que é o tempo decorrido para que duas folhas sucessivas atinjam estádios de desenvolvimento idênticos. O estágio de desenvolvimento é definido por um comprimento foliar de referência correspondente a folhas que ainda se encontram numa fase de crescimento exponencial. Assim, $\text{LPI}_i = \text{PI} - i$ em que i é o número de série da folha por contagem acrópeta. De acordo com Erickson e Michelini (1957) PI é calculado pela expressão (5), em que n é o número de série da folha de referência (folha mais nova com um comprimento igua ou superior ao comprimento de referência λ) e L_n é o comprimento da folha de referência no tempo t .

$$\text{PI} = n + [\ln L_n(t) - \ln \lambda / \ln L_n(t) - \ln L_{n+1}(t)] \quad (5)$$

De acordo com Vendeland *et al.* (1982), o stress hídrico parece afectar de modo diferente a fase de crescimento exponencial da folha n e da $n+1$, e introduz uma alteração na expressão do cálculo do PI de plantas sujeitas a stress (6), em que a razão de plastocrono (PR), correspondente ao denominador da equação (5) nos é dado por $\ln \lambda / \lambda'$, onde λ' é o comprimento de referência para as folhas das plantas em stress.

$$\text{PI} = n + (\ln L_{n+1} - \ln \lambda' / \text{PR}) \quad (6)$$

Para o tremoceiro tomou-se o comprimento do folíolo central como medida do comprimento da folha e consideraram-se os seguintes comprimentos de referência: $\lambda = 20 \text{ mm}$ e $\lambda' = 16 \text{ mm}$ (Chaves *et al.*, 1990).

3.2.3. TROCAS GASOSAS (H_2O E CO_2) EM FOLHAS INTACTAS.

Foi utilizado um sistema em circuito aberto de medição da taxa de trocas gasosas (H. Walz, Mess und Regeltechnik, Effeltrich, Alemanha) com um analisador de gases por infra-vermelho para o CO_2 e vapor de água (BINOS, Leybold Heraus, Hanau, Alemanha) descrito por Lange e Tenhunen (1984). Este sistema é basicamente constituído por três componentes: I - a câmara de medida, onde está encerrado o material vegetal não destacado da planta; II - a unidade central que inclui a fonte de alimentação, controladores de temperatura, bombas de circulação do ar, controladores de fluxo, diversos comandos, uma unidade colectora e processadora de dados, e os mostradores de leitura digital e analógica; III - o analisador diferencial de CO_2 e de vapor de água por análise espectroscópica na banda do infra-vermelho (Infra Red Gas Analyser-IRGA).

O princípio de funcionamento deste sistema, no qual se baseiam as determinações das taxas de trocas gasosas e da condutância estomática, reside na medição exacta pelo IRGA das variações na concentração de CO_2 e de vapor de água devido à actividade do material vegetal que está encerrado na câmara de medida, em relação a um circuito paralelo de referência. Designa-se circuito aberto porque há um

fluxo de ar que o atravessa; as medições são por isso efectuadas em modo diferencial, e o fluxo de ar deverá ser constante e determinado com precisão.

Este sistema pode funcionar com condições controladas de luz, de humidade e de temperatura. Nestes casos é necessário acoplar àquele sistema básico as respectivas unidades de operação e de regulação.

A câmara de medida, com forma cilíndrica e volume de 0.2 dm^3 , é constituída por duas partes entre as quais é colocado o material vegetal, e cuja estanquicidade é assegurada por dois anéis de esponja compacta que evitam que os tecidos se danifiquem. A parte superior funciona como uma tampa, com janela de vidro duplo, onde pode ser instalada a unidade de iluminação artificial. Esta está equipada com uma lâmpada de halogénio (12V/75W) de pequena abertura angular, ventilação e um conjunto de filtros neutros que permitem obter irradiâncias ao nível da folha, na banda da radiação fotossinteticamente activa, entre 0 e $\sim 2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A parte inferior da câmara dispõe de um ventilador que mantém a circulação do ar no interior da câmara, minimizando a resistência da camada limite à difusão do vapor de água da superfície foliar. Na câmara de medida estão ainda instalados sensores de humidade, de radiação fotossinteticamente activa e de temperatura do ar e da folha.

A taxa de fotossíntese, taxa de transpiração, condutância da folha à difusão do vapor de água e pressão parcial de CO_2 nos espaços intercelulares foram calculadas de acordo com von Caemmerer e Farquhar (1981). Nos resultados a condutância foliar foi considerada equivalente à condutância estomática, atendendo, por um lado, à elevada resistência cuticular relativamente à resistência em paralelo imposta pelos estomas, e por outro lado, à elevada condutância da camada limite que existe nas condições de medida com este sistema.

A porção de material vegetal, neste caso folha, encerrado dentro da câmara era cuidadosamente marcada a fim de se proceder à posterior medição da área. Todas as taxas são determinadas em função da área foliar projectada.

3.2.4. CAPACIDADE FOTOSSINTÉTICA

A taxa de evolução de O_2 dependente do CO_2 , a concentrações de CO_2 e a irradiância saturantes foi determinada em discos foliares no eléctrodo de oxigénio (Hansatech Ltd., Kings Lynn, Reino Unido) de acordo com método de Björkman e Demmig (1987).

Um eléctrodo de oxigénio funciona como uma célula electroquímica no qual é gerada uma corrente eléctrica proporcional à actividade do oxigénio presente (Walker, 1987). Os tecidos clorofilinos em actividade fotossintética (iluminados e com acesso a CO_2) libertam oxigénio. O oxigénio é detectado por um eléctrodo basicamente constituído por um cátodo de platina e um ânodo de prata ligados por um electrólito (KCl); a aplicação de uma pequena voltagem entre os eléctrodos polariza a platina, e o oxigénio, se está presente, é reduzido funcionando como aceitador de electrões. A corrente gerada pelo consumo (redução) do oxigénio no cátodo é linearmente proporcional à sua concentração efectiva.

Todas as medições foram realizadas a temperatura controlada (25°C), a irradiância saturante ($1200\text{-}1400 \mu\text{mol quanta PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a concentrações de CO_2 saturantes de forma a ultrapassar a limitação estomática e assegurar níveis máximos de fotossíntese: de acordo com ensaios prévios, a 15% de CO_2 para as plantas em stress e a 5% de CO_2 para plantas sem limitações hídricas (Chaves, 1991).

3.2.5. TAXA DE CONSUMO DE O₂

A taxa de consumo de O₂ foi determinada nas culturas de células heterotróficas em suspensão utilizando um eléctrodo de oxigénio. Este eléctrodo e o princípio de medição são semelhantes ao descrito em 3.2.3., mas as medições, neste caso, são efectuadas em fase líquida.

3.2.6. FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a*.

A radiação absorvida por uma folha não é totalmente utilizada nas reacções fotoquímicas da fotossíntese; parte dessa energia é dissipada pela clorofila *a* em calor e fluorescência. *In vivo* apenas cerca de 2-5% da energia absorvida pela clorofila fluoresce, mas este valor aumenta quando os processos fotossintéticos de conversão de energia estão de algum modo limitados (Lichtenthaler e Rinderle, 1988).

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram determinados em 6 discos foliares com uma área total de cerca de 3 cm² previamente mantidos no escuro durante 30 minutos. As medições foram realizadas com uma câmara modificada para receber a fibra óptica de um eléctrodo de oxigénio e um fluorímetro PAM - "pulse amplitude modulation" (PAM 101, PAM 103, H. Walz, Mess und Regeltechnik, Effeltrich, Alemanha) desenvolvido por Schreiber e Bilger (1986). A eficiência de captação de energia pelos centros de reacção do fotossistema II foi estimada pela razão entre a fluorescência basal (F₀) e a fluorescência máxima (F_m), ou pela razão entre a fluorescência variável (F_v = F_m-F₀) e a fluorescência máxima (F_m). F₀ é determinado com uma luz de medida de intensidade muito baixa (cerca de 1.2 μmol m⁻² s⁻¹) e corresponde à energia base de excitação dos pigmentos antena, antes de migrar para os centros de reacção. F_m é determinado em resposta a um único pulso de luz saturante (cerca de 4000 μmol m⁻² s⁻¹) de forma a reduzir completamente todos os aceitadores primários e corresponde à capacidade máxima de captação de energia pelo PSII.

3.2.7. PARTIÇÃO DOS ASSIMILADOS RECENTES

O método usado na determinação da partição dos assimilados recentes é o descrito por Quick *et al.* (1989). A partição do carbono fixado por discos foliares durante a fotossíntese, ou incorporado durante o metabolismo heterotrófico de células em suspensão, entre açúcares solúveis (glucose, frutose e sacarose) e insolúveis (amido) foi determinada a partir da taxa de incorporação de ¹⁴C naqueles açúcares.

i. Discos Foliares.

Um conjunto de três eléctrodos de oxigénio, ligados em paralelo, foram associados em série a uma câmara de mistura de gases e a uma bomba; a bomba permitia forçar a circulação do ar no sistema em circuito fechado (volume ~ 2dm³) com um fluxo de 0.5 dm³ min⁻¹. Um conjunto de válvulas integradas no sistema possibilitava quer a purga do circuito para uma garrafa com hidróxido de cálcio, quer a entrada de uma mistura gasosa com 15% de CO₂ a partir de garrafas pressurizadas com ar e CO₂. Os discos foliares colocados nos eléctrodos foram submetidos a condições de luz e de CO₂ saturantes até que fosse obtida uma taxa fotossintética estabilizada. Com uma seringa hipodérmica injectou-se a solução marcada (4x10⁵ Bq NaH¹⁴CO₃ em 100 mm³ de tampão carbonato/bicarbonato de potássio, pH 9.3) num tubo Eppendorf suspenso na câmara misturadora contendo 500 mm³ de ácido cítrico, que deu início ao processo de libertação do CO₂ marcado; durante 5 minutos

manteve-se a circulação forçada do ar no sistema. Encerradas as válvulas de ligação aos eléctrodos, procedeu-se ao registo da taxa de evolução de O₂ durante 15 minutos, findos os quais as amostras foram rapidamente congeladas em azoto líquido e mantidas a -80°C para posterior extracção.

ii. Células heterotróficas em suspensão

A partição de assimilados recentes nas células heterotróficas em suspensão foi determinada a partir da incorporação de carbono radioactivo da [U¹⁴C]-glucose fornecido no meio de cultura.

Efectuou-se a recultura de cerca de 1g massa fresca de células em 10 cm³ de meio complementado com 8.37x10⁹ Bq m⁻³ de [U¹⁴C]-glucose. Após 8 horas de incubação as células foram recolhidas por filtração e sucção, e congeladas em azoto líquido.

Em ambos os casos (i. e ii.) foi idêntica a metodologia de extracção, a fim de obter as fracções em que a radioactividade é medida (Quick *et al.*, 1989). A extracção foi feita em etanol 80% (v/v) a 80°C. O resíduo sólido, depois de lavado e homogeneizado em água, constituiu a fracção onde foi determinada a radioactividade correspondente ao carbono incorporado no amido. O extracto alcoólico, depois de seco no evaporador rotativo a 35°C, e ressolubilizado em 1 cm³ de água, foi separado nas fracções ácida, neutra e básica em microcolunas com resinas de troca iónica; determinou-se a radioactividade na fracção neutra, correspondente aos açúcares solúveis.

3.2.8. QUANTIFICAÇÃO DA CLOROFILA (a+b).

A quantificação da clorofila total dos extractos foliares em acetona 80% (v/v) foi efectuada tomando as leituras das absorvâncias a 645 nm e 663 nm e utilizando a equação de Arnon (1949). Em alguns casos determinou-se também a clorofila em extractos alcoólicos (etanol 80% v/v) pela medida da absorvância a 662 nm (Arnon, 1949).

3.2.9. QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA SOLÚVEL.

A proteína solúvel foi determinada nos extractos foliares pelo método colorimétrico de Bradford (1976) utilizando um reagente comercializado (Bio-Rad, California) e albumina bovina (fracção V, Sigma Chem., Missouri) como padrão.

3.2.10. QUANTIFICAÇÃO DE METABOLITOS

Muitos metabolitos estão presentes nos tecidos foliares a concentrações muito baixas e nem sempre é possível colher grandes quantidades de material vegetal para extracção. Segundo Stitt *et al.* (1989), a utilização de metodologias enzimáticas de medição espectrofotométrica constitui uma abordagem sensível de quantificação, mas pressupõe, para além de alguns cuidados com os reagentes e enzimas usados, a utilização de um espectrofotómetro de duplo feixe e de duplo comprimento de onda, com capacidade de resolução na escala das mili-unidades de absorvância.

Para as quantificações realizadas no âmbito desta secção utilizou-se um espectrofotómetro de duplo feixe e duplo comprimento de onda (Sigma ZFP-22, Hamburg), com resolução até 0.1 mili-unidade de absorvância; as medições foram

efectuadas em modo diferencial a 340 nm (c.d.o. de medida do NADP(H)) e 400 nm (c.d.o. de referência). No cálculo da quantidade dos metabolitos usa-se o coeficiente de extinção molar do NAD(P)H ($E_{mM} = 6.2$, percurso 1cm).

i. Quantificação dos açúcares não estruturais.

O doseamento de açúcares não estruturais nos extractos foliares foi efectuado de acordo com a metodologia descrita por Stitt *et al.* (1978, 1989) baseada no método enzimático de Jones *et al.* (1977).

A extracção (cerca de 3.5 cm² de folha) foi realizada por incubação em etanol 80% (v/v) a 80°C durante 20 minutos. No sobrenadante determinaram-se as quantidades de glucose, frutose e sacarose, e ainda o teor em clorofila total. No resíduo sólido, depois de lavado e homogeneizado em água, determinou-se a quantidade de amido.

As concentrações de glucose, frutose e sacarose são determinadas indirectamente através de uma sequência de reacções de interconversão de açúcares acopladas à redução do NADP⁺; o NADPH é doseado espectrofotometricamente (340 nm - 400 nm), e a estequiometria das reacções para as hexoses e para a sacarose é, respectivamente, de 1:1 e de 2:1.

As amostras do sobrenadante (10-20 mm³), depois de clareadas com um pouco de carvão activado, foram injectadas directamente em cuvetes de espectrofotómetro semi-micro contendo 100 mM Imidazol (pH 6.9), 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP, 1.1 mM ATP e 0.5 U hexocinase (EC 2.7.1.1), num volume final de 600 mm³. As alterações na absorvância devidas à redução do NADP⁺ registadas com a adição sequencial de 2 U glucose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49), 2 U fosfoglucoisomerase (EC 5.3.1.9) e 20 U invertase (EC 3.2.1.26) correspondem respectivamente às quantidades de glucose, frutose e sacarose. Utilizaram-se enzimas e cofactores da Boehringer (Mannheim) à excepção da invertase (Sigma Chem., Missouri)

A suspensão do resíduo sólido (1 cm³), onde se determina a quantidade de amido, foi autoclavada durante 3 horas a 120°C. O amido na suspensão (100 mm³) foi depois solubilizado, durante 4 horas a 37°C, em 500 mm³ de meio de reacção constituído por 50 mM de tampão acetato-Na (pH 4.8), 1.4 U amiloglucosidase (EC 3.2.1.3.) - Boehringer, Mannheim - e 2 U α -amilase (EC 3.2.1.1) - Sigma Chem., Missouri. Finda a incubação, as amostras foram centrifugadas e o teor em glucose foi determinando no sobrenadante pelo método acima descrito.

ii. Quantificação de outros metabolitos

As amostras foram ultra-congeladas e mantidas a -80°C e até à extracção dos metabolitos; o transporte bem como a manipulação das amostras foram efectuados em azoto líquido. A extracção dos metabolitos foi realizada em clorofórmio/metanol, de modo a inactivar enzimas e precipitar a proteína, de acordo com a metodologia descrita por Stitt *et al.* (1988).

O material vegetal, ainda congelado, foi macerado num pequeno almofariz de porcelana previamente arrefecido com azoto líquido, até estar reduzido a um pó fino. Adicionou-se directamente no almofariz o meio de extracção, homogenizou-se e, logo que a pasta obtida começou a liquefazer-se, transferiu-se para tubos de centrifuga (almofariz, tubos e soluções foram mantidos em gelo). O meio de extracção é constituído por 1.5 cm³ de clorofórmio, 3.5 cm³ de metanol e 0.6 cm³ de tampão contendo 50 mM NaF, 5mM EGTA e 20 mM Hepes (pH 8.5). Após a adição de 3 cm³

de água destilada e da mistura ter sido bem agitada no vortex, centrifugaram-se as amostras (2000 g durante 2-3 minutos). Recolheu-se a fase alcoólica (superior) para frascos de evaporação rotativa onde foi seca (a 35°C) e o resíduo foi ressolubilizado em 0.8 cm³ de água. Alíquotas (150 mm³) de cada extracto, repartidas por pequenos tubos (Eppendorf), foram rapidamente congeladas em azoto líquido e mantidas a -80°C.

Glucose 6-fosfato, frutose 6-fosfato, glucose 1-fosfato e UDP-glucose.

Estes metabolitos foram quantificados espectrofotometricamente em modo diferencial (340 nm - 400 nm) por um método enzimático acoplado à redução do NADP⁺ (Stitt *et al.*, 1989).

Os extractos (20-100 mm³) foram injectados directamente em cuvetes de espectrofotómetro semi-micro, num volume total de 600 mm³ de meio de reacção constituído por 100 mM Tris-HCl (pH 8.1), 5 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP⁺. As alterações na absorvância pela adição sequencial de 0.7 U glucose-6-fosfato desidrogenase, 0.7 U fosfoglucoisomerase, 0.2 U fosfoglucomutase (EC 5.4.2.2), 15 mM Na₄P₂O₇, 0.2 U UDP-glucose pirofosforilase (EC 2.7.7.9) correspondem respectivamente às quantidades de Glu6P, Fru6P, Glu1P e UDP-Glu.

Malato

Utilizaram-se 10 mm³ de extracto em 600 mm³ de meio de reacção constituído por 100 mM trietanolamina-HCl (pH 8.5), 0.33 mM APAD (acetil piridina-adenina dinucleótido), 0.33 mM acetil-CoA, 0.3 U citrato sintase (EC 4.1.3.7). As alterações na absorvância foram medidas a 366 nm - 440 nm após a adição de 6 U malato desidrogenase (EC 1.1.1.37).

Frutose 2,6-bisfosfato.

A frutose 2,6-bisfosfato (F26BP) foi quantificada de acordo com a metodologia de Stitt (1990b). Trata-se de uma bio-quantificação fundamentada no facto deste metabolito activar a frutose 6-fosfato fosfotransferase dependente de pirofosfato (EC 2.7.1.90) - PFP - formando-se frutose 1,6-bisfosfato. A taxa de síntese deste composto é determinada espectrofotométricamente numa sequência de reacções acopladas à oxidação do NADH. É essencial incluir em cada bio-quantificação uma calibração interna utilizando diferentes concentrações de F26BP, porque outros compostos no extracto podem afectar a actividade da PFP ou a sensibilidade desta à F26BP (Stitt, 1990a).

A 880 mm³ de meio de reacção adicionou-se 10 mm³ de extracto ou 10 mm³ de cada uma das soluções padrão de F26BP (0.2 mM, 0.1 mM e 0.05 mM) + 10 mm³ de extracto previamente tratado com HCl (0.2 N); registaram-se as alterações na absorvância medida a 334 nm, durante 15-20 minutos, num espectrofotómetro com 5 células e automatização da leitura sequencial das células (Beckman. Ca). O meio de reacção é constituído por tampão 100 mM Tris-HCl (pH 8.1), 5 mM MgCl₂, 100 mM Frutose 6-fosfato, 15 µM NADH, 15 mM Na₄P₂O₇, 1 U glicerol 3-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.8), 2.3 U triose fosfato isomerase (EC 5.3.1.1), 0.1 U aldolase (EC 4.1.2.13), 100 mm³ de PFP isolada de batata (M. Stitt, Bayreuth).

3.2.11. ACTIVIDADE ENZIMÁTICA

i. Sacarose fosfato sintase (SPS)

A actividade da sacarose fosfato sintase é determinada pela quantificação de UDP libertada da UDP-glucose (segundo Stitt *et al.*, 1988). A utilização de diferentes concentrações de substrato possibilita a distinção das duas formas cinéticas desta enzima que apresentam diferentes sensibilidades ao fosfato inorgânico: 2 mM frutose 6-fosfato, 10 mM glucose 6-fosfato, 2 mM UDP-glucose, 5 mM Pi (determinação selectiva) ou 4 mM frutose 6-fosfato, 20 mM glucose 6-fosfato, 3 mM UDP-glucose (determinação não-selectiva). A UDP formada é medida espectrofotométricamente (340nm - 400 nm) num conjunto de reacções enzimáticas acopladas à oxidação do NADH.

Macerou-se o material vegetal congelado (0.3 g massa fresca) num almofariz previamente arrefecido em azoto líquido; o pó fino resultante da maceração foi transferido para pequenos tubos (Eppendorf), igualmente arrefecidos em azoto líquido, e nos quais se adicionou 1 cm³ de tampão de extracção; a mistura, depois de bem agitada no vórtex, foi repartida em alíquotas (200 mm³) por tubos parcialmente mergulhados em azoto líquido. O tampão de extracção é constituído por 50 mM HEPES (pH 7.4), 12 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 10% (v/v) glicerol, 0.1% (v/v) Triton X-100, 1 mM DTT, 2 mM benzamidina, 2 mM ácido amino-n-caprónico e 0.5 mM PMSF.

Depois de ter sido testada a linearidade de resposta a diferentes concentrações de substrato, ao tempo de incubação, e ainda a recuperação de UDP adicionada ao extracto bruto, os resultados não foram satisfatórios pelo que se tornou necessário remover substâncias interferentes (Dancer *et al.*, 1990). Os extractos foram centrifugados (1200 g, durante 2-3 minutos) e aplicaram-se 200 mm³ em microcolunas com 200 mm³ de aminohexil-agarose (Sigma Chem., Missouri), pre-equilibradas com 1 cm³ de 0.1 M Tris- HCl (pH 8.5), 0.5M NaCl, seguido de 1 cm³ de 0.1 M acetato-K (pH 4.5), 0.5 M NaCl e, finalmente na câmara fria, 1 cm³ de tampão de extracção. A actividade foi eluída da coluna por 6 lavagens sucessivas com 400 mm³ (2x200 mm³) de tampão de extracção contendo 0, 50 100, 200, 350, 500 mM NaCl. As fracções correspondentes a 100, 200 e 350 mM NaCl constituíram uma única amostra compósita onde foi determinada a actividade da SPS. As amostras (10-80 mm³) foram incubadas no meio de reacção (100 mM Hepes, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, os substratos da determinação selectiva ou da não-selectiva) a um volume final de 200 mm³, durante 10 minutos a 25°C. A reacção foi interrompida transferindo os tubos para um banho-maria a 95°C durante 3 minutos e, finalmente, para o gelo.

A UDP formada durante aquele tempo de incubação em 40 mm³ de meio de reacção foi determinada no espectrofotómetro (340 nm - 400 nm) pela quantidade de NADH oxidado em 600 mm³ do seguinte meio de medida: 50 mM Hepes (pH 7.0), 5 mM MgCl₂, 50 mM fosfoenolpiruvato, 5 mM NADH, 20 U lactato desidrogenase e 6 U piruvato cinase.

ii. Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO)

A actividade da RuBisCO pode ser determinada por radiometria (Lorimer *et al.*, 1977) ou por espectrofotometria (Lilley e Walker, 1974). Apesar das críticas de

alguns autores ao método espectrofotométrico relativamente à determinação da actividade inicial, o estudo comparativo de Ward e Keys (1989) considera-o adequado à determinação da actividade total e inicial se forem tomadas algumas precauções, não devendo no entanto ser utilizado em estudos de cinética de activação por cofactores.

Os folíolos de *L. albus* nos quais foram medidas as taxas de trocas gasosas foram os utilizados na determinação da actividade da RuBisCO, tendo sido previamente desenhados em papel vegetal para posterior medição da área. O material vegetal, mantido sob iluminação, foi destacado rapidamente de modo a cair num pequeno contentor de azoto líquido colocado sob a folha e recolhido em saquinhos de folha de alumínio também imersos em azoto líquido. As amostras foram mantidas em azoto líquido ou a -80°C .

A extracção foi efectuada com o material congelado ($\pm 5 \text{ cm}^2$) num almofariz arrefecido com azoto líquido, em 1 cm^3 de tampão de extracção 50 mM Hepes (pH 7.5), 15 mM MgCl_2 , 1 mM KH_2PO_4 , 100 mM DTT, 0.02% (m/v) BSA, 0.1% (v/v) Triton X-100.

O tampão de medida contém 50 mM Hepes (pH 7.8), 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 15 mM MgCl_2 , 5 mM ATP, 1 mM NADH, 10 mM NaHCO_3 , 5 mM creatinafosfato, 5 U creatina fosfocinase (EC 2.7.3.2), 5 U fosfogliceraldeído desidrogenase (EC 1.2.1.12), 5 U glicerato-3-fosfato cinase (EC 2.7.2.3). Para a determinação da actividade total 50 mm^3 de extracto ficou em incubação neste meio na cuvete do espectrofotómetro, durante 10 minutos. A actividade foi medida no espectrofotómetro (340 nm - 400 nm) pela taxa de oxidação do NADH, após a adição de 0.5 mM de ribose-5-fosfato. A estequiometria da reacção é de 1:2. O procedimento para a determinação da actividade inicial foi idêntico, mas sem fase de incubação (activação).

3.2.12 QUANTIFICAÇÃO DA RIBULOSE-1,5-BISFOSFATO CARBOXILASE/OXIGENASE

São diversas as metodologias referenciadas na bibliografia para o doseamento da RuBisCO em extractos foliares: por quantificação da proteína purificada ou separada electroforéticamente (e.g. Gimenez *et al.*, 1992), por cromatografia (e.g. Massacci *et al.*, 1987), determinações que utilizam as características cinéticas da enzima (e.g. Stitt *et al.*, 1991; Parry *et al.*, 1993), ou ainda por diferentes métodos imunológicos (e.g. Collatz *et al.*, 1979; Peoples *et al.*, 1980; Makino *et al.*, 1984; Catt e Millard, 1988; Metodiev e Demirevska-Kepova, 1992).

i. Quantificação por "rocket" imunolectroforese

A quantidade de RuBisCO em extractos foliares foi determinada por "rocket" imunolectroforese de acordo com a metodologia básica descrita por Laurell (1966) e que constitui uma adaptação do método de imunodifusão radial simples desenvolvido por Mancini *et al.* (1965).

Este método baseia-se na capacidade dos anticorpos formarem imunoprecipitados com os antígenos em solução e nas características electroforéticas das proteínas. A maioria das proteínas, carregadas negativamente num sistema tamponizado a pH 8.6 (superior ao ponto isoeléctrico), migram para o ânodo de um campo eléctrico, enquanto os antígenos ficam imobilizados por serem iso-eléctricos nesse pH. O antígeno é colocado em poços recortados numa das extremidades de um gel de agarose que contém os anticorpos específicos. À medida que se vai deslocando

electroforéticamente no gel forma-se um imunoprecipitado de forma triangular, "rocket", cuja área ou altura é proporcional à quantidade de antigene aplicada. Concentrações desconhecidas em extractos podem ser quantificadas utilizando diferentes quantidades de um padrão.

As amostras (discos foliares com cerca de 3 cm²) foram colhidas nos folíolos centrais da mesma folha em que foram determinadas as trocas gasosas. Os discos foliares foram rapidamente congelados em azoto líquido e mantidos a -80°C. A extracção foi efectuada com azoto líquido num almofariz, de modo idêntico ao acima descrito para a extracção da SPS, com um tampão contendo 50 mM Hepes, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM NaHCO₃, 10% (v/v) glicerol, 0.1% (v/v) Triton X-100, 20 mM DTT, 2 mM benzamidina, 2 mM ácido amino-n-caprónico, 0.5 mM PMSF.

Placas de vidro, pré-revestidas com agarose, foram preparadas com gel de 1% (m/v) agarose (baixa electroendosse, Sigma Chem., Missouri) em tampão barbitona (pH 8.6) com 1% de soro de porco anti-RuBisCO de tabaco (M. Stitt, Bayreuth). As amostras foram tratadas com 1% (v/v) Triton X-100 para assegurar a solubilização da proteína, centrifugadas, e o sobrenadante foi diluído 1:2 com uma solução de BSA (1mg cm⁻³). Fez-se correr em todas as placas, em simultâneo com as amostras, um padrão constituído por diferentes quantidades de RuBisCO de *L. albus* purificada. Obtiveram-se estreitas correlações da proteína do padrão quer com a altura ($r^2 = 0.93$, $p < 0.001$), quer com a área dos "rocket" ($r^2 = 0.86$, $p < 0.001$); no entanto, como em alguns casos os "rockets" apresentaram uma ligeira inclinação, adoptou-se utilizar a área como medida de calibração. Todas as amostras foram determinadas em duplicado com uma pequena diferença de diluição (em tampão de electroforése) efectuada directamente no poço (Fig. 3.1).

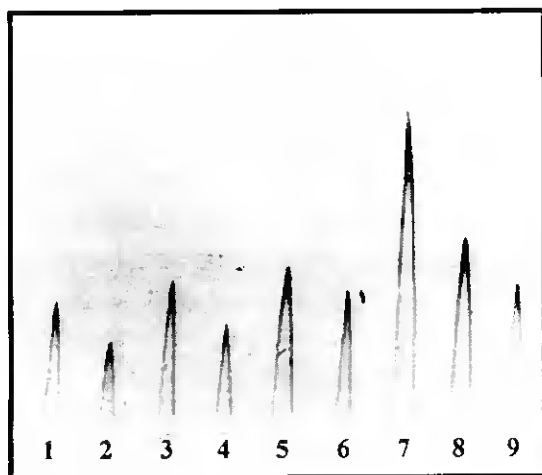


Fig. 3.1 Doseamento da RuBisCO em extractos foliares de *L. albus* por "rocket" imunoelectroforese: os poços 7 a 9 correspondem ao padrão e continham 1.68, 1.20, 0.72 mg RuBisCO purificada de *L. albus*; os poços 1 a 6 correspondem aos extractos foliares.

Utilizou-se uma unidade de imunoelectroforese e fonte de alimentação Shandon 600 (Shandon SPL, Cheshire) e aplicou-se corrente constante com uma tensão inicial de cerca 30 V/6 cm; a electroforese decorreu durante 8-10 horas. O gel na placa foi depois lavado com uma solução 0.1 M NaCl, prensado, seco e corado numa solução 0.5% (m/v) Comassie Brilliant Blue R em etanol, água, ácido acético

(v/v/v, 50:45:5). Depois de seco, o excesso de corante no gel foi retirado com 50% (v/v) isopropanol (ou com o solvente do corante) e, finalmente, foi novamente seco. A área delimitada pelos imunoprecipitados tornou-se bem visível com a coloração, e pôde ser determinada a partir da massa das réplicas dos "rockets" recortadas em fotocópia do gel, conhecida a massa por unidade de área do papel utilizado.

Utilizou-se como proteína padrão RuBisCO purificada de *Lupinus albus*. A metodologia seguida para a purificação foi a descrita por Paech e Dybing (1986) e consiste basicamente numa separação por precipitação, centrifugação, ultracentrifugação e fraccionação em gradiente de sacarose. Tomou-se a fracção com pico de absorvância a 280 nm; o grau de purificação foi testado por electroforese em gel de poliácridamida com a proteína nativa e com a proteína desnaturada (SDS-PAGE) associado a um padrão de pesos moleculares (LMW Calibration Kit, Phast-System, Pharmacia). Realizou-se ainda um teste de reactividade desta proteína com anti-RuBisCO pelo método de difusão dupla de Ouchterlony. A concentração de RuBisCO foi calculada a partir da medida de absorvância a 280 nm (A_{280}) na expressão (7), na qual 0.61 constitui o coeficiente de extinção molar da RuBisCO naquele comprimento de onda (Wishnick e Lane, 1971), e f é o factor da diluição utilizada, uma vez que as leituras deverão situar-se entre os valores de absorvância de 0.1 e 1.5.

$$A_{280} \times 0.61 \times f \text{ [mg cm}^{-3}\text{]} \quad (7)$$

A absorvância a 260 nm e a 280 nm deu também indicações do grau de pureza da proteína: $A_{280} / A_{260} = 1.89$; 1.9 é o valor dado por Wisnick e Lane (1971) para a enzima pura.

ii. Quantificação por métodos imunoenzimáticos

Os métodos imunológicos, em geral, têm permitido em diferentes áreas científicas o aperfeiçoamento de técnicas de purificação, de detecção e de quantificação de proteínas. Em particular, as técnicas imunoenzimáticas, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), possibilitam a quantificação simultânea de elevado número de amostras com grande sensibilidade, rapidez e reproducibilidade de análise (Ausubel *et al.*, 1990). No entanto, são escassas as referências na literatura à utilização de qualquer das diferentes configurações ELISA na quantificação da RuBisCO, talvez poucas mais que Horsenall (1984), Catt e Millard (1988), Demirevska-Kepova *et al.* (1990) e Metodiev e Demirevska-Kepova (1992).

Neste trabalho efectuou-se o doseamento da RuBisCO em extractos foliares por "rocket" imunolectroforese, tal como se descreve acima, mas atendendo aos elevados gastos de reagentes, nomeadamente de anticorpo e de antigene padrão, à morosidade e ao baixo rendimento do método (7 amostras por corrida), tentou-se a quantificação desta enzima em *Lupinus albus* por ELISA.

ELISA indirecto com anticorpos policlonais

Adoptou-se inicialmente o método descrito por Catt e Millard (1988). Trata-se de um ELISA indirecto, isto é o antigene é detectado indirectamente por um segundo anticorpo capaz de reconhecer o anticorpo específico para o antigene a quantificar. Este método é normalmente mais utilizado na despistagem e selecção de anticorpos

(Ausubel *et al.*, 1990). Utilizaram-se anticorpos policlonais anti-RuBisCO de *Medicago sativa* desenvolvidos em ovelha (P. Millard, Aberdeen) e RuBisCO padrão a partir da enzima de *L. albus* purificada.

Utilizaram-se extractos brutos e o método de extracção foi o descrito em 3.2.12. e usaram-se placas de fundo plano Microlon (Greiner, Friekenhausen). O procedimento está basicamente dividido em 5 fases:

1 - revestimento com o antigene: adicionou-se a cada poço das placas 100 mm³ de RuBisCO padrão ou de extracto diluídos em tampão carbonato (pH 9.6), duas réplicas de cada diluição; após incubação a 4°C durante 18 horas, as placas foram lavadas durante 5 minutos com TBS (pH 7.3) e vigorosamente sacudidas; repetiu-se a operação de lavagem 3 vezes .

2 - bloqueamento da capacidade de ligação residual: adicionou-se a cada poço 100 mm³ de tampão de bloqueamento constituído por TBS (pH 7.3), 0.05% (v/v) Tween 20 e 1% (m/v) BSA; incubação à temperatura ambiente durante 1 hora; lavagem como em 1 com TBS-Tween.

3 - adição do anti-RuBisCO: adicionou-se a cada poço 100 mm³ de anti-RuBisCO de soro de ovelha (P. Millard, Aberdeen) diluído 1:1000 com tampão de bloqueamento; incubação a 37°C em atmosfera húmida durante 2 horas; lavagem como em 2.

4 - adição do anticorpo conjugado: adicionou-se a cada poço 100 mm³ de IgG de soro anti-ovelha, obtido em burro, conjugada com fosfatase alcalina (Sigma Chem., Mo.); utilizaram-se três diluições 1:500, 1:1000, 1:2000 em tampão de bloqueamento; incubação a 37°C em atmosfera húmida durante 1 hora; lavagem como em 2.

5 - adição do substrato: adicionou-se a cada poço 100 mm³ de 9.7% dietanolamina (pH 9.8) com 0.1% p-nitrofenil fosfato (Sigma Chem., Mo); a actividade enzimática foi determinada por colorimetria a 405 nm num colorímetro de feixe vertical (Titertek Multiskan-Plus) que efectua leituras em toda a placa em cerca de 5 segundos, pelo que não se procedeu à interrupção do desenvolvimento da reacção, tendo sido efectuadas leituras de 10 em 10 minutos até se obterem valores máximos não superiores a 2 unidades de absorvância.

Os resultados iniciais indicaram alguns problemas metodológicos. Observaram-se valores demasiado elevados nos ensaios em branco, existia fraca sensibilidade de resposta às diferentes concentrações da enzima e ausência de linearidade de resposta às diluições utilizadas nos extractos, que apresentaram, independentemente da diluição, valores de absorvância demasiado baixos. Estes problemas poderiam resultar da existência no extracto de substâncias interferentes com a determinação e/ou devido a reacções não específicas do anti-RuBisCO.

A fig 3.1 apresenta os resultados dos efeitos da interferência do extracto na determinação da quantidade de RuBisCO e da competição pelos locais de ligação no poço entre diferentes proteínas. Para tal, efectuaram-se paralelamente três curvas padrão, uma apenas com o padrão, outra com padrão e extracto (adicionou-se o mesmo volume de extracto, na diluição final de 1:2000, às diferentes concentrações de padrão) e a terceira com padrão e BSA (adicionou-se BSA ao padrão de forma a obter em todas as diluições uma mistura proteica de 50% RuBisCO e 50% BSA).

Estes resultados mostram que o extracto interfere de algum modo com a determinação, sem que tenha ocorrido sobressaturação dos locais de ligação no poço, o que parece ocorrer apenas para concentrações superiores a 2 µg cm³ de proteína. As causas da interferência são desconhecidas, embora tenham sido testados alguns compostos utilizados no tampão de extracção, nomeadamente DTT e inibidores de

proteases que, na gama de concentrações utilizadas, mostraram não interferir com o método. Testou-se também a afinidade do anticorpo para a RuBisCO e para outras proteínas pelo método de Ouchterlony (difusão dupla). Obtiveram-se bandas muito ténues contra a RuBisCO purificada e, surpreendentemente, embora não reconhecessem a albumina bovina, observou-se uma banda bem demarcada contra a ovalbumina. As interferências pareciam, pois, relacionar-se com a fraca capacidade e especificidade dos anticorpos no reconhecimento da RuBisCO.

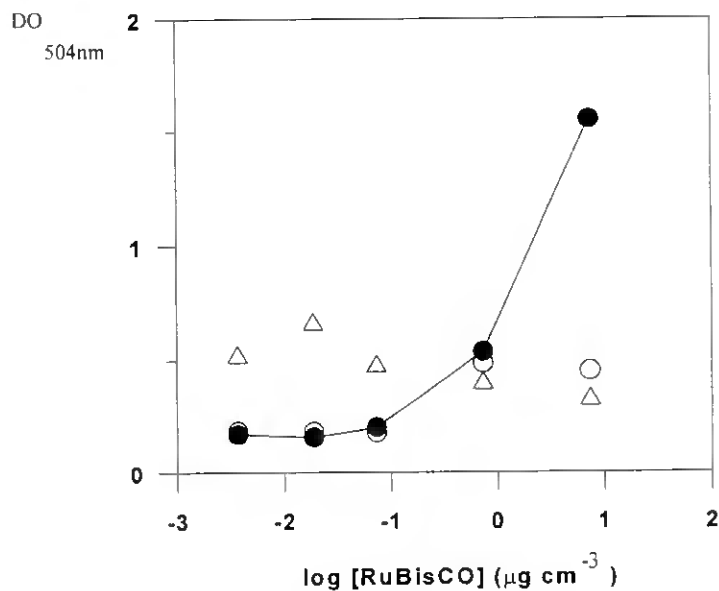


Fig. 3.1 Influência de um volume constante de extracto foliar adicionado ao padrão, e da competição pelos locais de ligação na placa, nas absorvâncias obtidas num ELISA indirecto (utilizando anti-corpos policlonais) para diferentes concentrações de RuBisCO purificada de *L. albus*. Valores correspondentes à curva padrão (●), de padrão+extracto foliar de *L. albus* (Δ), e de padrão+BSA (○).

ELISA directo com anticorpos policlonais

Numa outra série de experiências utilizaram-se anticorpos policlonais de soro de porco, anti-*RuBisCO* de tabaco (M. Stitt, Bayreuth), aplicados a um ELISA directo; por este método o reconhecimento do antigene é efectuado pelo próprio anticorpo conjugado. Procedeu-se à purificação parcial do soro e conjugação do anticorpo de acordo com a metodologia descrita por Ausubel *et al.* (1990). O procedimento do ELISA directo é idêntico ao indirecto suprimindo-se a fase 3.

A fig. 3.2 apresenta os resultados de uma das experiências realizadas com diferentes diluições de RuBisCO purificada (A) e com dois extractos foliares de *L. albus* (B). A sensibilidade do método aumentou para a RuBisCO purificada nas novas condições, mas manteve-se inadequada à quantificação daquela enzima em extractos foliares brutos.

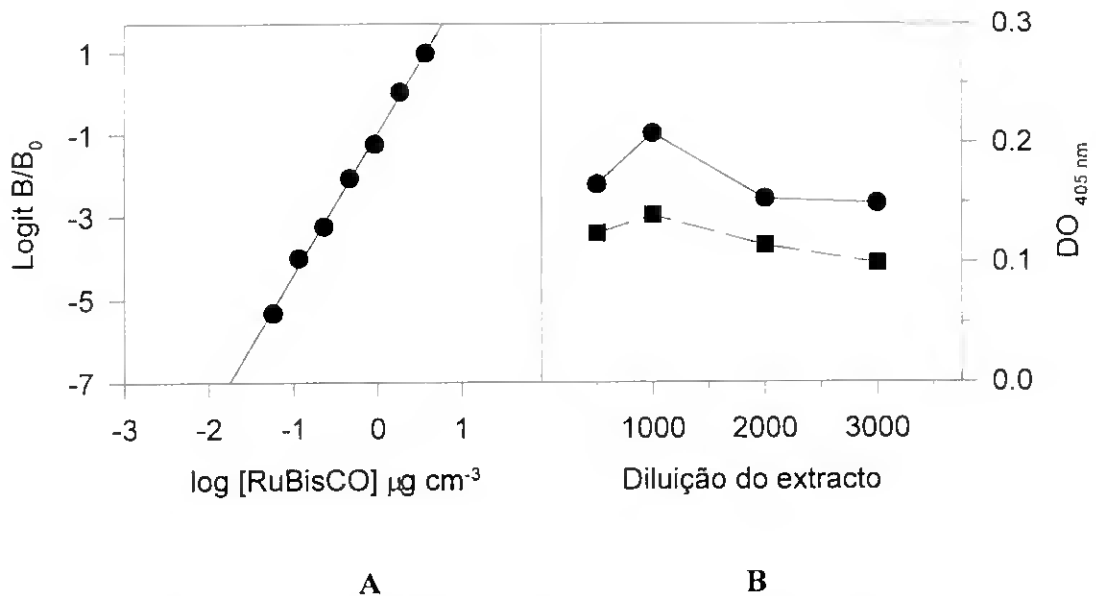


Fig. 3.2 Aplicação de ELISA directo na quantificação de RuBisCO, com a utilização de anticorpos policlonais. A - Resultados da curva padrão com RuBisCO purificada de *L. albus*: relação entre o Logit da percentagem de ligação (B/B_0), calculado a partir dos valores das absorvâncias (*), e as diferentes concentrações de RuBisCO ($r^2 = 0.99$, $p < 0.001$). B - Absorvâncias para diferentes diluições de dois extractos foliares de *L. albus*.

ELISA indirecto com anticorpos monoclonais

Na terceira série de experiências utilizaram-se anticorpos monoclonais anti-RuBisCO de trigo, obtidos em coelho (M. Paul, Rothamsted), na diluição de 1:10000, aplicados a ELISA indirecto; utilizou-se IgG anti-coelho conjugada a peroxidase (Sigma Chem., Mo) na diluição de 1:5000. A reacção enzimática desenvolve-se numa solução de tetrametilbenzidina (10mg cm³) em dimetilsulfóxido, diluída 1:100 em 0.1 M acetato de sódio (pH 5.8) e 0.006% peróxido de hidrogénio. As absorvâncias são medidas a 450 nm.

Os resultados da fig 3.3 mostraram que tanto a RuBisCO purificada como os extractos apresentam uma resposta linear numa larga gama de diluições (1:8x10⁴ - 1:1.3x10⁶).

A adição aos extractos de metade da quantidade de RuBisCO purificada utilizada na curva padrão permitiu determinar a zona de maior sensibilidade do método correspondente às recuperações na ordem dos 101% (± 3) e que se situaram na gama de diluições entre 1:1.6x10⁵ e 1:1.3x10⁶ (dados não apresentados).

(*) $\%(B/B_0) = (D.O. amostra - D.O. branco / D.O. max - D.O. branco) \times 100$

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

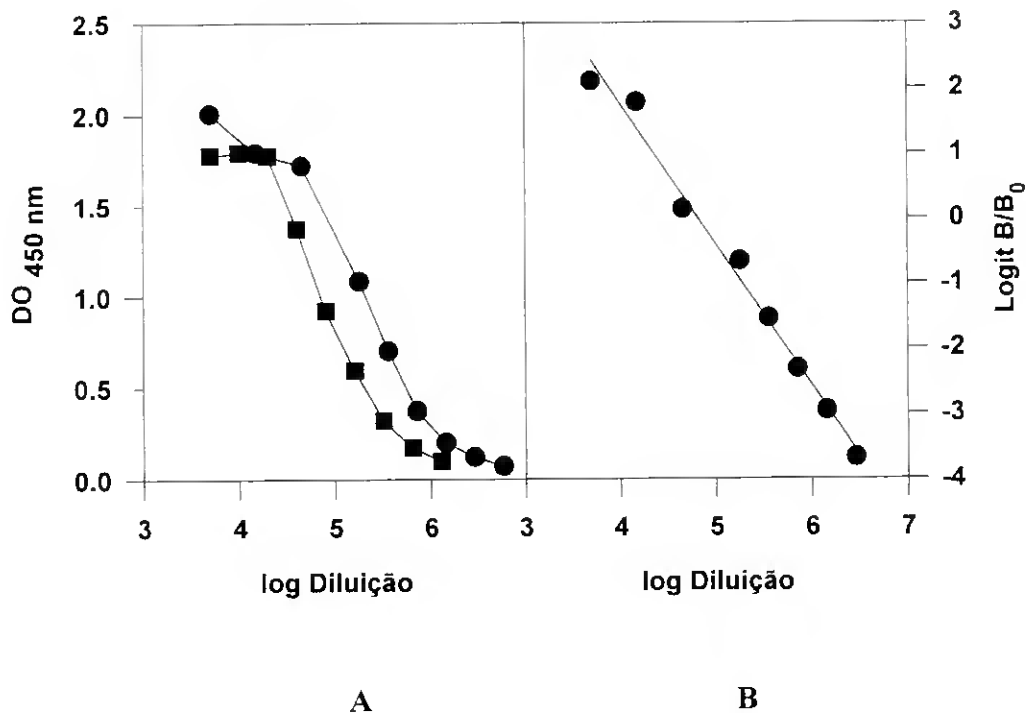


Fig. 3.3 Resultados da aplicação de um ELISA indirecto, utilizando anticorpos monoclonais, na quantificação de RuBisCO. A - Variação da absorvância em função de diferentes diluições de padrão (RuBisCO purificada de *L. albus* ●) e de extracto foliar de *L. albus* (■) B - Relação entre o Logit da percentagem de ligação à placa (B/B₀) e as diluições de padrão utilizadas ($r^2 = 0.98$, $p < 0.001$).

Atendendo aos problemas encontrados durante as tentativas de aplicação destas metodologias à quantificação da RuBisCO em extractos foliares brutos, não foi possível realizar atempadamente a sua aplicação efectiva nos ensaios desenvolvidos no âmbito deste trabalho. No entanto, os resultados obtidos com anticorpos monoclonais no ELISA indirecto, deixam prever a potencialidade da sua utilização na quantificação da RuBisCO em extractos brutos.

3.2.13 QUANTIFICAÇÃO DO AZOTO TOTAL

O azoto total em amostras foliares foi determinado pelo método de Kjeldahl (Kjeltec Auto 1030 Analyser, associado ao sistema de digestão Tecator, Suécia). Consiste na determinação, por titulação na presença de um indicador, da quantidade de amoníaco libertado, em condições alcalinas, do sulfato de amónio e que é fixado numa solução ácida. A quantidade de sulfato de amónio, por sua vez, resulta da conversão das formas azotadas presentes na amostra, após digestão em ácido sulfúrico concentrado por determinados catalisadores.

4. LIMITAÇÕES DA FOTOSSÍNTESE EM CONDIÇÕES DE SECURA DO SOLO. IMPORTÂNCIA RELATIVA DA COMPONENTE ESTOMÁTICA E NÃO-ESTOMÁTICA

4.1. EM FOLHAS RECENTEMENTE EXPANDIDAS

O conjunto de experiências realizadas no âmbito deste capítulo teve como principal objectivo avaliar a importância relativa da componente estomática e não estomática no decréscimo, induzido pelos défices hídricos, da taxa fotossintética de folhas recentemente expandidas de *Lupinus albus*. Apresentam-se também dados relativos a outras espécies (*Vitis vinifera* e *Eucalyptus globulus*) que ilustram alguma diversidade das respostas fotossintéticas às deficiências hídricas.

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Em Maio de 1989 foram realizadas duas séries de ensaios com *Lupinus albus* (I a 12-13 de Maio de 1989 e II a 16-18-19 de Maio de 1989) semeados respectivamente em Fevereiro e Março de 1989. As plantas, cultivadas em vasos de 10 dm³ com uma mistura de turfa e areia (1:3), até ao início do ensaio foram regadas diariamente e ferti-irrigadas semanalmente com solução nutritiva (Hoagland diluída 10x), e permaneceram ao ar livre nas instalações do ISA (Tapada da Ajuda, Lisboa).

O stress hídrico foi imposto num lote homogéneo de plantas interrompendo a rega durante alguns dias, até ser detectado um significativo encerramento dos estomas e decréscimo no potencial hídrico de madrugada, bem como sinais externos de deficiência hídrica - enrolamento dos folíolos e perda da consistência túrgida das folhas. A suspensão da rega resultou num ciclo de secura de 5 dias no ensaio I e de 6 dias no ensaio II.

Em cada ensaio efectuaram-se, ao longo do dia, as seguintes medições nas plantas regadas (testemunha), não regadas (stress) e nestas últimas após rega (rehidratadas): trocas gasosas em condições ambiente de CO₂ e de luz, ou a luz saturante, a temperatura e humidade relativa não controladas; capacidade fotossintética a luz e CO₂ saturantes; partição dos assimilados recentes; potencial hídrico e teor relativo em água foliar, medidos também de madrugada; em alguns casos determinou-se F_m/F_o a partir de medidas de fluorescência da clorofila *a*. Em todas as medições (com pelo menos três repetições) utilizaram-se folhas recentemente expandidas. Foram ainda recolhidas amostras para posterior determinação do teor em clorofila, em açúcares solúveis e em amido (ver MATERIAL E MÉTODOS). Uma parte dos resultados destes ensaios, nomeadamente os que dizem respeito aos açúcares não estruturais, são apresentados no capítulo 5 sobre os efeitos do stress hídrico no metabolismo fotossintético da sacarose e do amido.

Os dois ensaios realizados com o tremoceiro foram idênticos, mas pretendeu-se acompanhar no segundo (II) a evolução das deficiências hídricas. Nesse sentido, o ensaio foi realizado com plantas regadas e não-regadas sujeitas a um ciclo de stress hídrico de 6 dias; as medições foram efectuadas durante o 4º (stress hídrico moderado) e o 6º dia do ciclo (stress hídrico mais severo) e ainda no dia seguinte, depois de todas

as plantas terem sido regadas (16, 18 e 19 de Maio de 1989). As medições de trocas gasosas foram efectuadas a luz ambiente e a temperatura média das folhas stress e testemunha foi, respectivamente, de 32° C e 31° C, e com uma pequena diferença da temperatura média do ar (2° C) entre os dias de medições.

Foram ainda efectuadas medidas, em ensaios semelhantes aos do tremoceiro, em folhas completamente expandidas de videira e eucalipto. Utilizaram-se videiras (*Vitis vinifera*, cv. Rosaki), propagadas por estaca com um ano de enraizamento, em vasos de 9 dm³; as medições foram realizadas no 7º dia do ciclo de interrupção da rega e no dia seguinte após rehidratação (1 e 2 de Junho de 1989). No caso do eucalipto (*Eucalyptus globulus*) usaram-se plantas com um ano de idade, cultivadas em vasos de 4 dm³, e as medições foram efectuadas num único dia (12 de Junho de 1989) comparando plantas regadas com não regadas sujeitas a um ciclo de défice hídrico de cinco dias.

RESULTADOS

Tremoceiro (I)

Após 5 dias de imposição de stress hídrico, o potencial hídrico foliar nestas plantas manteve-se, ao longo do dia, cerca de 0.4 MPa inferior ao das plantas regadas e o teor relativo em água das folhas não decresceu abaixo de 68% (FIG. 4.1).

A condutância estomática pareceu responder, sobretudo a partir das 11:00 horas, ao aumento do défice de pressão de vapor entre o ar na câmara e a folha quer nas plantas regadas quer nas não regadas (FIG. 4.2). O decréscimo da condutância nas folhas de plantas sem limitações hídricas permitiu, no caso das plantas regadas, uma ligeira recuperação do estado hídrico foliar a partir das 14:00 horas, mas sem reflexo na taxa fotossintética que, nos dois grupos de plantas acompanhou o padrão da curva da condutância estomática.

As taxas de trocas gasosas, medidas a CO₂ ambiente e a luz saturante (2000 µmol quanta.m⁻².s⁻¹), foram substancialmente afectadas pelo défice hídrico, com decréscimos na taxa de fotossíntese aparente de cerca de 50% durante a manhã e de 70-80% à tarde (FIG. 4.2); a condutância estomática das plantas stress apresenta reduções superiores à inibição observada ao nível da fotossíntese, que se reflectem em valores calculados de p_i significativamente mais baixos.

Observou-se uma recuperação total do estado hídrico das folhas das plantas stress cerca de 12 horas depois de terem sido regadas (FIG. 4.3). Os estomas reabriram (FIG. 4.4) sem, no entanto, terem atingido os valores de condutância estomática das plantas testemunha, o que permite explicar a manutenção ao longo do dia de teores relativos em água e de potenciais hídricos foliares superiores aos das plantas testemunha. A taxa fotossintética recuperou quase totalmente, ocorrendo apenas durante o princípio da manhã e a meio do dia diferenças significativas relativamente às plantas regadas.

A FIGURA 4.5 apresenta os resultados da medição da capacidade fotossintética, isto é, a taxa de fotossíntese saturada pela luz e a concentrações de CO₂ elevadas (15%) de modo a ultrapassar a limitação estomática. A capacidade fotossintética das folhas das plantas não regadas não parece ter sido significativamente afectada.

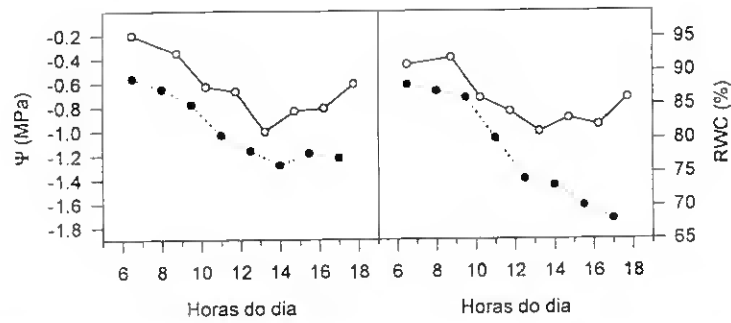


FIGURA 4.1 - Potencial hídrico (Ψ) e teor relativo em água (RWC), ao longo do dia 12.05.89, de folhas de plantas regadas (o) e não-regadas (•) de *L. albus*; os primeiros pontos do dia em cada parâmetro correspondem a medidas efectuadas de madrugada (detalhes das condições experimentais estão referidos no texto); médias de 4 determinações, erro padrão igual ou inferior à dimensão dos símbolos.

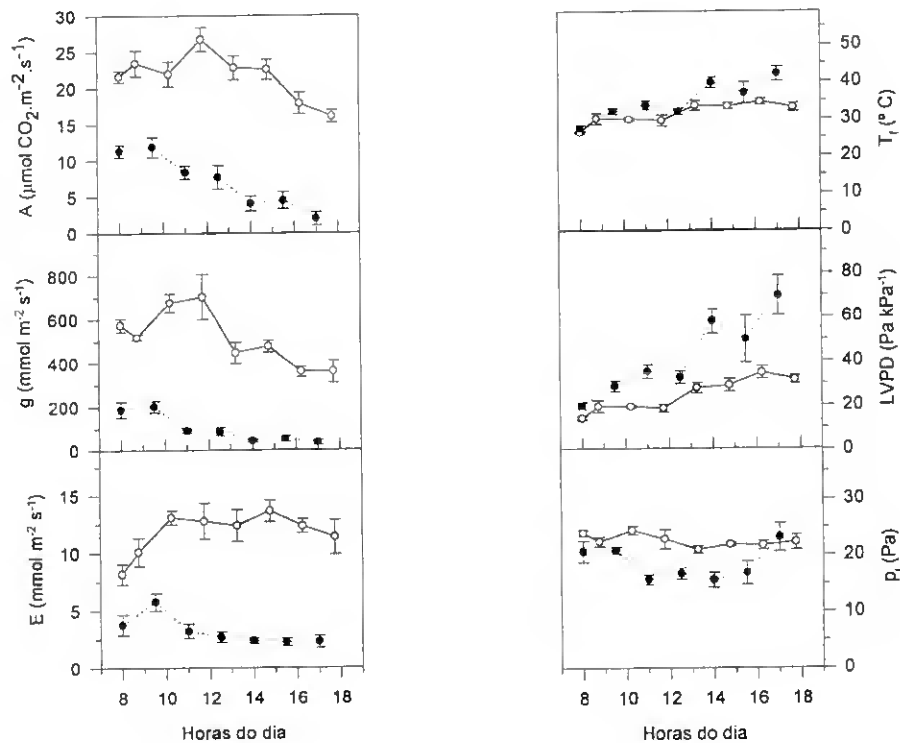


FIGURA 4.2 - Cursos diários da taxa de fotossíntese aparente (A), pressão parcial interna de CO_2 (p_i), temperatura da folha (T_f), taxa de transpiração (E), condutância estomática (g), e déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (LVPD) de plantas regadas (o) e não-regadas (•) de *L. albus*; medidas efectuadas em 12.05.89 a concentração ambiente de CO_2 e luz saturante (os detalhes experimentais estão referidos no texto); média \pm erro padrão, $n = 4$.

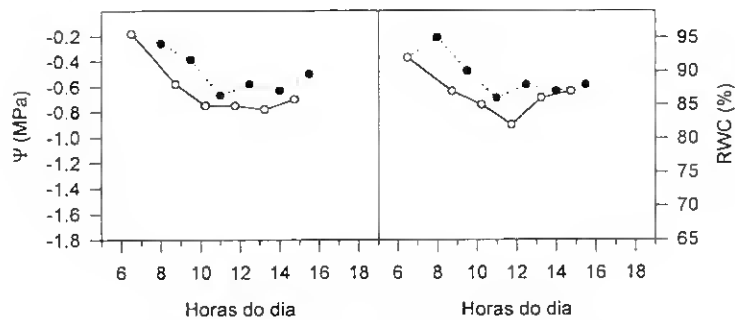


FIGURA 4.3 - Potencial hídrico (Ψ) e teor relativo em água (RWC), ao longo do dia 13.05.89, de folhas de plantas regadas, não submetidas a stress hídrico (o), e de plantas rehidratadas sujeitas a stress hídrico (\bullet), de *L. albus*; os primeiros pontos do dia em cada parâmetro correspondem a medidas efectuadas de madrugada; médias de 4 determinações, erro padrão igual ou inferior à dimensão dos símbolos.

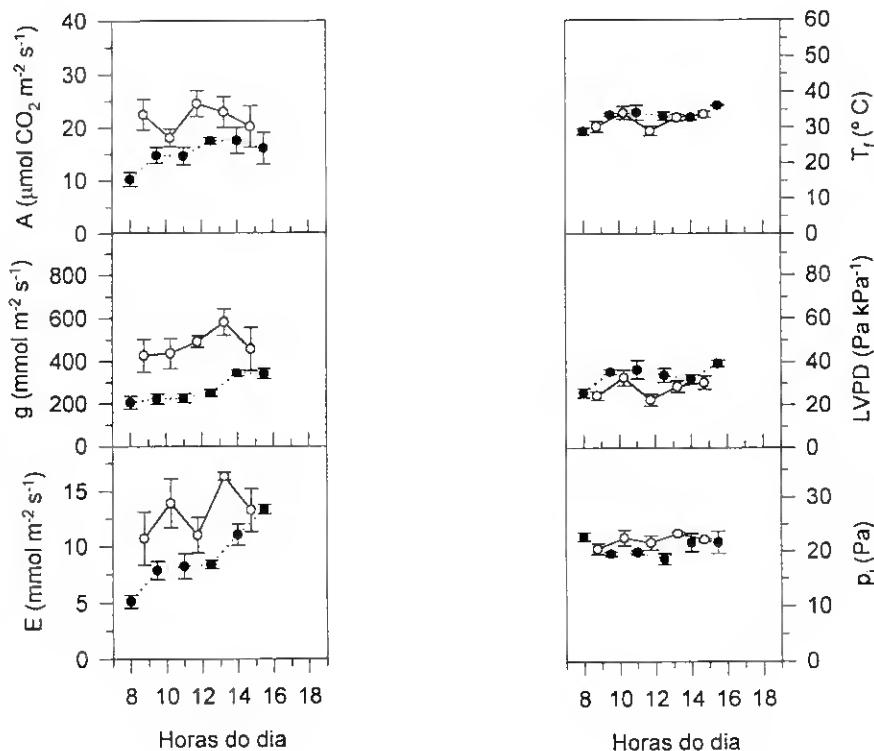


FIGURA 4.4 - Cursos diários da taxa de fotossíntese aparente (A), pressão parcial interna de CO_2 (p_i), temperatura da folha (T_f), taxa de transpiração (E), condutância estomática (g), e déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (LVPD) de plantas regadas não submetidas a stress hídrico (o), e de plantas rehidratadas sujeitas a stress hídrico (\bullet) de *L. albus*; medidas efectuadas a 13.05.89 a concentração ambiente de CO_2 e luz saturante; média \pm erro padrão, $n = 4$.

Os resultados das trocas gasosas e da capacidade fotossintética sugerem uma importante limitação estomática para a fotossíntese nas condições testadas.

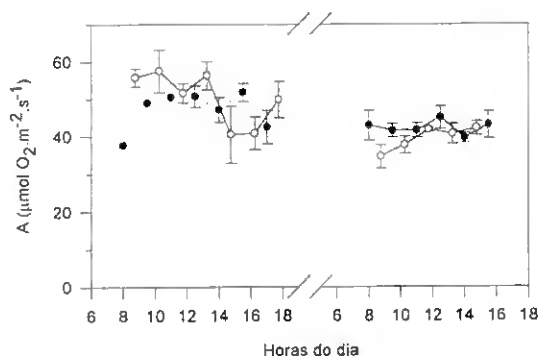


FIGURA 4.5 - Capacidade fotossintética medida, ao longo do dia, em discos foliares de plantas regadas (o) e de plantas submetidas a stress hídrico (●) e no dia seguinte após a rehidratação destas últimas, de *L. albus*. As medições foram efectuadas a $950 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a 15% de CO_2 ; médias \pm erro padrão, $n = 3$.

Tremoceiro (II)

No 4º dia do ciclo de stress as plantas não-regadas apresentaram potenciais hídricos foliares cerca de 0.2 MPa inferiores ao das plantas testemunha. O teor relativo em água mínimo das folhas ao longo do dia foi nas plantas em stress e regadas, respectivamente, de 71% e de 75% (FIG. 4.6).

Contudo a taxa de fotossíntese aparente das plantas stress decresceu significativamente: 32% de manhã e 70% pelas 14 horas (FIG. 4.7). Também a condutância estomática, a taxa de transpiração e os valores estimados de p_i diminuíram relativamente às plantas regadas. Nas plantas em stress A , g e p_i diminuíram ao longo da manhã; ao fim do dia ocorreu uma pequena recuperação de g e das trocas gasosas que se reflectiu também nos valores de estimados de p_i .

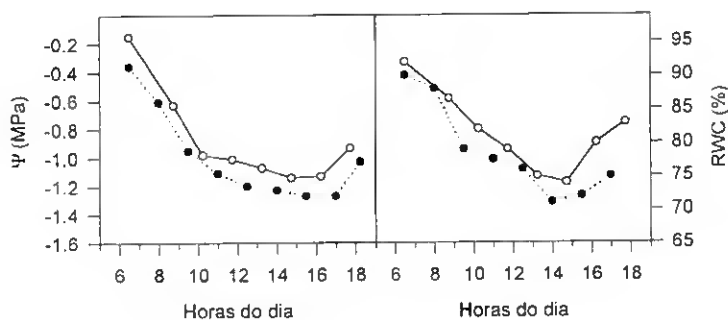


FIGURA 4.6 - Potencial hídrico (Ψ) e teor relativo em água (RWC), ao longo do dia 16.05.89, de folhas de plantas regadas (o) e não-regadas (●) de *L. albus*; os primeiros pontos do dia em cada parâmetro correspondem a medidas efectuadas de madrugada; médias de 4 determinações, erro padrão igual ou inferior à dimensão dos símbolos.

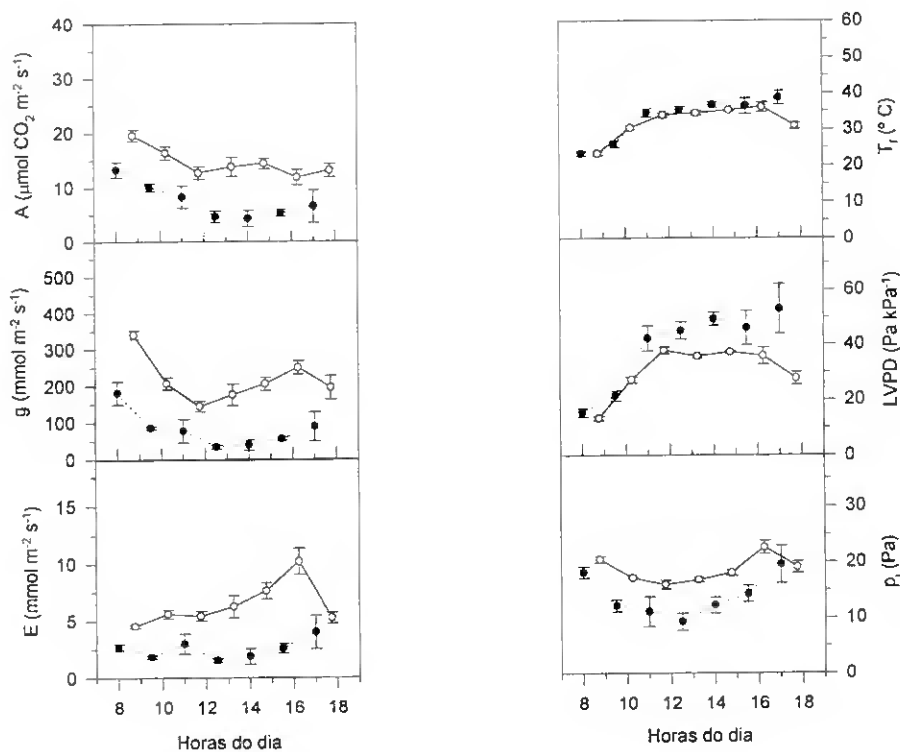


FIGURA 4.7 - Cursos diários da taxa de fotossíntese aparente (A), pressão parcial interna de CO₂ (p_i), taxa de transpiração (E), condutância estomática (g), déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (LVPD) de plantas regadas (o) e não-regadas (•) de *L. albus*; medidas efectuadas a 16.05.89, em condições de luz (PAR) e de CO₂ ambiente; média ± erro padrão, n = 3.

No 6º dia do ciclo de stress as diferenças nos parâmetros hídricos das folhas dos dois tratamentos acentuaram-se (FIG. 4.8) e as plantas em stress apresentaram ao fim do dia um teor relativo em água foliar de 63%.

Os estomas foram fechando a partir do início da manhã quer nas plantas regadas quer nas stress. Estas últimas apresentaram, logo a partir das 9:00 horas, valores muito baixos de condutância estomática (FIG. 4.9). A fotossíntese foi severamente inibida nas plantas não regadas que, à excepção das primeiras horas da manhã, apresentaram valores de fixação de CO₂ em condições ambiente correspondentes a apenas 28% dos das plantas regadas, e p_i significativamente inferiores. No fim da tarde, contrariamente ao que ocorreu no 4º dia, não se observou nenhuma recuperação, quer da condutância estomática, quer das taxas de trocas gasosas das folhas em stress.

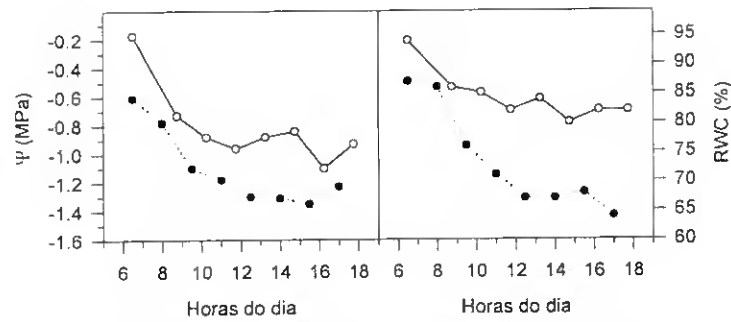


FIGURA 4.8 - Potencial hídrico (Ψ) e teor relativo em água (RWC), ao longo do dia 18.05.89, de folhas de plantas regadas (o) e não-regadas (•) de *L. albus*; os primeiros pontos do dia em cada parâmetro correspondem a medidas efectuadas de madrugada; médias de 4 determinações, erro padrão igual ou inferior à dimensão dos símbolos.

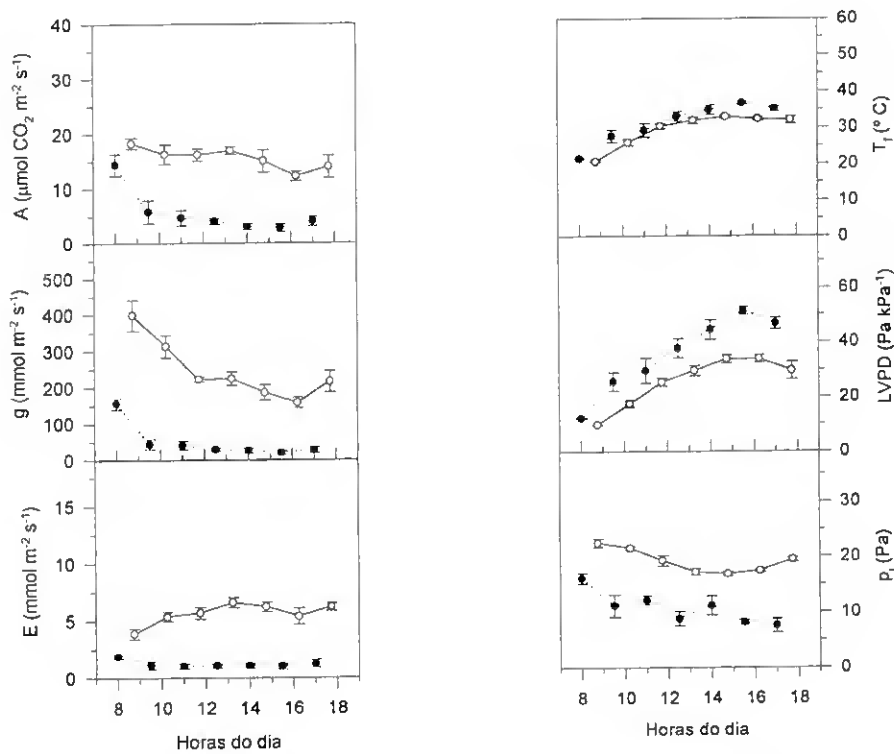


FIGURA 4.9 - Cursos diários da taxa de fotossíntese aparente (A), pressão parcial interna de CO₂ (p_i), taxa de transpiração (E), condutância estomática (g), défice de pressão de vapor entre a folha e o ar (LVPD) de plantas regadas (o) e não-regadas (•) de *L. albus*; medidas efectuadas a 18.05.89, em condições de luz (PAR) e de CO₂ ambiente; média \pm erro padrão, $n = 3$.

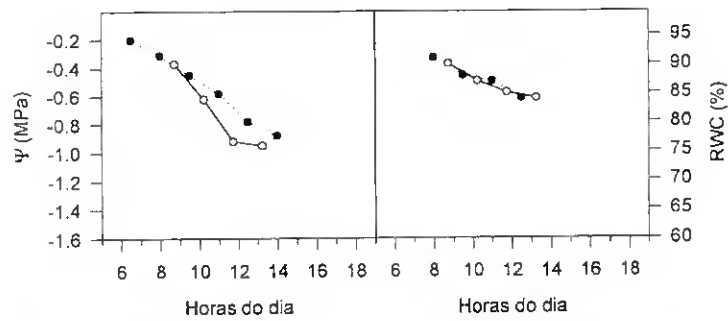


FIGURA 4.10 - Potencial hídrico (Ψ) e teor relativo em água (RWC), ao longo do dia 19.05.89, de folhas de plantas regadas, não submetidas a stress hídrico (o), e de plantas reidratadas sujeitas a stress hídrico (\bullet), de *L. albus*. Os primeiros pontos do dia em cada parâmetro correspondem a medidas efectuadas de madrugada; médias \pm erro padrão, $n = 4$.

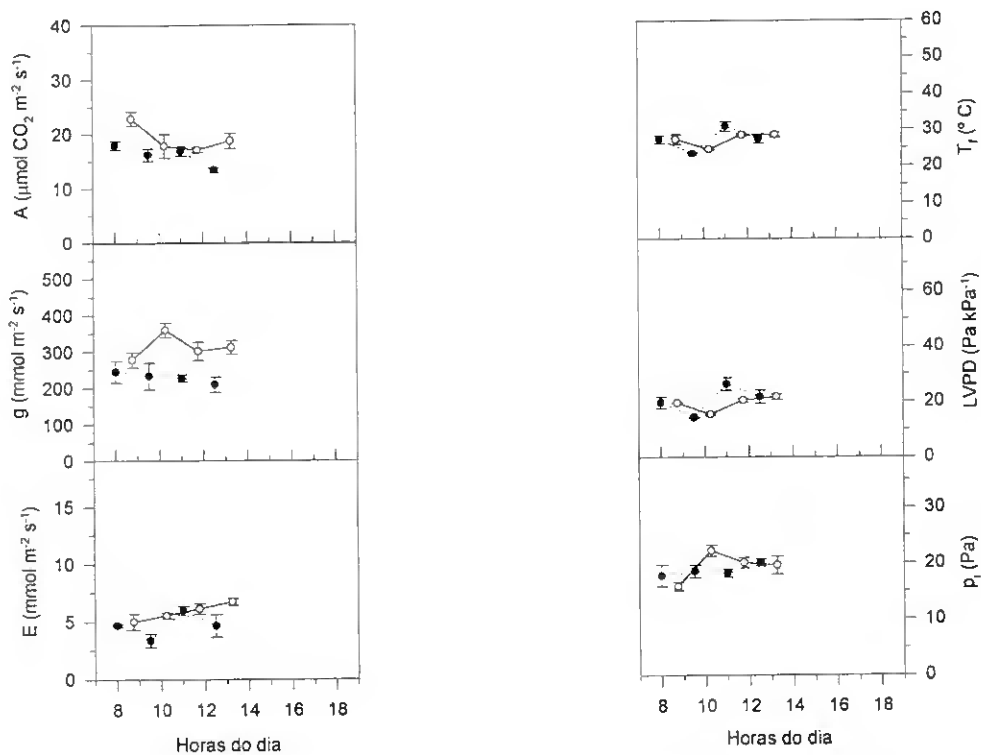


FIGURA 4.11 - Cursos diários da taxa de fotossíntese aparente (A), pressão parcial interna de CO_2 (p_i), taxa de transpiração (E), condutância estomática (g) e défice de pressão de vapor entre a folha e o ar (LVPD), de plantas regadas não submetidas a stress hídrico (o), e de plantas reidratadas sujeitas a stress hídrico (\bullet) de *L. albus*. Medidas efectuadas a 19.05.89, em condições de luz (PAR) e de CO_2 ambiente; média \pm erro padrão, $n = 3$.

Ao fim da tarde do 6º dia as plantas stress foram regadas e o estado hídrico foliar recuperou completamente no 7º dia (FIG. 4.10). Os estomas das plantas em stress reabriram apesar de manterem uma pequena diferença relativamente às plantas testemunha (FIG. 4.11). Esta diferença pode ser atribuída ao facto das condutâncias terem sido superiores nas plantas regadas relativamente aos anteriores dias de medições. A taxa de fixação de CO₂ recuperou quase completamente e o p_i não foi significativamente diferente entre os dois grupos de plantas.

A capacidade fotossintética manteve-se relativamente constante ao longo dos dias de medições e não se observaram diferenças entre os tratamentos (FIG. 4.12). Estes resultados, aliados aos das trocas gasosas em condições naturais, nomeadamente o decréscimo na pressão parcial interna de CO₂ que acompanha as baixas condutâncias estomáticas, vêm, tal como no ensaio anterior, evidenciar a importância do encerramento dos estomas na inibição da fotossíntese em condições de stress hídrico.

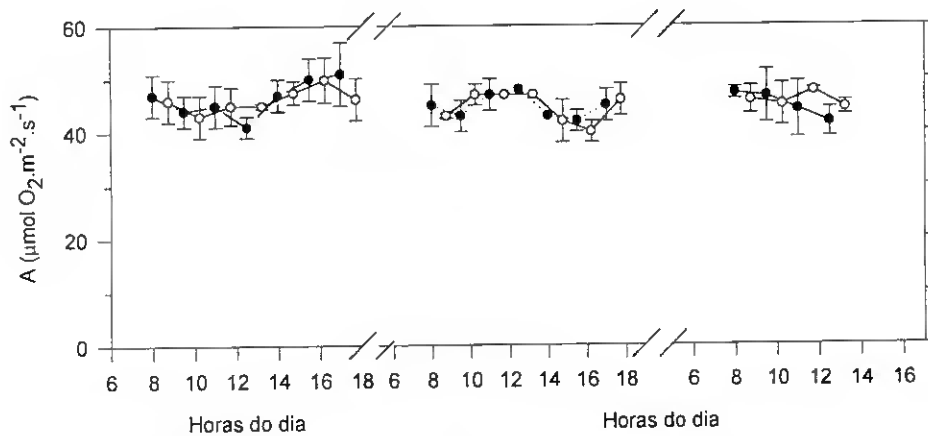


FIGURA 4.12 - Capacidade fotossintética medida, ao longo do dia, em discos foliares de plantas regadas (o) e de plantas submetidas a stress hídrico (●) e no dia seguinte após a rehidratação destas últimas (RH), de *L. albus*. As medições foram efectuadas a 950 μmol quanta m⁻² s⁻¹ e a 15% de CO₂; médias ± erro padrão, n = 3.

Videira

No 7º dia do ciclo de interrupção da rega o potencial hídrico de madrugada nas folhas das plantas stress foi 1 MPa inferior ao das plantas regadas, mas o teor relativo em água permaneceu superior a 90% (FIG. 4.13); estes parâmetros recuperaram completamente após rehidratação para valores semelhantes ou superiores aos dos das plantas regadas.

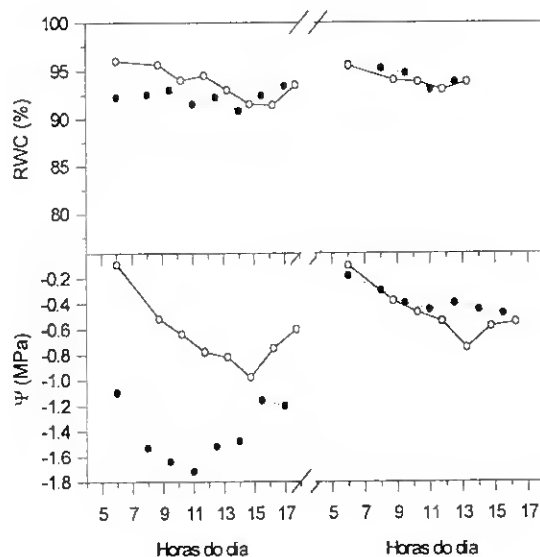


FIGURA 4.13 - Potencial hídrico (Ψ) e teor relativo em água (RWC), ao longo de dois dias consecutivos, de folhas de plantas regadas, não submetidas a stress hídrico (o), de plantas de *V. vinifera* cv. Rosaki sujeitas a stress hídrico (•), e nestas, no dia seguinte, depois de rehidratadas; os primeiros pontos do dia em cada parâmetro correspondem a medidas efectuadas de madrugada; médias de 4 determinações, erro padrão igual ou inferior à dimensão dos símbolos.

A taxa fotossintética em condições ambiente de CO_2 , tal como a condutância estomática, diminuiu ao longo do dia nas plantas regadas (FIG. 4.13), enquanto que nas plantas stress, com os estomas quase encerrados a partir do início da manhã, a fixação de CO_2 foi quase nula; os valores estimados de p_i para as plantas stress são semelhantes aos dos das plantas regadas no início da manhã tornando-se significativamente superiores durante a tarde.

A capacidade fotossintética das videiras regadas foi diminuindo ao longo do dia aproximando-se dos valores das plantas stress que apresentaram taxas três a quatro vezes mais baixas, mas relativamente constantes (FIG. 4.14). A razão F_m/F_o diminuiu ao longo do dia nos dois grupos de plantas indicando a ocorrência de fotoinibição (FIG. 4.14).

As plantas em stress depois de rehidratadas continuaram a apresentar valores de condutância estomática e taxas de fixação do CO_2 inferiores aos das plantas testemunha (Fig. 4.13), No entanto a capacidade fotossintética recuperou durante o período de rehidratação apresentando valores ao longo do dia que se aproximam do padrão diário característico das plantas regadas (Fig. 4.14).

O facto dos valores calculados de p_i serem superiores nas plantas stress relativamente às regadas poderia constituir um indicador da limitação da fotossíntese ao nível do mesófilo, contudo, e como já referi (ver CAP.2), este parâmetro é estimado a partir do pressuposto de que a transpiração e a fotossíntese é uniforme na área foliar medida e só neste caso ele traduz o comportamento fotossintético do mesófilo.

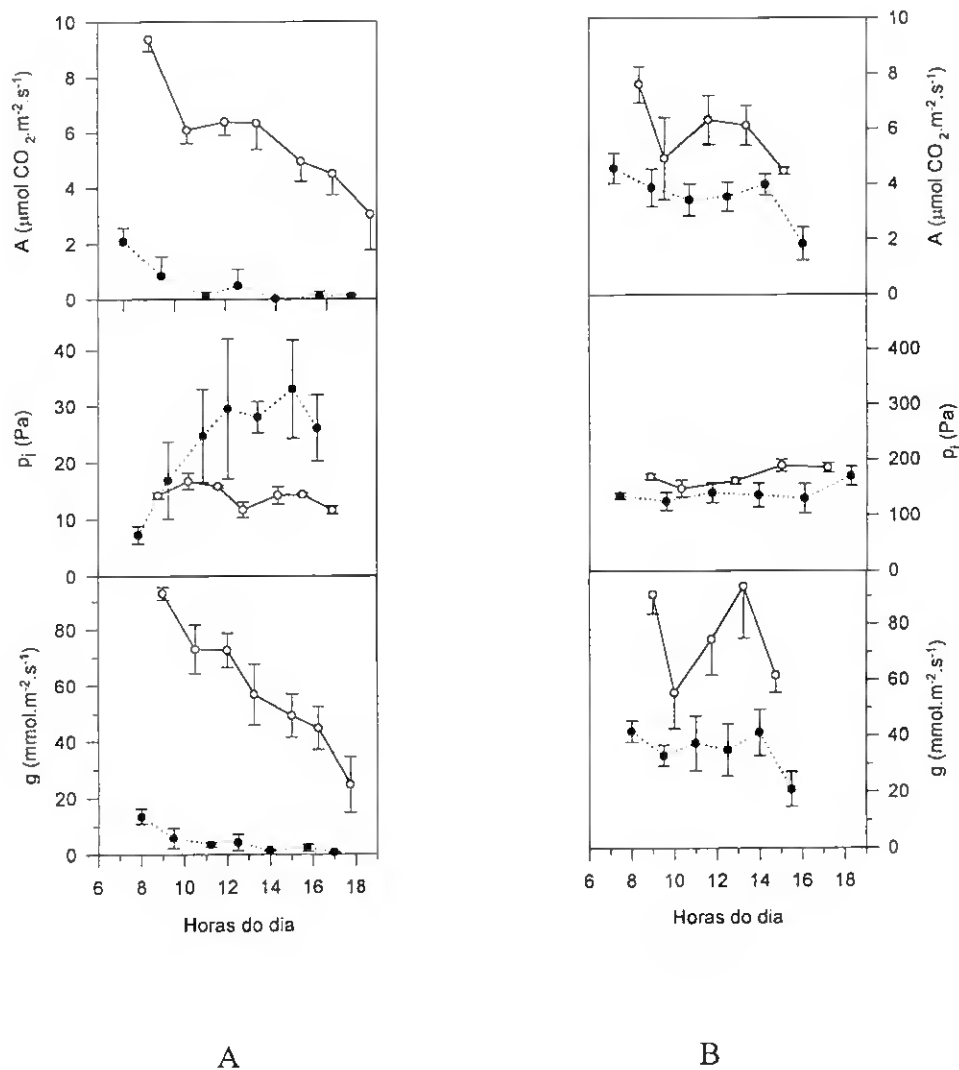


FIGURA 4.13 - Cursos diários da taxa de fotossíntese aparente (A), pressão parcial interna de CO_2 (p_i), e condutância estomática (g_s), de plantas de *V. vinifera* cv. Rosaki regadas não submetidas a stress hídrico (o), de plantas sujeitas a stress hídrico (•), e nestas, no dia seguinte depois de rehidratadas. Medidas efectuadas a 1.06.89 (A) e 2.06.89 (B), em condições naturais de luz (irradiância PAR média ao longo do dia $1690 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e de CO_2 , temperatura média da folha ao longo do dia 31°C (± 3.2). Os valores são médias (\pm erro padrão) de 3 determinações.

Os resultados parecem indicar que para esta espécie a inibição pelo stress hídrico da fotossíntese em condições de CO_2 ambiente deverá estar associada não só ao encerramento dos estomas mas também a efeitos ao nível do metabolismo fotossintético, em conjugação com os efeitos interactivos do stress hídrico com elevadas irradiâncias conducentes a uma disfunção fotoinibitória que se observou também nas plantas sem limitações hídricas.

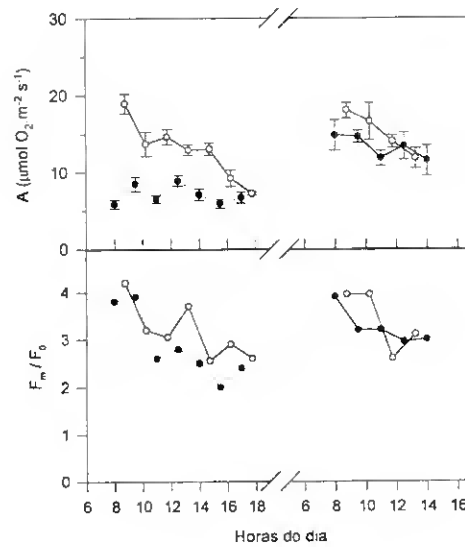


FIGURA 4.14 - Capacidade fotossintética (A) e a razão da fluorescência da clorofila inicial máxima e basal (F_m/F_0), determinadas em dois dias consecutivos em discos foliares de plantas de *V. vinifera* cv. Rosaki regadas, não submetidas a stress hídrico (o), de plantas sujeitas a stress hídrico (●), e nestas, no dia seguinte, depois de rehidratadas; média \pm erro padrão, $n = 3$.

Eucalipto

A diferença de potencial hídrico foliar de madrugada entre as plantas regadas e não regadas durante cinco dias foi de 2.2 MPa. O teor relativo em água nas folhas das plantas stress atingiu os 63% enquanto que nas das regadas se manteve ao longo do dia entre os 80% e os 90% (FIG. 4.15).

Nas plantas regadas a taxa fotossintética a CO_2 ambiente foi diminuindo ao longo do dia paralelamente com a condutância estomática e acompanhada de um pequeno decréscimo nos valores de p_i durante a tarde (FIG. 4.16). Nas plantas stress as condutâncias estomáticas foram extremamente baixas e a taxa fotossintética apresenta um padrão diário semelhante ao da condutância estomática, com valores quase nulos durante a tarde. Parece observar-se uma tendência para o aumento de p_i nas folhas stress relativamente às testemunha, apesar das diferenças não serem estatisticamente significativas (à excepção de um dos pontos do início da tarde).

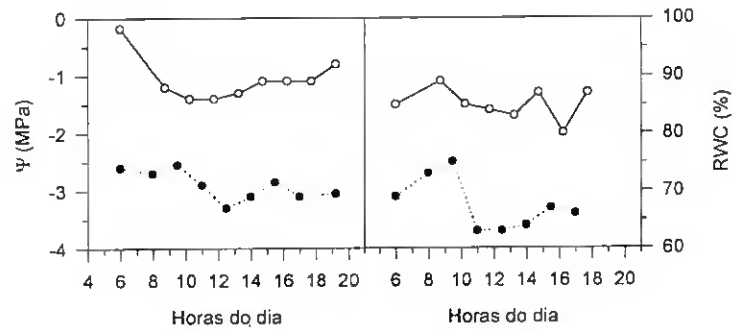


FIGURA 4.15 - Potencial hídrico (Ψ) e teor relativo em água (RWC), ao longo do dia de folhas de plantas de *E. globulus* regadas (o), e de plantas sujeitas a stress hídrico (●); os primeiros pontos do dia em cada parâmetro correspondem a medidas efectuadas de madrugada; médias \pm erro padrão, $n = 4$.

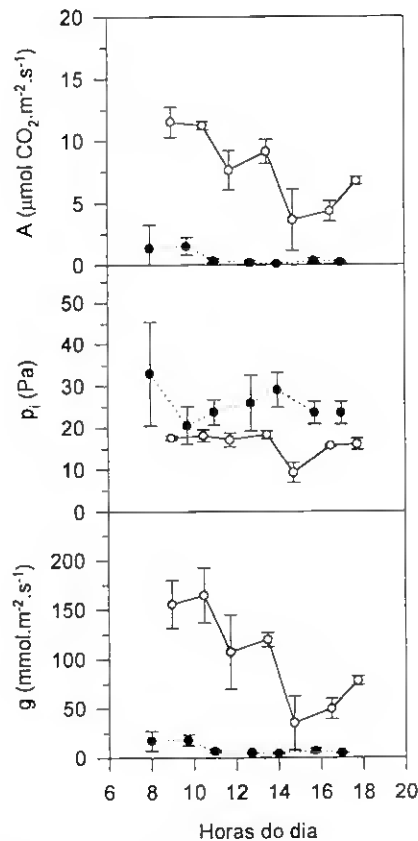


FIGURA 4.16 - Cursos diários da taxa de fotossíntese aparente (A), pressão parcial interna de CO_2 (p_i), e condutância estomática (g), de plantas regadas (o), e de plantas sujeitas a stress hídrico (●), de *E. globulus*; medidas efectuadas a 12.06.89, em condições de naturais de luz (irradiância PAR média ao longo do dia $1790 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e de CO_2 , temperatura média da folha ao longo do dia $34.5 \text{ }^\circ\text{C}$ (± 4.6); média \pm erro padrão, $n = 3$.

A capacidade fotossintética foi semelhante para os dois grupos de plantas durante a manhã, mas a partir do meio-dia observou-se uma pequena diferença devido ao facto das plantas regadas apresentarem um acentuado aumento da taxa fotossintética que é incipiente nas plantas stress (Fig. 4.17). No entanto, a capacidade fotossintética não diminui ao longo do dia nas folhas stress embora apresentassem durante a tarde os teores relativos em água mais baixos (cerca de 65%).

Para esta espécie o conjunto destes resultados parece indicar que, tal como no tremoço, a inibição fotossintética induzida pelos défices hídricos é sobretudo consequência do funcionamento estomático.

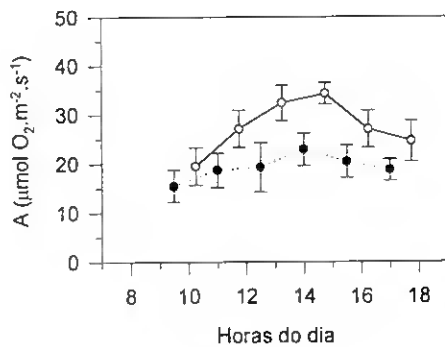


FIGURA 4.17 - Capacidade fotossintética determinada em discos foliares de plantas regadas (o) e não regadas durante cinco dias (●) de *E. globulus*; média \pm erro padrão, n = 3.

DISCUSSÃO

No conjunto destes ensaios, realizados em dias de céu limpo que não ofereciam limitações à fotossíntese ao nível da irradiância, o curso diário de fixação de CO_2 nas plantas sem limitações hídricas acompanha o da condutância estomática e, ou se mantem em valores relativamente constantes ao longo do dia, ou a partir de um valor máximo de manhã vai decrescendo à medida que aumenta o défice de pressão de vapor entre a folha e o ar, e/ou devido à interacção com elevadas irradiâncias conducentes, como no caso da videira, a efeitos fotoinibitórios.

Nas plantas sujeitas a stress hídrico, mesmo que moderado, a fotossíntese aparente é fortemente inibida, apresentando também um curso diário que, tal como nas plantas regadas, acompanha o da condutância estomática, mas que não se correlaciona com o potencial hídrico das folhas. Por exemplo, no caso de *Lupinus* em stress moderado (I), apesar da pequena diferença observada no estado hídrico das folhas das plantas regadas e não regadas, a taxa de fotossíntese aparente nas não regadas reduziu-se a metade. Por outro lado, nestas plantas, ocorreu por vezes uma ligeira recuperação do estado hídrico das folhas no fim da tarde (quer no Ψ , quer no RWC) que não se verificou nem na fotossíntese nem na condutância estomática. O facto da abertura estomática não se correlacionar com o potencial hídrico das folhas está de acordo com os estudos de outros autores que sugerem que o funcionamento dos estomas nas plantas com limitações hídricas depende sobretudo do teor em água do solo adjacente às raízes e é mediado por sinais químicos produzidos nas raízes e

transmissíveis à parte aérea (Passioura, 1988; Zhang e Davies, 1989; Saab e Sharp, 1989; Gowing *et al.*, 1990; Correia e Pereira, 1994; Correia *et al.*, no prelo).

A taxa de fotossíntese a CO_2 ambiente relaciona-se não linearmente com a condutância estomática (FIG. 4.18); a taxa de assimilação do CO_2 será independente da condutância estomática acima do valor para o qual a regeneração da RuBP constitui o factor limitante. Para baixas condutâncias estomáticas a taxa fotossíntese é limitada pelo p_i passando a depender das características cinéticas da RuBisCO (Farquhar e Sharkey, 1982; Stitt *et al.*, 1991b) devido a limitações impostas pelo fecho dos estomas na concentração intercelular do CO_2 , directamente, como substrato, ou indirectamente, limitando a carbamilação daquela proteína pela RuBisCO activase, como sugere Sage *et al.* (1990).

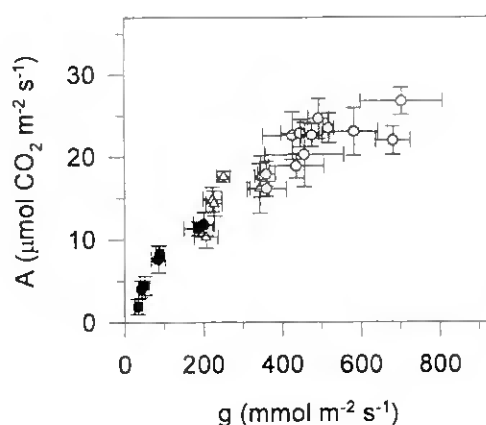


FIGURA 4.18 - Taxa de fotossíntese aparente (A) em função da condutância estomática (g) correspondentes aos dados das FIG. 4.2 e 4.4, em plantas de *L. albus* regadas (o), em stress hídrico (•) e nestas depois de reidratadas (Δ). Curva ajustada a uma regressão de 2º grau ($r^2 = 0.94$, $p < 0.001$).

Para espécies como o *L. albus* e o *E. globulus* a abertura estomática parece ser a mais importante limitação à fotossíntese em condições de stress hídrico. Ultrapassada esta limitação (a luz e a CO_2 saturantes) os cursos diários e as taxas de fotossíntese das folhas de plantas em défice hídrico são idênticos (caso do tremeçoireiro), ou pouco diferentes (caso do eucalipto) das das folhas de plantas bem hidratadas. Estes resultados estão genericamente de acordo com os de outros autores (Kaiser 1982; 1987; Dietz e Heber, 1983) que, para condições diversas de supressão da limitação estomática, concluem não haver efeitos directos não-estomáticos dos défices hídricos na capacidade fotossintética para teores relativos em água dos tecidos superiores a valores entre 70% e 50%.

No eucalipto a capacidade fotossintética mantém-se, ou aumenta até um pouco ao longo do dia, apesar dos decréscimos observados nos teores relativos em água. Estes resultados não são de estranhar pois o valor mínimo de RWC atingido foi superior ao défice hídrico crítico para o qual podem ocorrer danos irreversíveis ao nível do cloroplasto (Kaiser, 1987). Também Pereira *et al.* (1992) não observaram alterações significativas na capacidade fotossintética em árvores de *E. globulus* com cerca de três anos e meio de idade durante a estação seca em condições de campo (Ψ

foliar, de madrugada: -0.63 MPa e meio do dia: -2.18 MPa), relativamente a árvores ferti-irrigadas durante todo o período de crescimento (Ψ foliar, de madrugada: -0.1 MPa e a meio do dia: -0.76 MPa).

Se admitirmos que para o eucalipto a componente estomática constitui uma limitação importante à fotossíntese a concentrações de CO_2 ambiente, o facto da capacidade fotossintética (determinada a concentrações muito elevadas de CO_2) das folhas stress não igualar a das plantas testemunha poderá corresponder a ajustamentos coordenados da maquinaria bioquímica do metabolismo fotossintético do carbono a condições de menor consumo de fotoassimilados impostas pelos défices hídricos. Esta hipótese de regulação poderia envolver a actividade da RuBisCO - via razão ATP/ADP e RubisCO activase (Portis, 1990) ou via concentração da RuBP (Woodrow e Berry, 1988) - ou envolver a actividade de outras enzimas do metabolismo fotossintético do carbono, associadas a alterações do balanço source-sink (Stitt, 1991). Permanecem por esclarecer se mecanismos adaptativos de "down-regulation", como os propostos por Stitt (1991) ou Wise *et al.* (1990), poderão desenvolver-se em situações de stress relativamente rápido, como o deste ensaio, ou se só deverão ocorrer em situações de campo, em que os défices hídricos se vão estabelecendo lentamente.

No caso da videira os valores de p_i calculados para as folhas stress são superiores aos das folhas das plantas regadas. Como já referi a determinação deste parâmetro a partir de medições de trocas gasosas tem conduzido a interpretações precipitadas quanto à contribuição relativa das componentes estomática e não estomática no decréscimo da fotossíntese em condições de défice hídrico. O p_i apenas traduz o comportamento fotossintético do mesófilo se a transpiração e a fotossíntese forem uniformes na área foliar medida. A videira é uma das várias espécies em que foi observada a ocorrência de encerramento estomático não uniforme em condições de stress hídrico (Downton *et al.*, 1988). No entanto, devido ao método de detecção da heterogeneidade estomática utilizado por estes autores (exposição a $^{14}\text{CO}_2$, p_a de cerca de 30 Pa e autoradiografia), permanecem, neste caso, algumas dúvidas se se poderá atribuir exclusivamente à heterogeneidade estomática a ocorrência de fotossíntese não-uniforme ou se a capacidade fotossintética do mesófilo é também inibida ou *down-regulated* (Terashima, 1992).

Na videira a capacidade fotossintética é 3 a 4 vezes menor nas plantas stress do que nas testemunha. Para esta espécie a inibição fotossintética em condições de CO_2 ambiente e de stress hídrico deverá estar associada não só ao encerramento dos estomas mas também a efeitos ao nível do metabolismo fotossintético e a que se sobrepõem os efeitos de uma grande susceptibilidade à fotoinibição demonstrada por esta espécie, até mesmo nas plantas sem limitações hídricas (Correia *et al.*, 1990). Chaves *et al.* (1992) também observaram no tremoceiro que a intensidade de défice hídrico para a qual ocorrem efeitos inibidores da actividade fotossintética do mesófilo depende da temperatura. Os resultados daquele estudo mostraram que a capacidade fotossintética de folhas com um RWC de 95% já era significativamente afectada para a temperatura de 35°C.

No tremoceiro a recuperação das taxas fotossintéticas não é completa após um dia de rehidratação, apesar das plantas apresentarem taxas de recuperação superiores à da videira. O grau de recuperação pode estar relacionado com o facto do défice hídrico ter afectado componentes ao nível do mesófilo cujos efeitos, embora não sejam completamente irreversíveis, são de "reparação" mais lenta (Bewley e

Krochko, 1982) e que poderão resultar de efeitos da própria rehidratação (e não da desidratação *per se*) na permeabilidade das membranas (Kaiser, 1987a). Por outro lado, pode também estar relacionado com o atraso observado na reabertura dos estomas. Correia e Pereira (1994) observaram no tremoço a manutenção de concentrações apoplásticas elevadas de ABA em folhas de plantas reidratadas que justificavam o atraso na reabertura estomática após rehidratação.

Conclui-se que há diferenças entre espécies no que respeita a importância relativa da componente estomática e não-estomática na inibição da fotossíntese em condições de secura do solo. A limitação imposta pela condutância estomática é talvez a mais importante restrição à actividade fotossintética em condições de stress hídrico pouco severo e não muito prolongado. No entanto, para algumas espécies (*e.g.* videira) ou em condições ambientais em que interajam outros tipos de stress (elevadas irradiâncias e temperaturas) sobrepoem-se à limitação estomática outras situadas ao nível da actividade do mesófilo.

4.2. EM FOLHAS DE DIFERENTES IDADES FISIOLÓGICAS

Os efeitos dos défices hídricos nas taxas de trocas gasosas e na capacidade fotossintética estudados ao nível de folhas recentemente expandidas não podem ser directamente extrapolados para a avaliação dos efeitos na planta inteira. Há indicações de que alguns efeitos do stress hídrico são dependentes da idade da folha, por exemplo, na sensibilidade relativa da divisão e expansão celulares (Randall e Sinclair, 1988) ou no funcionamento estomático (Correia, 1993) ou, ainda, na composição proteica (Reviron *et al.*, 1992) e no padrão de senescência das folhas (Ludlow, 1975).

Com o objectivo de avaliar os efeitos da desidratação lenta do solo na regulação da actividade fotossintética ao nível da planta inteira realizou-se um estudo em folhas de diferentes idades fisiológicas de *Lupinus albus*.

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Os tremoceiros foram semeados em Novembro de 1989, em vasos de 10 dm³ com uma mistura de turfa e areia (1:3). As plantas foram regadas periodicamente até ao início dos ensaios com solução nutritiva (Hoagland diluída 10x) e permaneceram em abrigo nas instalações do ISA (Tapada da Ajuda). O stress hídrico foi induzido num lote homogéneo de plantas interrompendo a rega durante 9 dias (stress moderado) e 14 dias (stress severo), enquanto que para as plantas testemunha se manteve o regime de rega diário; as medições foram iniciadas a 12 de Fevereiro de 1990, quando foram detectadas diferenças significativas na condutância estomática entre os tratamentos e prolongaram-se até dia 21 de Fevereiro.

As folhas foram marcadas no início do ciclo de stress de acordo com as classes de idade que pretendíamos estudar, em função do respectivo índice de plastócrono - LPI (Erickson e Michelini, 1957; Vendeland *et al.*, 1982) - e que correspondiam a folhas jovens em expansão (LPI 1), folhas recentemente expandidas (LPI 5), e folhas adultas não-senescentes (LPI 9). No dia anterior a cada ensaio e para cada uma das folhas marcadas era determinado o LPI real; assim, os LPI indicados nas figuras e resultados são sempre os LPI reais, mas que correspondiam às folhas que no início do ciclo de stress eram LPI 1, 5 e 9.

As medições foram efectuadas em dias diferentes para cada tratamento: 12 e 13 para as plantas em stress moderado e plantas testemunha; dia 19 e 20 para as plantas em stress severo e plantas testemunha; dia 21 para as plantas em stress severo rehidratadas. Nas plantas testemunha (C), com défice hídrico, moderado (SM) ou severo (S), e nestas depois de regadas (RH), foram efectuadas as medições de: taxas de trocas gasosas e condutância estomática, a CO₂ ambiente e em condições controladas de luz (750 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), de temperatura (para uma temperatura média da folha de 20° C) e de humidade (LVPD de 10 Pa kPa⁻¹); capacidade fotossintética; potencial hídrico e teor relativo em água das folhas de madrugada e a meio do dia. A meio do dia foram ainda colhidas amostras foliares para quantificação de clorofilas, proteína solúvel, azoto total e açúcares não estruturais. Alguns resultados deste ensaio, nomeadamente os respeitantes aos teores foliares em açúcares não estruturais, são apresentados no capítulo seguinte (CAP. 5).

RESULTADOS

O potencial hídrico de madrugada das plantas em stress severo foi de -0.63 MPa, -0.58 MPa e -0.54 MPa respectivamente para as folhas de LPI 13, 9 e 5, enquanto que as folhas das plantas regadas, testemunha ou rehidratadas, apresentaram valores superiores a -0.29 MPa (TABELA 4.I). O teor relativo em água das folhas em stress foi sempre superior a 75%, cerca de 10% inferior ao RWC mínimo observado nas plantas regadas (TABELA 4.I). Entre idades há diferenças significativas no teor relativo em água apenas a meio do dia: nas plantas regadas o RWC das folhas LPI 5 (mais jovens) é inferior ao das LPI 9 e 13; nas plantas em stress hídrico severo o RWC das folhas LPI 5 e 9 é inferior ao da folha LPI 13 (mais velha); e em stress moderado as folhas intermédias (LPI 9) apresentam os RWC mais elevados mas não são significativamente diferentes nem das mais jovens (LPI 5), nem das mais velhas (LPI 13). Esta última apresenta teores relativos em água significativamente superiores aos das folhas mais jovens (LPI 5).

TABELA 4.I - Potencial hídrico e teor relativo em água medidos de madrugada (PD) e a meio do dia (MD) em folhas de diferentes idades fisiológicas (LPI) de plantas regadas (C), não regadas durante 9 (SM) ou 14 dias (S), e rehidratadas (RH) de *Lupinus albus*; média \pm erro padrão, n = 4; médias em cada idade significativamente diferentes entre si (p < 0.05; teste de TUKEY) são assinaladas com letras diferentes.

LPI	TRATAM.	Ψ PD (MPa)	RWC PD (%)	Ψ MD (MPa)	RWC MD (%)
5	C	-0.10 \pm 0.07 a	92.0 \pm 0.6 a	-0.57 \pm 0.05 a	87.1 \pm 1.0 a
	SM	-0.13 \pm 0.04 a	90.4 \pm 2.6 a	-0.31 \pm 0.26 a	84.9 \pm 1.9 a
	S	-0.54 \pm 0.13 b	81.0 \pm 1.0 b	-0.89 \pm 0.07 b	75.4 \pm 1.2 b
	RH	-0.24 \pm 0.09 c	89.4 \pm 0.9 a	-0.34 \pm 0.12 a	84.5 \pm 1.2 a
9	C	-0.21 \pm 0.03 a	92.7 \pm 0.5 a	-0.57 \pm 0.04 a	90.4 \pm 0.6 a
	SM	-0.19 \pm 0.03 a	92.6 \pm 2.5 a	-0.59 \pm 0.11 a	88.0 \pm 1.7 a
	S	-0.58 \pm 0.06 b	87.2 \pm 1.2 b	-0.91 \pm 0.06 b	81.5 \pm 0.8 b
	RH	-0.18 \pm 0.04 a	92.0 \pm 0.6 a	-0.43 \pm 0.10 a	89.4 \pm 0.9 a
13	C	-0.19 \pm 0.01 a	95.7 \pm 0.6 a	-0.56 \pm 0.04 a	93.5 \pm 0.5 a
	SM	-0.18 \pm 0.02 a	94.7 \pm 0.7 a	-0.56 \pm 0.07 a	91.1 \pm 1.6 a
	S	-0.63 \pm 0.05 b	88.5 \pm 1.6 b	-0.87 \pm 0.08 b	83.9 \pm 1.6 b
	RH	-0.29 \pm 0.13 a	93.4 \pm 0.8 a	-0.46 \pm 0.15 a	92.1 \pm 1.1 a

Apesar da condutância estomática ter diminuído de forma significativa à medida que o déficit hídrico foi progredindo, a taxa de fixação de CO₂ por unidade de área foliar só foi significativamente inibida para as folhas LPI 9 (Fig. 4.19). A ausência de inibição fotossintética, sobretudo nas folhas mais velhas, poderá ser apenas aparente já que nas plantas em stress é muito acentuado o aumento da massa foliar por unidade de área (TABELA 4.II). Nestas condições ocorre uma maior concentração de clorofila na área foliar amostrada (TABELA 4.II) e, conseqüentemente, uma sobrevalorização da taxa fotossintética expressa em função da área.

A reabertura dos estomas das plantas stress rehidratadas não foi idêntica nos três tipos de folhas, tendo sido mais rápida nas folhas de idade fisiológica intermédia, LPI 9, que mesmo assim apresentaram valores de condutância estomática semelhantes aos das correspondentes em stress moderado (FIG. 4.19).

TABELA 4.II - Massa foliar por unidade de área e teor em clorofila de folhas de diferentes idades (LPI) de plantas regadas (C), em stress hídrico (S) e rehidratadas (RH) de *Lupinus albus* L., determinados em discos foliares; médias \pm erro padrão, n = 4.

LPI	TRATAM.	LMA (g.m ⁻²)	CLOR. (g.m ⁻²)
5	C	30.5 \pm 0.9	0.382 \pm 0.024
	S	35.8 \pm 0.5	0.432 \pm 0.014
	RH	32.7 \pm 1.2	0.346 \pm 0.014
9	C	33.5 \pm 1.3	0.403 \pm 0.020
	S	34.6 \pm 1.7	0.448 \pm 0.014
	RH	30.4 \pm 2.3	0.367 \pm 0.022
13	C	32.9 \pm 0.7	0.351 \pm 0.036
	S	34.8 \pm 2.7	0.363 \pm 0.027
	RH	31.5 \pm 1.8	0.329 \pm 0.024

Nas condições de déficit hídrico severo a capacidade fotossintética diminuiu cerca de 45% nas folhas de diferentes idades, mesmo quando expressa em função da área foliar (FIG. 4.20). Após rehidratação a capacidade fotossintética das folhas em stress mais velhas LPI 13 não recuperou, ao contrário das folhas LPI 5 e 9 que recuperaram cerca de 50% da inibição induzida pelo déficit hídrico, quando a capacidade fotossintética é expressa em função da área, e cerca de 90% quando expressa em função do azoto foliar (FIG. 4.20).

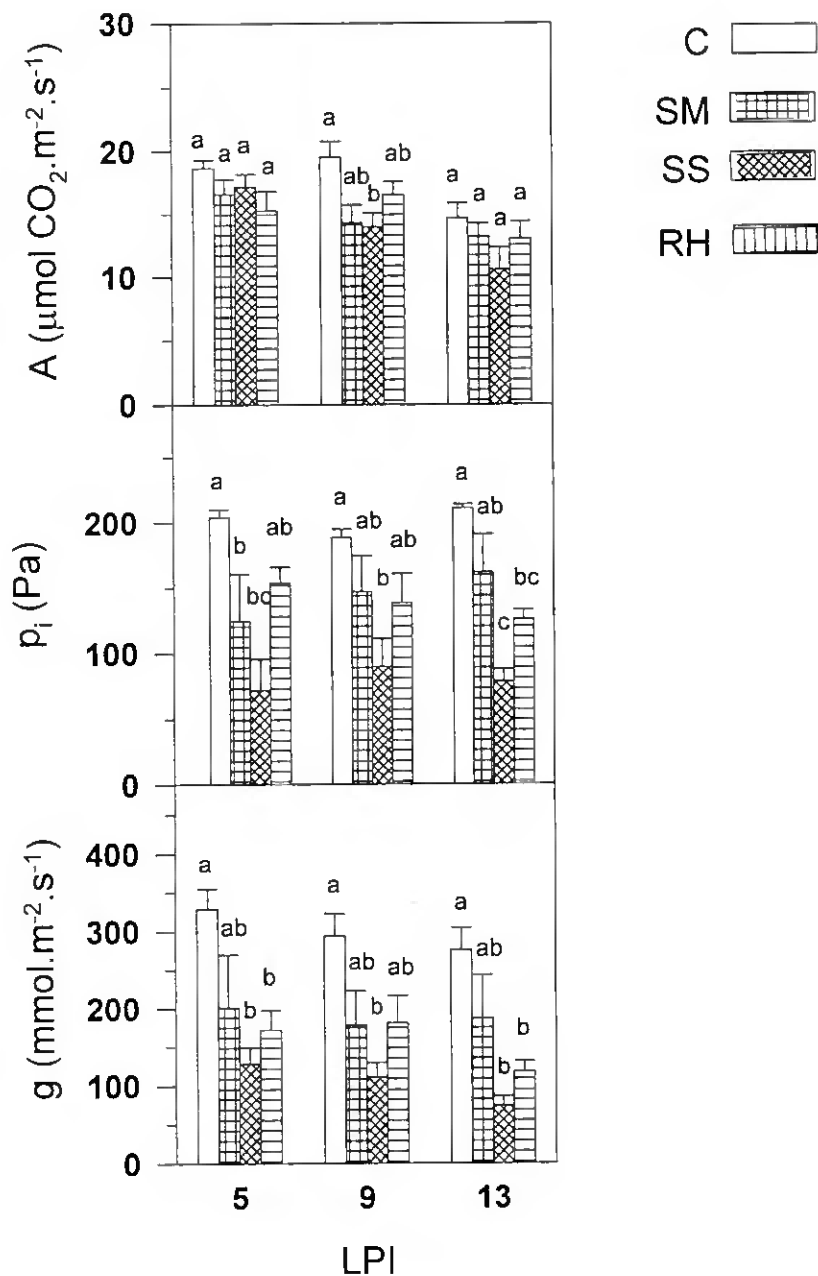


FIGURA 4.19 - Taxa de fotossíntese aparente (A), condutância estomática (g) e pressão parcial interna de CO_2 (p_i) de folhas de diferentes idades fisiológicas (LPI) determinadas em plantas de *Lupinus albus* L. regadas (C), não regadas durante 9 dias (SM) ou 14 dias (S), e rehidratadas (RH); valores médios (\pm erro padrão) de 3 medições efectuadas a concentração ambiente de CO_2 , a irradiância de $750 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, LVPD de 10 Pa kPa^{-1} e temperatura média da folha de 20°C ; médias em cada idade significativamente diferentes entre si ($p < 0.05$; teste de TUKEY) são assinaladas com letras diferentes.

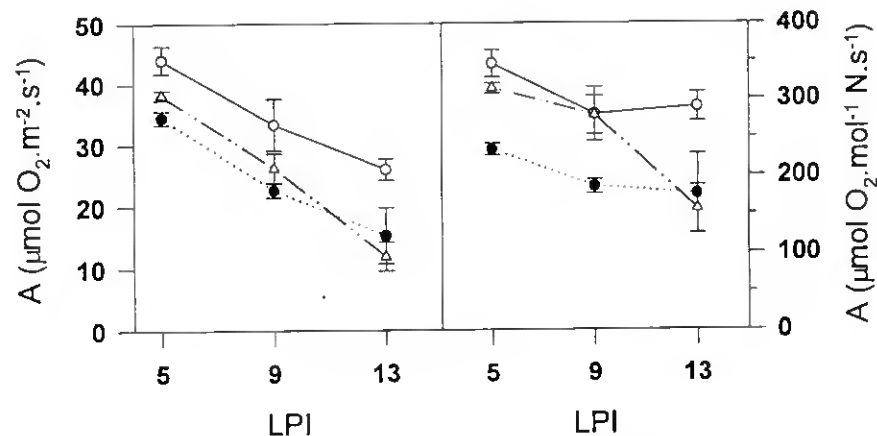


FIGURA 4.20 - Taxa de evolução fotossintética de O_2 (A) em condições de luz e de CO_2 saturantes de folhas de diferentes idades fisiológicas (LPI), de plantas de *L. albus* regadas (o), não regadas durante 14 dias (●) e nestas depois de reidratadas (Δ), expressa em função da área foliar e do teor foliar em azoto; média \pm erro padrão, $n = 4$.

O teor em azoto das folhas em stress hídrico severo diminuiu um pouco se expresso em função da massa foliar seca; se expresso em função da área esse decréscimo só se verificou nas folhas mais velhas, LPI 13 (TABELA 4.III). Depois de reidratadas observaram-se decréscimos no teor em azoto, independentemente das unidades em que está expresso e da idade da folha. No entanto, aquele decréscimo foi menos acentuado nas folhas mais jovens, LPI 6.

TABELA 4.III - Azoto total em folhas de diferentes idades fisiológicas (LPI) de plantas regadas (C), em stress hídrico severo (S) e reidratadas (RH) de *L. albus*; os valores são médias (\pm erro padrão) de 4 amostras constituídas por duas folhas (sem pecíolos) de nós sucessivos.

LPI	TRATAM.	N FOLIAR ($mg\ g^{-1}\ m.s.$)	N FOLIAR ($mmol\ m^{-2}$)
6	C	58.3 ± 0.7	127 ± 2
	S	57.7 ± 1.9	148 ± 5
	RH	52.0 ± 1.1	122 ± 3
9	C	49.9 ± 1.0	119 ± 2
	S	49.4 ± 2.7	122 ± 7
	RH	43.5 ± 1.3	94 ± 3
13	C	38.2 ± 1.4	90 ± 3
	S	35.1 ± 2.3	87 ± 6
	RH	34.0 ± 1.3	77 ± 3

DISCUSSÃO

Nos estudos anteriores a capacidade fotossintética foi pouco afectada pela imposição de um rápido stress hídrico, enquanto neste ensaio componentes fotossintéticos do mesófilo foram afectados por um stress hídrico de maior duração. Porque as plantas neste ensaio cresceram em abrigo, foi possível induzir mais lentamente os défices hídricos ao longo de 14 dias, em contraste com os 6 dias do ensaio de 1989 (ver SECÇÃO 4.1), apesar do grau de severidade atingido ser pouco superior. Os potenciais hídricos e os teores relativos em água foliares de madrugada foram, no mesmo tipo de folhas, respectivamente de -0.6 MPa e 87% em 1989, de -0.54 MPa e 81% em Fevereiro de 1990. O facto da diferença no potencial hídrico não acompanhar a do teor relativo em água poderá dever-se a diferenças no módulo de elasticidade das paredes celulares associadas a diferenças na idade das plantas e nas condições de crescimento (Zimmermann, 1978).

A taxa de fotossíntese em condições de CO₂ ambiente foi inibida nas plantas stress e sobretudo nas folhas mais velhas que apresentam condutâncias estomáticas muito baixas. O padrão acrópeto de encerramento dos estomas em resposta aos défices hídricos é comum (Turner, 1974; Lawlor e Milford, 1975). Em muitos casos, durante o envelhecimento das folhas, há variação paralela da condutância da folha e da taxa fotossintética no ar saturada pela luz (Field, 1987), embora também tenham sido observadas variações não-paralelas (Davies *et al.*, 1977). Thomas *et al.* (1991) demonstraram que a ausência de resposta da condutância estomática e da fotossíntese às variações na concentração de CO₂ nas folhas mais velhas de *Nicotiana glauca* não resultam da incapacidade dos estomas responderem à concentração de CO₂. Os estomas em epidermes destacadas retêm essa capacidade de resposta, mas ao nível da folha a regulação da abertura estomática não parece depender apenas dos aumentos de p_i associados ao declínio da actividade fotossintética das folhas à medida que envelhecem, mas de outros factores externos às células guarda. Do ponto de vista estrutural, à medida que a folha envelhece, as células guarda mantêm-se funcionais por mais tempo do que as células do mesófilo (Zeiger e Schwartz, 1982).

Neste ensaio, relativamente aos anteriores, observou-se uma pequena redução na taxa fotossintética a CO₂ ambiente. Os valores correspondentes às folhas com maior défice hídrico poderão estar sobrevalorizados devido ao aumento da massa foliar por unidade de área (LMA). Estas alterações no LMA devem-se à perda de turgidez dos tecidos e também ao possível aumento na espessura (Cutler, 1977) e na maior contribuição dos hidratos de carbono para as paredes celulares (Freedden *et al.*, 1991). Por outro lado consideraram-se conjuntamente os dados respeitantes às plantas regadas apesar de terem decorrido 7 dias entre as medições correspondentes a cada nível de stress hídrico. As taxas de assimilação medidas nas plantas sem limitações hídricas no dia 12 de Fevereiro (testemunha do stress moderado), foram superiores aos medidos no dia 19 (testemunha do stress severo). Atendendo à duração do ciclo de imposição do stress, as alterações fisiológicas associadas ao desenvolvimento da planta podem sobrepor-se aos efeitos do tratamento. Peng e Krieg (1991) observaram no algodeiro reduções na taxa fotossintética da planta inteira que não podiam ser atribuídas a decréscimos na área foliar mas ao facto da taxa fotossintética de folhas da mesma idade fisiológica decrescer ao longo do ciclo de desenvolvimento da cultura.

Como acima referi, os resultados destes ensaios sugerem que a duração do stress hídrico pode induzir alterações nos componentes fotossintéticos do mesófilo.

Estas modificações podem situar-se ao nível do cloroplasto ou do citosol e resultaram num decréscimo, independente da idade, na capacidade das folhas realizarem fotossíntese a taxas elevadas, em condições não limitantes de luz e de CO₂. Mesmo assim, a condutância estomática parece constituir uma limitação importante já que o aumento relativo na eficiência do uso da água das plantas em stress (dados não apresentados) foi cerca de 3 vezes superior ao decréscimo da capacidade fotossintética. O ajustamento metabólico às condições de défice hídrico reflectiu-se também na lentidão de resposta à rehidratação, embora tenha sido mais rápida a recuperação nas folhas mais novas. A inibição fotossintética ao nível do mesófilo poderá ser atribuída a efeitos ao nível da quantidade e/ou actividade das enzimas do cloroplasto ou do citosol (Kaiser, 1983a; 1987a) devidos a alterações na expressão genética (Guerrero *et al.*, 1990; Bartholomew *et al.*, 1991) ou na concentração de metabolitos e de solutos. Este tipo de alterações estão associados quer ao ajustamento osmótico, observado nesta espécie em condições idênticas de limitação hídrica (Turner *et al.*, 1987; Correia, 1993) quer à redução do volume dos protoplastos imposta pela desidratação (Kaiser, 1982). Apesar de não terem sido efectuadas medições da actividade fotoquímica das folhas em stress, efeitos a este nível poderão ser excluídos porque está actualmente bem documentado que as reacções fotoquímicas e o transporte electrónico são muito tolerantes aos défices hídricos (Chaves, 1991; Cornic *et al.*, 1992).

Folhas de diferentes idades são constituintes de um todo, sujeito a modificações degenerativas controladas do padrão de desenvolvimento e de senescência natural, ao qual se sobrepõem os efeitos dos défices hídricos. As folhas de tremoceiro sem limitações hídricas apresentaram taxas máximas de fotossíntese cada vez menores à medida que vão envelhecendo. O stress hídrico parece não ter alterado o padrão acrópeto de senescência foliar (Gulmon e Chu, 1982; DeJong e Doyle, 1985): as folhas em stress mais velhas apresentaram os teores mais baixos em azoto. Para muitas espécies existe uma forte correlação entre a capacidade fotossintética e o teor foliar em azoto (Evans, 1989), mas a importância relativa da componente estomática e não estomática nas plantas simultaneamente com carências em azoto e em água parece depender do tipo de relação teor foliar em azoto-capacidade fotossintética característico da espécie, para plantas sem limitações hídricas. A componente estomática de plantas deficientes em azoto de *Festuca arundinacea* é mais sensível aos défices hídricos que a componente não estomática, e as plantas deficientes apresentaram recuperações após rehidratação superiores às plantas com elevados teores de N (Ghassghaie e Saugier, 1989). Noutra espécie, *Oryza sativa*, os estomas das plantas que receberam suplemento nutritivo em azoto são mais sensíveis ao stress hídrico, permitindo uma melhor regulação das trocas gasosas de que resultou uma maior eficiência do uso da água relativamente às plantas que cresceram a baixo N (Otoo *et al.*, 1989).

Neste ensaio, a condutância estomática, bem como os valores de p_i , não recuperaram nas 12 horas que se seguiram à rehidratação. O atraso na reabertura estomática não pode ser associado à permanência de défices hídricos nas folhas porque a turgidez dos tecidos foi completamente restabelecida (Tabela 4.1). Os efeitos *a posteriori* dos défices hídricos na abertura dos estomas têm sido atribuídos à manutenção no apoplasto das folhas de níveis elevados de sinais positivos, *e.g.* ABA (Cornish e Zeevaart, 1985) e/ou à escassez de sinais negativos (Bano *et al.*, 1994). Outros trabalhos em *L. albus* (Correia e Pereira, 1994) indicaram que o atraso na

reabertura estomática após rehidratação poderia ser atribuído à permanência de elevadas concentrações de ácido abscísico no xilema no caso de plantas sujeitas a défices hídricos moderados, mas não no caso de stress severo e prolongado. Nestas condições poderá estar envolvida a persistência de limitações na condutância hidráulica da planta em consequência de danos causados ao nível da actividade e integridade das raízes (Semaan *et al.*, 1982; Cruz *et al.*, 1992; Correia, 1993).

Os resultados sugerem ainda que a rehidratação induz a aceleração dos processos de senescência foliar, nomeadamente no que respeita a mobilização de compostos azotados para zonas de crescimento mais activo (Tabela 4.III). A capacidade fotossintética do tremoceiro expressa em função do azoto, apesar de ter diminuído com o stress hídrico, recuperou rapidamente nas duas classes de folhas mais jovens. A inibição fotossintética ao nível do mesófilo foi mais acentuada nas folhas velhas, que apresentaram os teores mais baixos em N, e sobretudo após a rehidratação. A mobilização de N das folhas velhas constitui, segundo Field (1987), uma característica adaptativa importante que confere maior eficiência fotossintética de utilização deste elemento. De acordo com este autor, simulações numéricas baseadas nesta hipótese indicam que a fotossíntese da planta inteira aumenta quando o N é redistribuído. A expressão de proteases subjacente à redistribuição dos compostos azotados poderá ter sido inibida nas folhas jovens de tremoceiro por outro tipo de alterações na expressão genética mediadas pelo stress hídrico. Reviron *et al.* (1992) caracterizaram um polipéptido, análogo aos inibidores de proteases, que se acumulava durante o stress hídrico nas folhas em expansão de *Brassica napus*, desaparecendo após rehidratação. Os autores sugeriram que este polipéptido possa ter um papel protector, nas folhas em expansão, da senescência induzida pelo stress hídrico observada nas folhas expandidas.

Em conclusão, os resultados apresentados nesta secção evidenciam a importância da duração dos défices hídricos na inibição, independente da idade, da actividade fotossintética ao nível do mesófilo. Contudo, as folhas velhas são as mais afectadas e a inibição da actividade fotossintética máxima nestas folhas não é aliviada com a rehidratação. Estas alterações são devidas ao atraso observado na reabertura dos estomas e, atendendo à perda de azoto foliar nas folhas mais velhas em stress que se acentua após a rehidratação, aos efeitos associados à aceleração induzida pelos défices hídricos do padrão acrópeto de senescência. A mobilização interna de N poderá conferir vantagens adaptativas (ou aclimatativas) de manutenção do potencial produtivo de plantas sujeitas a défices hídricos ocasionais.

5. EFEITOS DO STRESS HÍDRICO NO METABOLISMO FOTOSINTÉTICO DA SACAROSE E DO AMIDO.

As limitações no crescimento e na expansão dos tecidos impostas pelos défices hídricos estão associadas a alterações metabólicas na produção e mobilização de determinados compostos orgânicos (e.g. amino ácidos, ácidos orgânicos, hidratos de carbono), que interagem com as relações hídricas dos tecidos através de alterações na concentração de solutos e no volume não-osmótico (Hanson e Hitz, 1982; Morgan, 1984). Têm sido observadas, para diversas espécies, alterações na concentração de açúcares não estruturais (nomeadamente sacarose e amido) induzidas pelo stress hídrico moderado (Ackerson e Hebert, 1981; Drossoupoulos *et al.*, 1987; Vassey e Sharkey, 1989; Quick *et al.*, 1989). Por outro lado, alguns autores associam os decréscimos na taxa fotossintética observada em condições limitantes do crescimento à acumulação de hidratos de carbono na folha (Neales e Incoll, 1968; Azcón-Bieto, 1983).

Deste modo, este capítulo pretende contribuir para a avaliação dos efeitos dos défices hídricos, em tecidos essencialmente produtores - *source* - ou consumidores - *sink*, na regulação da síntese (partição de assimilados recentes) e utilização (concentração e mobilização) dos produtos finais da fotossíntese, concretamente, da sacarose e do amido.

5.1. PARTIÇÃO DOS ASSIMILADOS RECENTES EM TECIDOS *sink*

Os tecidos *sink* podem ser essencialmente utilizadores, como os meristemas, ou armazenadores, como os frutos. As experiências realizadas no âmbito desta secção foram efectuadas em culturas em suspensão de células heterotróficas de *Chenopodium rubrum* (Hatzfeld e Stitt, 1990), aqui utilizadas como sistema modelo de estudo da regulação da partição do carbono em tecidos consumidores.

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

A inclusão de diferentes concentrações de sorbitol no meio de cultura permitiu induzir nas células em suspensão diferentes intensidades de stress hídrico por desidratação osmótica (ver MATERIAL E MÉTODOS).

Numa primeira abordagem experimental verificou-se que as células sujeitas a um potencial osmótico inferior em 0.52, 1.22, e 2.00 MPa relativamente à testemunha ($\Psi_s = -0.28$ MPa) apresentavam, logo a partir do nível de stress osmótico mais moderado, alterações metabólicas importantes: após 2 horas, a taxa de consumo de O_2 era já significativamente diferente entre a testemunha e os tratamentos, e em 24 horas diminuía nas células em stress entre 59% e 66%, enquanto o peso fresco diminuía 25% a 43%.

Passou-se a utilizar novo gradiente de concentrações de sorbitol correspondentes aos seguintes Ψ_s : -0.28 (testemunha), -0.4, -0.5, -0.8, -1.5 e -2.3 MPa; após 24 horas de recultura nestes meios, eram colhidas amostras para

determinação da massa celular fresca, volume dos protoplastos, análise de metabolitos (glucose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, glucose-1-fosfato, uridina difosfogluose, malato, frutose-2,6-bisfosfato), teores em frutose, sacarose e amido, partição do carbono entre a sacarose e o amido, e actividade da sacarose-fosfato sintase (ver MATERIAL E MÉTODOS). Foram realizadas três séries de experiências que apresentaram resultados genericamente idênticos.

RESULTADOS

Na figura 5.1 apresentam-se os resultados do défice relativo em água das células sujeitas a diferentes intensidades de stress osmótico, estimado pela variação quer da massa fresca das células (após sucção do meio), quer do volume dos protoplastos determinado a partir da diferença de marcação por $^3\text{H}_2\text{O}$ e ^{14}C -sorbitol. O volume dos protoplastos diminuiu com a desidratação osmótica, reduzindo-se 80% nas culturas a $\Psi_s = -2.3$ MPa relativamente às células testemunha.

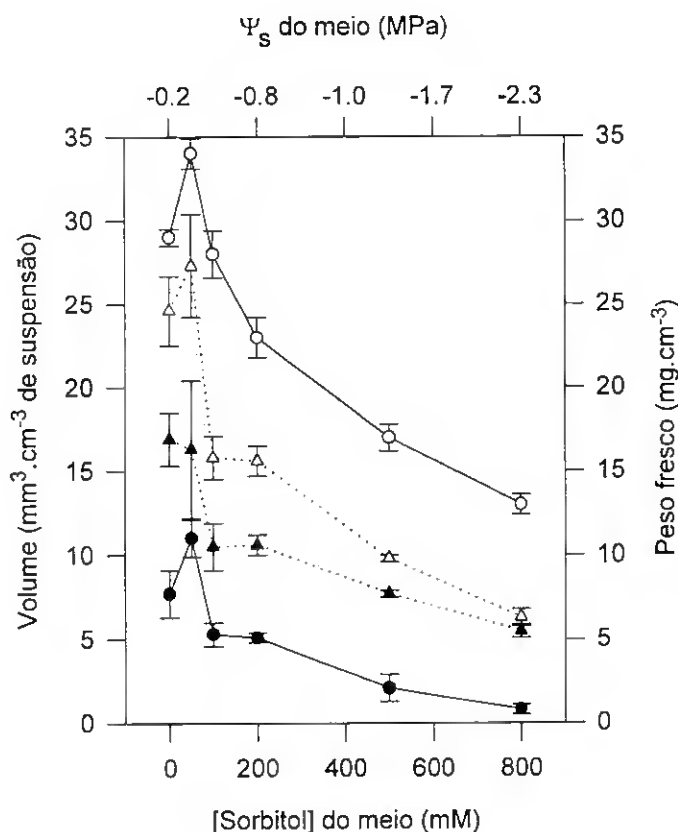


FIGURA 5.1 - Massa fresca (○), e volume dos protoplastos (●) determinados a partir da diferença de marcação por ^3H (Δ) e ^{14}C (▲), de células de *Chenopodium rubrum* em suspensão em meios com concentrações crescentes de sorbitol durante 24 horas, e incubadas 60 minutos num meio com um suplemento de ^{14}C -sorbitol (1.5×10^8 Bq.m⁻³) e de $^3\text{H}_2\text{O}$ (1×10^9 Bq.m⁻³); médias \pm erro padrão, n = 4.

A massa fresca das células decresceu em paralelo com o volume marcado pelo ^3H , sendo superior por um valor constante de cerca de $8.6 (\pm 1.2) \text{ mg.cm}^{-3}$ de suspensão (a partir da relação massa/unidade de volume marcado pelo trítio), que corresponderá à massa seca estimada das células da cultura testemunha.

Testou-se se as alterações no volume dos protoplastos das células transferidas para meios com diferentes concentrações de sorbitol ocorreriam rapidamente, uma vez que as amostras eram colhidas ao fim de uma hora. Os resultados da variação do volume, ao longo de um dia, dos protoplastos de células testemunha e de células sujeitas a stress osmótico mais severo, permitiu concluir que as alterações ocorrem durante a primeira hora, e mantêm-se relativamente estáveis durante 24 horas (TABELA 5.I).

TABELA 5.I - Variação ao longo do tempo do volume dos protoplastos de células em suspensão de *Chenopodium rubrum* 24 horas após transferência para meios com 800 mM sorbitol (STRESS) e sem sorbitol (TESTEMUNHA); média \pm erro padrão, n = 4.

TEMPO DECORRIDO (horas)	STRESS ($\mu\text{l. ml}^{-1}$)	TESTEMUNHA ($\mu\text{l. ml}^{-1}$)
1	1.9 ± 0.3	7.0 ± 0.3
2	1.8 ± 0.4	9.6 ± 0.5
6	2.0 ± 0.9	7.6 ± 0.2
12	1.4 ± 0.2	9.7 ± 0.4
18	1.3 ± 0.3	7.4 ± 0.2
24	2.0 ± 0.4	8.6 ± 0.5

O facto da taxa de consumo de O_2 ter aumentado em 24 horas indica que a actividade metabólica das células não foi suprimida com os tratamentos. No entanto esse aumento foi apenas 40% da taxa medida para as células testemunha. A perda de actividade relativa manifestou-se também na massa de células de cada cultura (FIG. 5.2).

Os teores de sacarose, frutose e amido das células em baixas concentrações de sorbitol (<200 mM) foram, no conjunto das três experiências, relativamente constantes e semelhantes aos das células testemunha (FIG. 5.3, dados de um dos ensaios). Com o decréscimo do Ψ_s do meio os níveis celulares de sacarose diminuíram e como os de amido decresceram ainda mais acentuadamente, resultou um aumento da razão sacarose:amido para valores de 1.4 a 2.1 (TABELA 5.II). No entanto, se se considerarem as alterações no volume dos protoplastos, a concentração de sacarose pode ser, nas células submetidas a stress osmótico mais severo, cerca de 4-6 vezes superior.

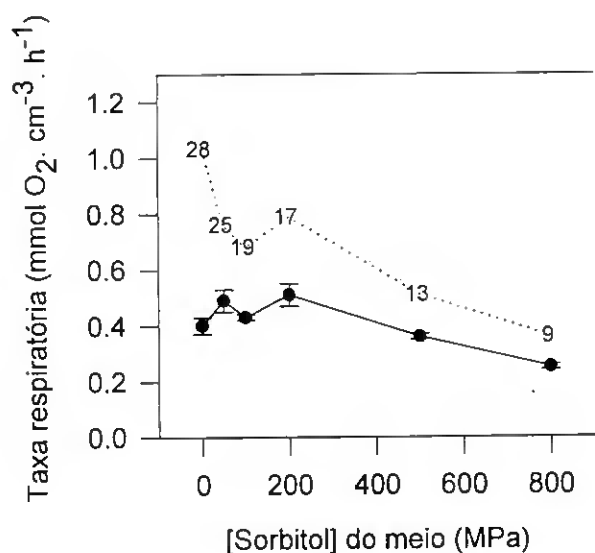


FIGURA 5.2 - Taxa de consumo de O₂ de células em suspensão de *C. rubrum* determinada 2 horas (—) ou 24 horas (---) após recultura em meios com concentrações crescentes de sorbitol; os valores na curva correspondente às 24 horas representam a concentração celular de cada cultura expressa em unidades de massa por volume de suspensão (mg peso fresco cm⁻³).

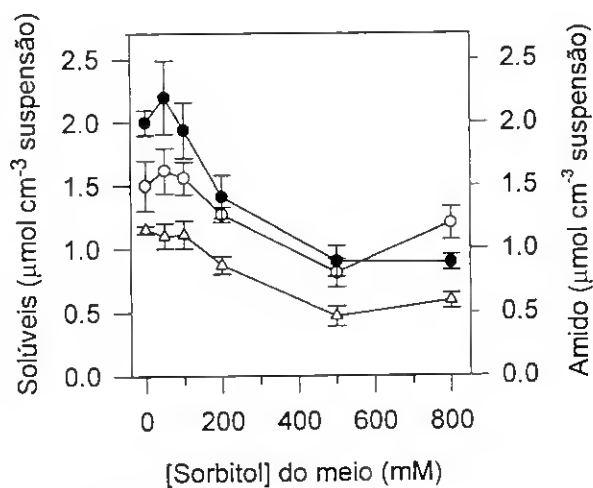


FIGURA 5.3 - Teores de açúcares solúveis, sacarose (o) e frutose (Δ), e de amido (●) de células de *Chenopodium rubrum* em suspensão em meios com concentrações crescentes de sorbitol durante 24 horas; média ± erro padrão, n=4.

TABELA 5.II - Razão sacarose:amido de células em suspensão de *Chenopodium rubrum* 24 horas após transferência para meios com diferentes concentrações de sorbitol; médias de 4 amostras (erro padrão inferior a 10%) correspondentes a três conjuntos independentes de resultados.

SORBITOL (mM)	SACAROSE : AMIDO		
	I	II	III
0	0.74	0.73	0.90
50	0.72	0.70	0.72
100	0.86	0.81	0.85
200	0.93	0.91	0.92
500	0.92	0.90	2.04
800	1.39	1.36	2.11

Esta alteração na partição do carbono é confirmada pelos resultados da incorporação de ^{14}C em diferentes metabolitos a partir de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glucose fornecida ao meio de cultura (TABELA 5.III). O metabolismo das células sujeitas a desidratação osmótica foi alterado no sentido do favorecimento da síntese da sacarose, e o consumo total de glucose foi reduzido, sendo respectivamente para as células testemunha, stress 500 mM sorbitol, stress 800 mM sorbitol de 674, 529 e 324 μmol de equivalentes de hexoses cm^{-3} de suspensão.

TABELA 5.III - Percentagem de incorporação de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glucose nas várias fracções durante 8 horas após recultura; médias \pm erro padrão, n = 4.

	TESTEMUNHA	STRESS (500 mM)	STRESS (800 mM)
CO_2	34 \pm 1	25 \pm 2	19 \pm 1
SACAROSE	30 \pm 1	40 \pm 4	47 \pm 2
ANIÕES	9 \pm 1	7 \pm 1	12 \pm 1
CATIÕES	5 \pm 1	8 \pm 1	11 \pm 1
AMIDO	22 \pm 1	20 \pm 3	11 \pm 1

Os teores dos intermediários glicolíticos e a frutose 2,6-bisfosfato diminuíram com a desidratação osmótica, enquanto que o teor em malato não se alterou significativamente (FIG. 5.4). No entanto, as concentrações destes metabolitos no citosol, assumindo que ocupa 10% do volume do protoplasto (Gerhardt e Heldt, 1984) e no vacúolo (no caso do malato) aumentam acentuadamente nas células em stress mais severo, relativamente às células testemunha, se se tomar em consideração as alterações no volume dos protoplastos (TABELA 5.IV).

TABELA 5.IV - Concentrações estimadas de Glc6P, Fru6P, Glc1P, UDPGlc, F26BP e de malato de células de *Chenopodium rubrum* em suspensão 24 horas após recultura em meios sem sorbitol (TESTEMUNHA) e com 800 mM de sorbitol (STRESS), a partir de dados como os das Fig. 5.1 e 5.4, relativos a duas experiências idênticas.

	I		II	
	TESTEMUNHA	STRESS	TESTEMUNHA	STRESS
Glc6P (mM)	12	17	11	29
Fru6P (mM)	3	5	3	8
UDPGlc (mM)	4	5	4	8
F26BP (μ M)	5	8	5	21
Malato (mM)	7	91	8	62

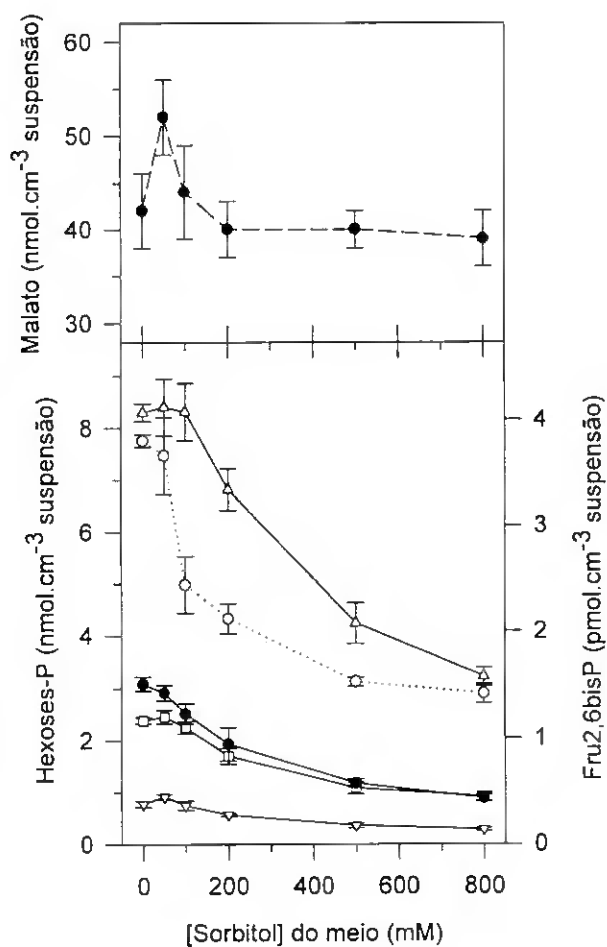


FIGURA 5.4 - Níveis de metabolitos - Glc6P (Δ), Fru6P (\square), Glc1P (∇), UDPGlc (\bullet), F26BP (\circ) e malato (\bullet --- \bullet) de células de *Chenopodium rubrum* em suspensão 24 horas após recultura em meios com concentrações crescentes de sorbitol; média \pm erro padrão, n = 4.

DISCUSSÃO

Os tecidos consumidores utilizam os assimilados essencialmente na actividade respiratória, podendo temporariamente armazenar açúcares solúveis ou insolúveis que poderão ser mobilizados quando necessário (Ho, 1988); a actividade metabólica pode assim ser avaliada quer pela taxa respiratória quer pela variação na biomassa. Relativamente a outros processos metabólicos, o stress hídrico parece afectar moderadamente a respiração mitocondrial, indirectamente por alterações mediadas pela redução do volume celular, e por efeitos na actividade metabólica associada ao crescimento e à divisão celular (Bradford e Hsiao, 1982; Ho, 1988).

As células sujeitas a défice hídrico por desidratação osmótica manifestaram um claro decréscimo de actividade: apesar dos substratos para a respiração não terem sido limitantes, o crescimento da cultura e a taxa de consumo de O₂ foram significativamente afectados, e a incorporação de carbono do meio reduziu-se a 20% do utilizado pelas células testemunha. Não obstante esta redução observou-se uma modificação importante no padrão normal de síntese dos assimilados: a síntese da sacarose foi favorecida em detrimento da do amido. Este tipo de resposta é semelhante à descrita para tecidos fotossintéticos sujeitos a défices hídricos (Vassey e Sharkey, 1989; Quick *et al.*, 1989). Quick *et al.* (1989) sugeriram que a hidrólise do amido, bem como o aumento na concentração de substratos e de activadores da enzima sacarose fosfato sintase (SPS) resultante da redução do volume dos protoplastos, possam contribuir para os aumentos observados nos teores de sacarose.

De acordo com os resultados de estudos posteriores nestas culturas (Dancer *et al.*, 1990) a actividade da enzima SPS apenas aumenta nas células a baixas concentrações de sorbitol, apresentando-se nas restantes sem variações significativas. Também não houve indicações de que pudesse ter ocorrido interconversão induzida pelo défice hídrico de formas de SPS, como as caracterizadas nas folhas de espinafre (Stitt *et al.*, 1988), apesar desse mecanismo ter sido proposto para justificar as alterações de regulação por fosforilação/desfosforilação e do aumento de actividade desta enzima em discos foliares sujeitos a desidratação osmótica (Quick *et al.*, 1989). Nas células heterotróficas de *C. rubrum* a acumulação de sacarose observada poderá dever-se ao aumento na concentração de metabolitos em consequência das enormes reduções do volume dos protoplastos, já que a actividade da SPS não foi significativamente alterada.

Outros efeitos relacionados com o aumento da concentração de metabolitos são, por exemplo, os que envolvem os teores de malato e de F26BP. A F26BP neste contexto é um metabolito associado a mecanismos de regulação da glicólise, e unicamente nas plantas pode estar ainda ligado à síntese gluconeogénica da sacarose via fosfofrutocinase-dependente do pirofosfato (PFP). A concentração de F26BP aumenta em resposta quer ao aumento da taxa respiratória, quer ao aumento da actividade biossintética (Stitt, 1990). Neste ensaio, contudo, diminuiu a taxa de respiração, mas aumentou a concentração de F26BP; coloca-se então a hipótese de, nas condições ensaiadas, a entrada na mitocôndria de carbono originado do fosfoenolpiruvato possa seguir principalmente a via da PEPC'ase em vez da piruvatocinase, permitindo o fluxo de carbono ultrapassando o passo de formação de ATP, que se torna relativamente menos necessário. A PEPC'ase catalisa a formação de oxaloacetato a partir do fosfoenolpiruvato e de bicarbonato e, por sua vez, o oxaloacetato é convertido em malato. O malato, o piruvato e oxaloacetato são

metabolitos que participam nas trocas de carbono e de equivalentes redutores entre o citosol e a mitocôndria.

Apesar de especulativa, a hipótese de que o aumento da fixação às escuras do CO₂ possa ocorrer em tecidos sink em déficit hídrico conjuga-se com as seguintes observações: (i.) o facto da acumulação passiva de malato resultar em concentrações mais elevadas nas células em stress, acompanhada do decréscimo de CO₂ evoluído; (ii.) a manutenção de uma *pool* de hexoses fosfato relativamente grande, activadora da síntese da sacarose, e de níveis elevados de F26BP capazes de promoverem a síntese gluconeogénica de sacarose via PFP. A acumulação de solutos compatíveis, como o malato e a sacarose, poderá ter vantagens importantes na manutenção de turgescências positivas à medida que diminui o teor relativo em água das células.

Numa revisão recente, dedicada à F26BP, Stitt (1990) considera que a PFP possa ter um papel flexível no metabolismo das plantas permitindo-lhes respostas mais ajustadas às condições externas; o autor refere ainda, que as funções da F26BP não estão bem definidas no metabolismo glicolítico, e que serão necessários novos estudos que integrem informação ao nível dos efeitos da concentração de hidratos de carbono na concentração deste, e de outros metabolitos, em tecidos não fotossintéticos.

5.2. PARTIÇÃO DOS ASSIMILADOS RECENTES EM TECIDOS *source*.

A partição dos assimilados recentes entre a sacarose e o amido é, numa primeira instância, geneticamente regulada. Ao longo do dia, a acumulação relativa daqueles hidratos de carbono varia em função da espécie e é principalmente regulada por mecanismos bioquímicos do citosol (Huber e Huber, 1992). O tremoceiro branco (*Lupinus albus* L.) é uma espécie que, durante o dia (fotoperíodo), acumula nas folhas quer sacarose quer amido e, apesar das flutuações diárias, mantém quantidades importantes de sacarose na seiva floémica dos pecíolos e dos caules tanto de dia como no início da noite (Pate *et al.*, 1979).

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Os resultados que a seguir apresento referem-se a medições efectuadas em *Lupinus albus*, em amostras colhidas nas plantas utilizadas nos ensaios de Maio de 1989 e Fevereiro de 1990. As condições experimentais de realização dos ensaios estão descritas no capítulo anterior. O estudo da partição dos assimilados recentes foi efectuado em folhas recentemente expandidas de plantas submetidas a um ciclo de secura do solo de 6 dias (Maio de 1989) e em folhas de diferentes idades fisiológicas de plantas não regadas durante 14 dias (Fevereiro de 1990).

RESULTADOS

Na TABELA 5.V apresentam-se os valores de potencial hídrico e de teor relativo em água determinados de madrugada, e os respectivos valores mínimos atingidos ao longo do dia, das folhas das plantas regadas (testemunha), não regadas durante 4 dias (stress moderado), durante 6 dias (stress), e destas cerca de 12 horas depois de terem sido regadas (rehidratadas).

TABELA 5.V - Potencial hídrico (Ψ) e teor relativo em água (RWC) de folhas de plantas de *L. albus* regadas (C), não regadas durante 4 dias (SM), durante 6 dias (S), e nestas depois de rehidratadas (RH); valores correspondentes a medidas efectuadas de madrugada (PD), e valores mínimos (MIN) atingidos durante os dias de medição (ver FIG. 4.)

	C	SM	C	S	C	RH
Ψ PD (MPa)	-0.15	-0.35	-0.17	-0.62	-0.18	-0.18
RWC PD (%)	92	90	94	87	92	92
Ψ MIN (MPa)	-1.14	-1.28	-1.1	-1.35	-0.78	-0.67
RWC MIN (%)	71	71	-80	63	82	86

A partição imediata do carbono fixado durante a fotossíntese entre o amido e os açúcares solúveis (glucose, frutose e sacarose) foi determinada pela incorporação de ^{14}C em discos foliares (ver MATERIAL E MÉTODOS). A razão da radioactividade determinada na fracção solúvel e na fracção insolúvel (FIG. 5. 4) foi diminuindo a partir do meio da manhã nas folhas das plantas regadas, o que significa que uma maior percentagem de carbono fixado durante a fotossíntese foi atribuído ao amido. O padrão diário desta razão para as folhas das plantas não regadas, em stress hídrico moderado, foi semelhante ao das plantas testemunha, mas relativamente a estas aumentou, ao fim da tarde, a percentagem de carbono canalizada para a síntese da sacarose. Com stress hídrico severo a razão solúveis:insolúveis foi, durante toda a manhã, superior ao valor observado nas plantas regadas.

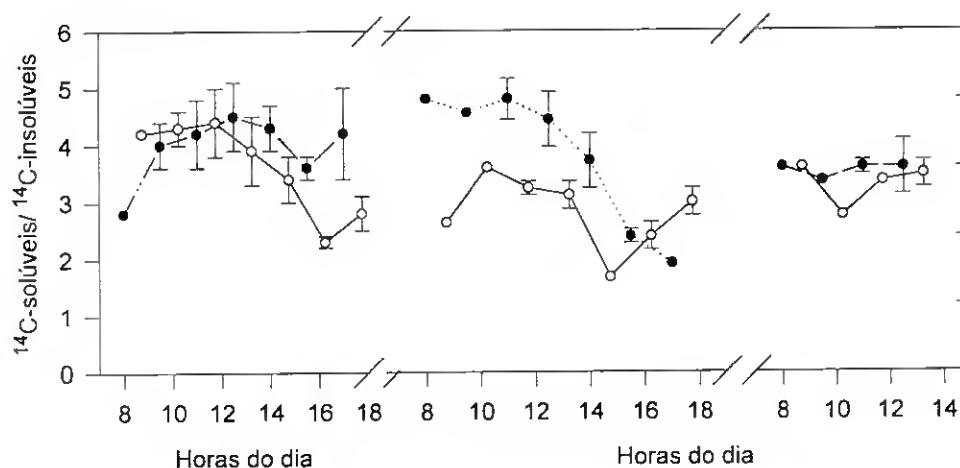


FIGURA 5.4 - Curso diário da razão da radioactividade incorporada durante 20 minutos de exposição a $^{14}\text{CO}_2$ nas fracções solúvel e insolúvel de discos foliares de plantas regadas (o), não regadas (●) no 4º e 6º dia do ciclo de secura, e nestas, no dia seguinte, após rehidratação; médias \pm erro padrão, $n = 3$.

Determinaram-se ainda as quantidades totais de açúcares solúveis (glucose, frutose e sacarose) e de amido em extractos foliares de amostras colhidas ao longo do dia, nas mesmas folhas e plantas utilizadas no eléctrodo de oxigénio para a medição da capacidade fotossintética (FIG. 4.12) e da partição de assimilados recentes (FIG. 5.4). As plantas em stress mantiveram nas folhas um teor em açúcares solúveis semelhante, ao das plantas regadas, enquanto que os níveis de amido foram substancialmente reduzidos à medida que progredem os défices hídricos (FIG. 5.5 A e B). Durante a rehidratação a síntese de amido reactivou-se (FIG. 5.4) e a folha iniciou o restabelecimento das reservas amiláceas (FIG. 5.5 A).

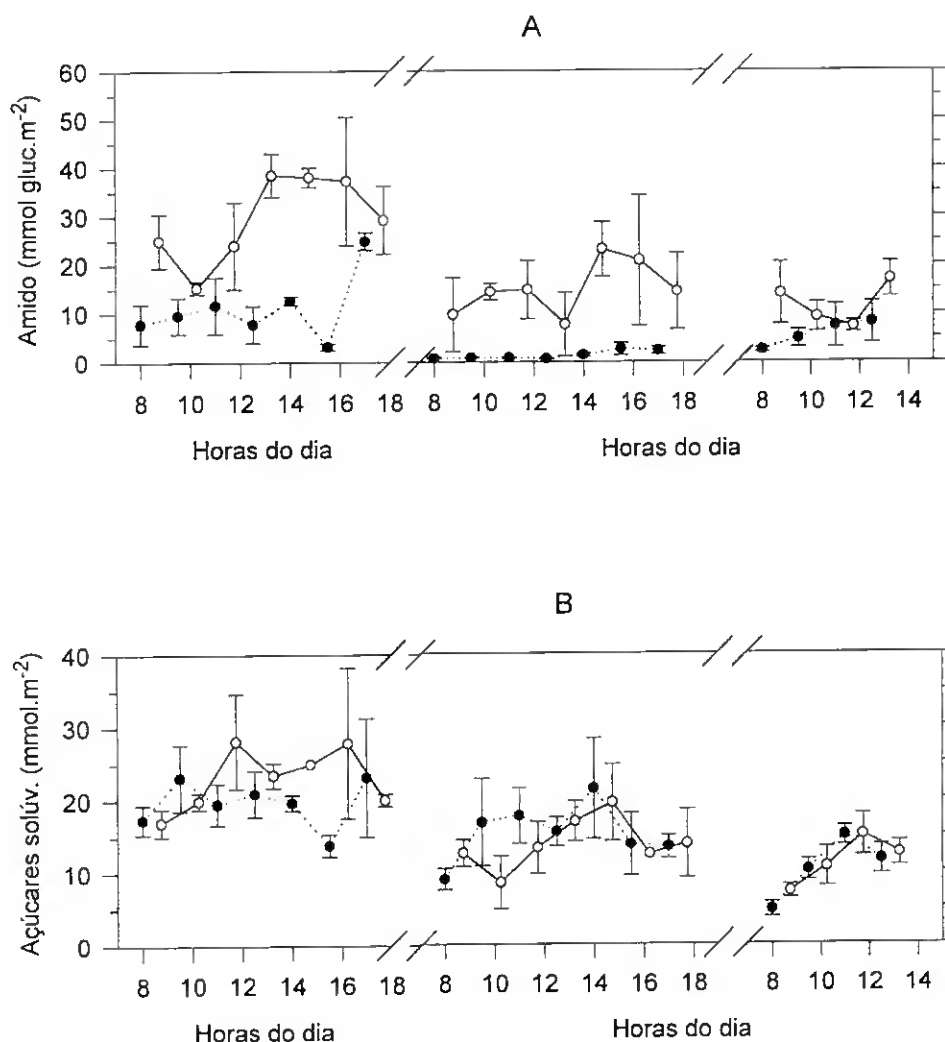


FIGURA 5.5 - (A) Amido e (B) açúcares solúveis (glucose, frutose e sacarose) de discos foliares colhidos ao longo do dia de plantas de *L. albus* não regadas (●) durante 4 ou 6 dias e nestas, no dia seguinte, depois de reidratadas, relativamente às plantas regadas (o); médias \pm erro padrão, n = 3.

Na TABELA 5.VI apresentam-se os valores estimados do balanço diário de carbono expresso em equivalentes de hexoses. A fixação de carbono foi calculada por integração das taxas fotossintéticas ao longo do fotoperíodo (CAP. 4) e a acumulação de hidratos de carbono durante o dia corresponde à diferença entre os teores em hidratos de carbono nas folhas, de manhã e ao fim da tarde. A taxa de exportação durante o dia foi calculada pela diferença entre o total de carbono fixado e a acumulação de hidratos de carbono ao longo do dia. A taxa de exportação durante a noite foi estimada como a diferença entre as quantidades de hidratos de carbono determinadas nas amostras colhidas no fim da tarde e as colhidas no início da manhã (não foram contabilizadas as perdas respiratórias). As folhas das plantas em stress apresentaram decréscimos na taxa diária de exportação em cerca de 60-70%, e acumularam apenas uma pequena quantidade de açúcares durante o dia, para além do teor existente no início da manhã.

TABELA 5.VI - Balanço diário, e taxas de exportação de carbono (em equivalentes de hexoses) estimadas para folhas de plantas regadas (C) e não regadas durante 6 dias (S) de *Lupinus albus* a partir dos dados das Fig. 4.10 e 5.5.

	C	S
FOTOSSÍNTESE (mmol C ₆ .m ⁻² .dia ⁻¹)	94.9	34.8
ACUMULAÇÃO DE HC (mmol C ₆ .m ⁻² .dia ⁻¹)	16.1	6.4
TAXA DE EXPORTAÇÃO - DIA (μmol C ₆ .m ⁻² .s ⁻¹)	2.19	0.78
TAXA DE EXPORTAÇÃO - NOITE (μmol C ₆ .m ⁻² .s ⁻¹)	0.32	0.13

Durante o ensaio de 1990, dedicado ao estudo dos efeitos do stress hídrico em folhas de diferentes idades fisiológicas (ver CAP. 4), também se observou a manutenção de quantidades importantes de açúcares solúveis nas folhas de *Lupinus albus* em déficit hídrico (FIG. 5.6). A quantidade de amido (FIG.5.6) decresceu nas folhas das plantas em stress hídrico e, como consequência, a razão entre açúcares solúveis e insolúveis tornou-se 4 a 7 vezes superior à das plantas testemunha (Tabela 5.VII). Relativamente às folhas da mesma idade das plantas testemunha, as reduções no teor em amido observadas nas plantas em déficit hídrico são ligeiramente mais acentuadas nas folhas mais velhas (LPI 8 e LPI 12) que apresentaram apenas cerca de 1.8 mmol de amido m⁻² (9.3 mg g⁻¹ peso seco), o que corresponde a um decréscimo de 82%. Estas folhas apresentaram maiores quantidades de açúcares solúveis (9 mmol m⁻², que correspondem a 50 mg g⁻¹ de peso seco) relativamente às folhas mais jovens, LPI 4.

O restabelecimento das reservas amiláceas nas folhas parece ocorrer rapidamente cerca de 12 horas após rehidratação (FIG. 5.6), observando-se uma recuperação da razão sacarose:amido para valores semelhantes aos das plantas regadas (TABELA 5.VII).

TABELA 5.VII - Razão sacarose:amido para folhas de diferentes idades (LPI) de plantas regadas (C), de plantas não-regadas durante 14 dias (S) e destas após rehidratação (RH); dados de *Lupinus albus* obtidos a partir da FIG. 5.6.

	SACAROSE : AMIDO		
	C	S	RH
LPI 4	0.36	1.10	0.23
LPI 8	0.47	1.63	0.29
LPI 12	0.59	1.75	0.38

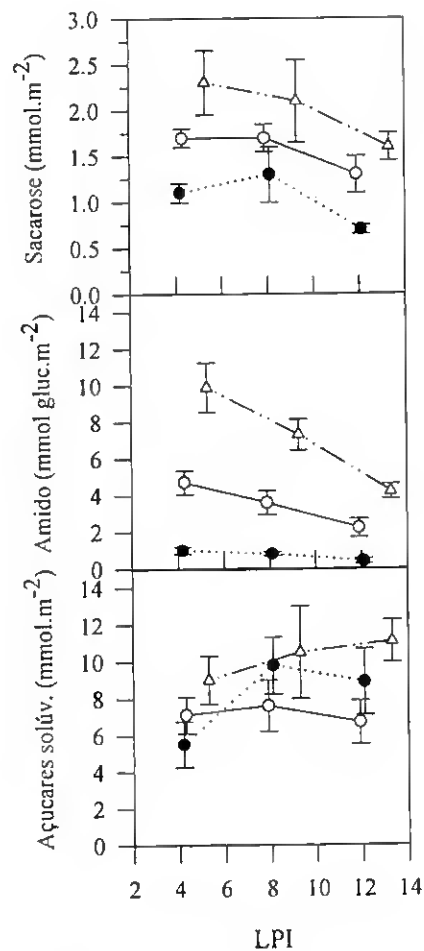


FIGURA 5.6 - Sacarose, amido e açúcares solúveis (glucose, frutose e sacarose) em folhas de diferentes idades (LPI) de plantas regadas (o), não regadas durante 14 dias (●) e rehidratadas (Δ) de *Lupinus albus*; médias \pm erro padrão, n = 4.

DISCUSSÃO.

Os resultados deste conjunto de experiências evidenciam essencialmente dois tipos de efeitos dos défices hídricos no padrão de repartição dos assimilados recentes e nos níveis de hidratos de carbono nas folhas de *L. albus*: um, associado ao aumento relativo da síntese da sacarose em detrimento da do amido; outro, que envolve a manutenção na folha de elevadas quantidades de açúcares solúveis, não obstante o decréscimo na taxa de fixação do CO₂ (ver CAP. 4) e de teores muito baixos de amido.

Este tipo de efeito da desidratação no metabolismo fotossintético do carbono foi também observado noutras espécies, como por exemplo: em *Spinacea olareacea* L., em discos foliares sujeitos a desidratação osmótica, em folhas destacadas sujeitas a desidratação evaporativa (Quick *et al.*, 1989; Zrenner e Stitt, 1991) e, ainda, em folhas de *Phaseolus vulgaris* L. (Vassey e Sharkey, 1989), de *Glycine max* (L.) Merr. (Bensari *et al.*, 1990), de *Eucalyptus globulus* Labill., de *Helianthus annuus* L. e de

Vitis vinifera (Quick *et al.*, 1992), em que as plantas foram submetidas a condições de secura gradual do solo. No caso do espinafre o aumento da partição para a sacarose foi acompanhado de um aumento da activação da SPS (Quick *et al.*, 1989; Zrenner e Stitt, 1991). Relativamente ao tremoço, não possuímos dados que nos possam revelar se as alterações observadas possam ser devidas a modificações na actividade da SPS. A síntese da sacarose pode aumentar por efeitos mediados pela diminuição do volume dos protoplastos e conseqüente aumento da concentração dos metabolitos activadores, ou por efeitos ao nível da activação selectiva de uma das formas de SPS (Quick *et al.*, 1989).

Bensari *et al.* (1990) observaram que, na soja, a hidrólise do amido constituiu um efeito inicial dos défices hídricos, ou seja, foi uma das respostas do metabolismo fotossintético do carbono mais imediata à falta de água nos tecidos. Só posteriormente, à medida que se acentuam os défices hídricos, ocorreram alterações no padrão de distribuição do carbono assimilado entre a sacarose e o amido. A depleção de amido resultante do estímulo da hidrólise deste hidrato de carbono induzido pelo stress hídrico tem também sido sugerido por outros autores (Stewart, 1971; Fredeen *et al.*, 1991; Jones *et al.*, 1980). No caso do tremoço, os dados obtidos indicam que a razão sacarose:amido aumenta sobretudo devido à acentuada redução da síntese do amido, enquanto que a síntese de açúcares solúveis não é muito diferente da observada nas plantas regadas.

Por outro lado, a acumulação de açúcares solúveis, nomeadamente sacarose, glucose e frutose, e cujo carbono tem, principalmente, origem no CO₂ recentemente fixado ou na hidrólise do amido, pode não ser apenas devida ao aumento relativo das vias biossintéticas (como acima referi), mas ser ainda consequência do decréscimo na taxa de exportação de carbono pela folha. No tremoço a taxa de exportação para as plantas em stress hídrico diminuiu mais de 50%, durante o dia e durante a noite, relativamente às plantas regadas. Não há indicações de que a capacidade de translocação possa ser afectada directamente pelos baixos potenciais hídricos (Sung e Krieg, 1979; Wardlaw, 1980; Bradford e Hsiao, 1982) e por isso, nestas condições, a acumulação de açúcares solúveis na folha pode estar associada à inibição do crescimento. Munns e Weir (1981) estimaram que, paralelamente à redução observada no crescimento de folhas de trigo em fase de expansão durante o período de défice hídrico, o aumento dos níveis de açúcares naquelas folhas é aproximadamente equivalente ao decréscimo no consumo dos hidratos de carbono que seriam utilizados no crescimento.

Estas alterações no metabolismo fotossintético do carbono observadas em *L. albus* parecem ser dependentes da idade ou estágio de desenvolvimento da folha. As folhas mais velhas de plantas em stress hídrico acumularam maior quantidade de açúcares solúveis do que as folhas mais novas, relativamente às folhas da mesma idade de plantas regadas. As folhas jovens em expansão apresentaram níveis semelhantes de açúcares nas folhas com ou sem défice hídrico. São também as folhas mais velhas as que exibiram maiores decréscimos nos teores de amido.

O aumento na concentração de solutos compatíveis, nomeadamente açúcares solúveis, pode contribuir efectivamente para o ajustamento osmótico dos tecidos (Munns e Weir, 1981). Mas no tremoço, os açúcares solúveis, cujos teores não são significativamente diferentes entre plantas regadas e não-regadas, deverão ter uma pequena contribuição relativa para um possível ajustamento osmótico, atendendo ao aumento paralelo do volume osmótico devido à acentuada redução nos teores em

amido. O amido, como sugerem Ackerson e Herbert (1981) e Ackerson (1981), pode ter um papel importante na regulação do volume não-osmótico das células, facilitando o ajustamento osmótico. Nos estudos efectuados por estes autores em algodoeiro, folhas de plantas submetidas a repetidos ciclos de stress hídrico exibiram ajustamento osmótico e mantiveram a turgescência para baixos potenciais hídricos foliares. As folhas destas plantas apresentaram teores mais elevados de amido que as folhas de plantas "não-adaptadas" sujeitas a stress hídrico, mas se colocadas no escuro, de modo a induzir o esgotamento das reservas amiláceas, passaram a apresentar características fotossintéticas e relações hídricas celulares semelhantes às das plantas "não-adaptadas". No presente estudo não foram efectuadas determinações simultâneas da quantidade de açúcares solúveis e do potencial osmótico do suco celular de forma a avaliar a contribuição efectiva daqueles no abaixamento do potencial osmótico. No entanto, se ocorrer redução dos volumes dos protoplastos, aumenta a concentração efectiva daqueles açúcares, o que permite a manutenção de turgescências positivas à medida que diminui o potencial hídrico.

Cerca de 12 horas após a rehidratação das plantas submetidas a stress hídrico, a síntese do amido é novamente restabelecida. A manutenção de níveis elevados de hidratos de carbono não estruturais nas folhas mesmo depois de rehidratadas, relativamente às folhas das plantas testemunha, poderá estar associado a limitações no crescimento impostas por efeitos *a posteriori* dos défices hídricos, como por exemplo a diminuição do número de *sinks* activas.

O decréscimo da quantidade de amido e o aumento da concentração de açúcares solúveis, parece ser uma característica da resposta aos défices hídricos quer dos tecidos essencialmente consumidores, quer dos tecidos essencialmente produtores de várias espécies. E que consequências poderão trazer estas alterações metabólicas para a taxa fotossintética? Como foi referido (ver CAP. 4) a capacidade fotossintética diminuiu nos tremoceiros submetidos a um ciclo de stress hídrico de maior duração, o que significa que nestas condições, e ao contrário da indução rápida de stress, ocorreram alterações nos componentes fotossintéticos do mesófilo, no cloroplasto ou no citosol. Poder-se-ia colocar a hipótese da taxa fotossintética ser regulada pela actividade *sink*, mediada pelos níveis de assimilados na folha. Alguns autores atribuem à acumulação de hidratos de carbono na folha a inibição da actividade fotossintética observada em condições limitantes da actividade *sink* (Neales e Incoll, 1968; Azcón-Bieto, 1983). Por outro lado, a acumulação ou o fornecimento de hexoses induzem alterações em algumas enzimas do ciclo de Calvin, nomeadamente na RuBisCO (Krapp *et al.*, 1991; Schäfer *et al.*, 1992) e há indicações de que, nas plantas superiores, a sacarose e a glucose poderão funcionar como anabolitos repressores de determinados genes, e regular aquelas enzimas através de efeitos ao nível da expressão genética (Sheen, 1990).

6. EFEITOS DO STRESS HÍDRICO NA QUANTIDADE E ACTIVIDADE DE RUBISCO

A síntese e a quantidade das proteínas foliares estão sujeitos a diversos níveis de regulação; são continuamente degradadas e substituídas, e a concentração de cada proteína depende globalmente da actividade biossintética e proteolítica das células, função do desenvolvimento de tecidos ou de órgãos específicos e de estímulos ambientais que, no conjunto, modulam a expressão genética desse produto (Vierstra, 1993). As proteínas foliares têm não só funções estruturais e catalíticas, como podem constituir uma importante fonte de azoto mobilizável. A proteólise parece depender das características moleculares de cada proteína e também de factores ambientais indutores como, por exemplo, as disponibilidades de água e azoto (Huffaker, 1982).

Os cloroplastos representam o maior compartimento proteico dos tecidos fotossintéticos contendo cerca de 50% da proteína total, e a RuBisCO, só por si, pode constituir 40% - 80% da proteína solúvel foliar das espécies C_3 . A importância desta proteína na planta não se resume à função chave que desempenha na fixação fotossintética do carbono e na fotorrespiração, pois apresenta características das proteínas de reserva podendo ser degradada em resposta a alterações nutritivas, ao envelhecimento e ao desenvolvimento de novos órgãos (Wittenbach *et al.*, 1980; Friederich e Huffaker, 1980; Evans e Terashima, 1987; Makino e Osmond, 1991).

Neste trabalho, o estudo dos efeitos do stress hídrico nas proteínas fotossintéticas incidiu sobre a análise dos teores de RuBisCO, e ainda na actividade desta enzima, em amostras colhidas em folhas de diferentes idades fisiológicas de *Lupinus albus*, em três ensaios com indução de défice hídrico, realizados em Junho de 1990, Maio de 1991 e Fevereiro de 1992. Nos ensaios de 1991 e de 1992, com objectivos e metodologias semelhantes ao de 1990, foi dada especial atenção aos efeitos da rehidratação nos tecidos fotossintéticos que foram sujeitos a défices hídricos.

1º ENSAIO (Junho de 1990)

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

As plantas de *L. albus* cresceram ao ar livre, nas instalações do ISA, Lisboa, em vasos de 12 dm³ (3 plantas por vaso) numa mistura de turfa e areia (1:3). O défice hídrico foi imposto interrompendo a rega durante 10 dias. As plantas iniciavam a fase reprodutora e apresentavam, em média, 22 folhas não senescentes.

Efectuaram-se as seguintes medições: potencial da água e teor relativo em água das folhas de madrugada e a meio do dia; trocas gasosas a concentração ambiente de CO₂, durante o período da manhã, em condições controladas de luz (1600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), de temperatura (temperatura da folha de 25°C) e de défice de pressão de vapor do ar (18 Pa.kPa⁻¹); actividade e quantidade de RuBisCO em amostras colhidas nas mesmas folhas em que foram efectuadas as trocas gasosas; nestas amostras foi ainda quantificada a clorofila, a proteína solúvel e o azoto total. Determinaram-se, também, os teores foliares em hidratos de carbono não estruturais

(solúveis e amido) em amostras colhidas de madrugada e a meio do dia. As medições foram efectuadas paralelamente nas plantas em stress hídrico (S) e nas plantas regadas (C). À excepção do potencial da água foliar que foi determinado em folhas adultas, todas as outras medições foram efectuadas em folhas de diferentes idades fisiológicas - adulta e velha (mas sem sinais conspícuos de senescência), que correspondiam por contagem basípeta, à 8ª e à 13ª folha.

RESULTADOS

As plantas em stress apresentaram um potencial hídrico de madrugada (Ψ_{PD}) e a meio do dia (Ψ_{MD}) 5 a 3.5 vezes inferior ao das plantas regadas. A meio do dia, o teor relativo em água das folhas das plantas não regadas atingiu valores entre 60% e 62% enquanto que o das folhas testemunha não diminuiu para além de 84% (TABELA 6.1).

TABELA 6.1 - Potencial da água foliar (Ψ), e teor relativo em água (RWC) de folhas de diferentes idades fisiológicas, adulta (Ad) e velha (V), determinados de madrugada (PD) e a meio do dia (MD), em plantas regadas (C) e não regadas durante 10 dias (S), de *Lupinus albus*; os valores são médias \pm erro padrão de 8 repetições (Ψ) ou 4 repetições (RWC).

	Ψ_{PD} (MPa)	Ψ_{MD} (MPa)	RWC _{PD} (%)		RWC _{MD} (%)	
	Ad	Ad	Ad	V	Ad	V
C	-0.19 \pm 0.04	-0.49 \pm 0.02	87.5 \pm 1.2	90.9 \pm 0.8	84.2 \pm 0.9	88.1 \pm 1.2
S	-0.99 \pm 0.03	-1.70 \pm 0.03	65.2 \pm 0.9	71.2 \pm 1.6	60.7 \pm 1.2	62.0 \pm 1.2

A taxa de fotossíntese aparente e a condutância estomática foram acentuadamente afectadas pelo défice hídrico (FIG. 6.1). As folhas mais velhas das plantas em stress apresentaram reduções superiores às observadas nas folhas mais novas, relativamente a folhas da mesma idade das plantas regadas: respectivamente 80% e 63% na fotossíntese e 85% e 77% na transpiração. O valor médio da condutância estomática foi nas folhas sem défice hídrico de 250 mmol.m⁻².s⁻¹, e diminuiu nas folhas em stress para valores médios de 33 mmol.m⁻².s⁻¹.

Os níveis de hidratos de carbono solúveis (sacarose, frutose e glucose) foram sempre mais elevados nas folhas em stress do que nas folhas testemunha (FIG. 6.2), quer em amostras colhidas de madrugada, quer em amostras colhidas a meio do dia. Por outro lado, durante o período da manhã, as folhas das plantas regadas acumularam elevadas quantidades de amido que é quase completamente mobilizado até ao início da manhã seguinte. As folhas das plantas com défices hídricos parecem manter, ao longo de todo o período diário, um teor muito baixo de amido (FIG. 6.2).

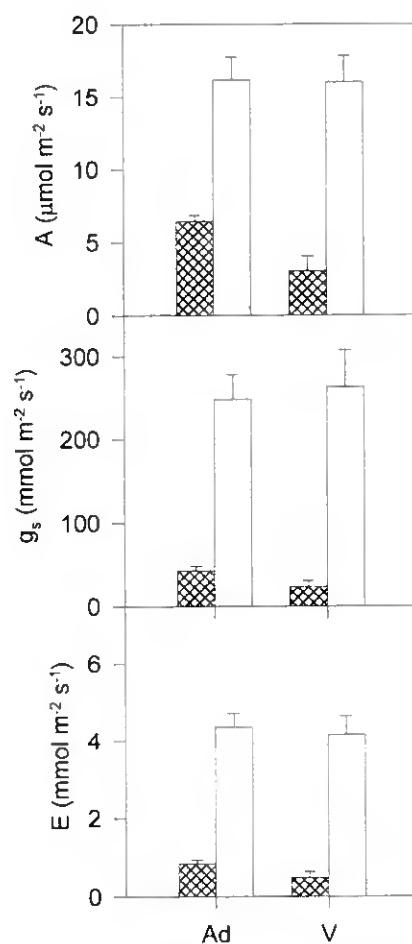


FIGURA 6.1 - Taxa de fotossíntese aparente (A), condutância estomática (g_s) e taxa de transpiração (E) de folhas de diferentes idades fisiológicas, adulta (Ad) e velha (V) determinadas em plantas regadas (a branco) e não regadas (a traço cruzado) de *Lupinus albus*; médias \pm erro padrão de 4 determinações efectuadas a concentração ambiente de CO_2 , irradiância de $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura média da folha de 25°C e défice de pressão de vapor do ar de 18 Pa kPa^{-1} .

Na TABELA 6.II apresentam-se as concentrações dos hidratos de carbono não estruturais representados na FIGURA 6.2 expressos em função da massa foliar seca, discriminando os açúcares solúveis. Independentemente da idade da folha, o stress hídrico parece ter induzido um ligeiro aumento da contribuição relativa de hexoses para os açúcares solúveis.

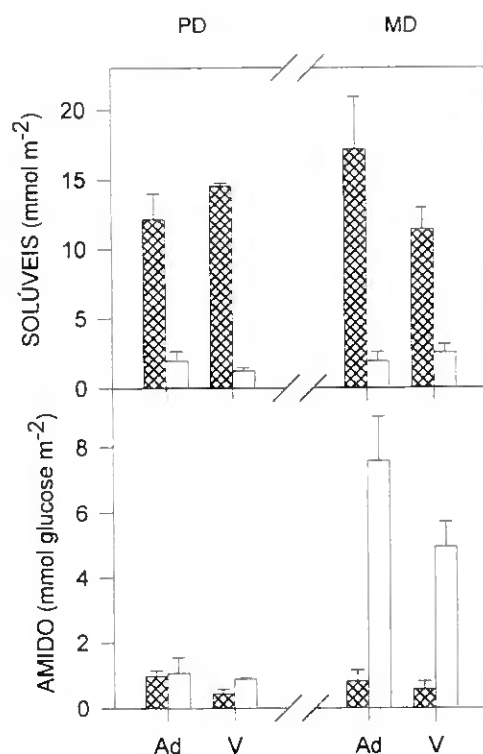


FIGURA 6.2 - Teores em açúcares não estruturais solúveis (glucose, frutose e sacarose) e insolúveis (amido em equivalentes glucose) de folhas adultas (Ad) e velhas (V), em amostras colhidas de madrugada (PD) e a meio do dia (MD), de plantas regadas (a branco) e não regadas (a traço cruzado) de *L. albus*; médias \pm erro padrão, n=3.

TABELA 6.II - Teores em glucose, frutose, sacarose e amido, por unidade de massa foliar seca, em amostras colhidas de madrugada (PD) e a meio do dia (MD) de folhas adultas (Ad) e velhas (V) de plantas de *L. albus* regadas (C) e não regadas (S); médias \pm erro padrão, n=3.

	Glucose (mg g ⁻¹)		Frutose (mg g ⁻¹)		Sacarose (mg g ⁻¹)		Amido (mg g ⁻¹)	
	Ad	V	Ad	V	Ad	V	Ad	V
S _{PD}	15.95 \pm 1.70	16.62 \pm 3.44	27.00 \pm 6.86	36.17 \pm 6.37	29.10 \pm 5.29	29.57 \pm 6.75	4.64 \pm 0.88	2.11 \pm 0.59
C _{PD}	2.53 \pm 1.48	1.52 \pm 0.34	2.04 \pm 0.26	1.50 \pm 0.18	11.71 \pm 3.86	7.78 \pm 1.43	5.84 \pm 2.73	5.20 \pm 0.57
S _{MD}	24.70 \pm 6.04	8.26 \pm 1.04	36.67 \pm 12.77	23.59 \pm 8.01	39.82 \pm 3.67	41.72 \pm 5.69	3.95 \pm 1.63	2.67 \pm 1.16
C _{MD}	2.68 \pm 0.84	3.35 \pm 0.71	3.91 \pm 1.28	5.65 \pm 1.96	11.16 \pm 2.14	10.60 \pm 1.84	41.71 \pm 7.52	28.50 \pm 4.46

A razão sacarose:amido a meio do dia foi nas folhas stress cerca de 40 vezes superior à das folhas testemunha e as folhas mais velhas apresentaram os aumentos mais acentuados, sobretudo devido aos baixos teores de amido. No entanto são as folhas mais novas as que acumularam ao longo da manhã maior quantidade de açúcares solúveis, principalmente hexoses, de que resultou um aumento superior na razão solúveis:amido a meio do dia, relativamente às folhas da mesma idade das plantas regadas. A massa foliar seca por unidade de área (LMA) aumentou nas folhas stress, relativamente às folhas da mesma idade sem défices hídricos, entre 15% nas folhas mais jovens (37.5 g.m^{-2} nas folhas stress, 32.7 g.m^{-2} nas testemunha) e 22% nas folhas mais velhas (38.2 g.m^{-2} nas folhas stress e 31.2 g.m^{-2} nas testemunha). Não foi possível avaliar se este aumento no LMA é devido exclusivamente à contracção dos tecidos, ou se está também relacionado com um aumento real de carbono estrutural, associado às paredes celulares, induzido pelos défices hídricos.

Determinou-se a quantidade de RuBisCO em amostras colhidas, paralelamente às medidas de trocas gasosas, nos folíolos adjacentes aos utilizados na determinação da actividade inicial da enzima e nos quais foram efectuadas as medições de trocas gasosas. A concentração de RuBisCO, expressa em função da área ou da massa seca foliar, decresceu cerca de 40% apenas nas folhas mais velhas das plantas em stress hídrico (FIG. 6.3). Os resultados do estudo da actividade inicial da enzima nestas mesmas folhas (David *et al.*, 1991) dão indicações de que apenas nas folhas velhas a actividade inicial foi afectada (FIG. 6.4).

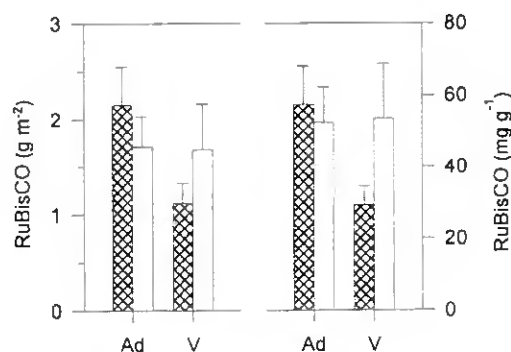


FIGURA 6.3 - Concentração de RuBisCO em extractos de folhas adultas (Ad) e velhas (V) de plantas regadas (a branco) e não regadas (a traço cruzado) de *L. albus*, expressa em função da área foliar e da massa foliar seca; média \pm erro padrão de 4 amostras com duas réplicas.

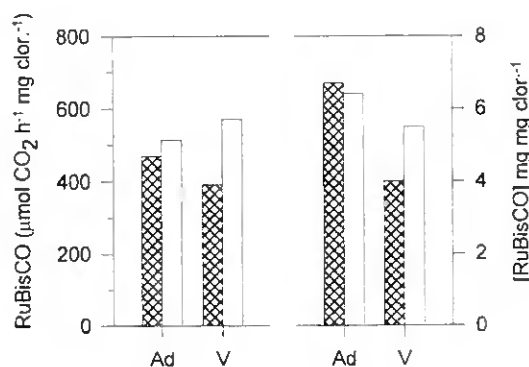


FIGURA 6.4 - Actividade inicial e concentração de RuBisCO expresso por unidade de massa de clorofila em extractos de folhas de diferentes idades (adultas - Ad; velha - V) de plantas regadas (a branco) e não regadas (a traço cruzado) de *L. albus* (David *et al.*, 1991).

Independentemente dos tratamentos, as folhas mais jovens são as que apresentam teores mais elevados de azoto total (TABELA 6.III). No entanto o stress hídrico parece afectar o padrão de mobilização do azoto proteico à medida que as folhas envelhecem. As folhas mais velhas em stress hídrico apresentam reduções na quantidade de proteína total relativamente às folhas mais velhas sem limitações hídricas. Por outro lado, estas folhas (V) sem limitações hídricas, relativamente às folhas mais novas (Ad), apenas apresentam decréscimos na fracção insolúvel, estimada em cerca de 45%, enquanto que as folhas em stress hídrico, à medida que vão envelhecendo, parecem ou limitar o aumento na fracção solúvel que ocorreu com o envelhecimento nas folhas testemunha ou repartir o decréscimo na proteína total pela fracção solúvel e insolúvel. Os resultados sugerem ainda que nestas plantas os défices hídricos não alteraram significativamente a proporção de RuBisCO na proteína solúvel, observando-se um ligeiro acréscimo nas folhas mais novas.

TABELA 6.III - Teores em azoto total (N tot), proteína total estimada (Pr tot), proteína solúvel (Pr sol), proteína insolúvel estimada (Pr ins) e RuBisCO (em percentagem da proteína solúvel), de folhas de duas idades de plantas regadas (C) e não regadas (S) de *L. albus* expressos em função da massa foliar seca. Os valores para o azoto são médias de duas determinações de uma amostra compósita de três plantas e os da proteína solúvel são médias de 4 amostras com duas réplicas; a proteína total foi estimada a partir do azoto total x 6.25 (factor de conversão para a massa de proteína, Coombs *et al.*, 1985) e a proteína insolúvel foi estimada por Pr tot - Pr sol.

	ADULTA		VELHA	
	C	S	C	S
N tot (mg g ⁻¹)	48.1	49.6	43.4	38.9
Pr tot (mg g ⁻¹)	300	310	271	243
Pr sol (mg g ⁻¹)	126	115	176	103
Pr ins (mg g ⁻¹)	174	195	95	140
RuBisCO (%)	42	50	31	29

2º ENSAIO (Maio de 1991)

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

As plantas de *L. albus* cresceram ao ar livre, nas instalações do ISA, Lisboa, em vasos de 12 dm³ (3 plantas por vaso) numa mistura de turfa e areia (1:3). O estudo realizou-se quando as plantas já estavam em floração. O défice hídrico foi imposto interrompendo a rega durante 7 dias. Todas as medições foram efectuadas em folhas adultas e velhas (do 15º e do 9º nó) das plantas regadas (C), não regadas (S), e destas dois dias após rehidratação (RH). Os resultados correspondem, em cada tratamento, ao conjunto das determinações nas duas folhas que não apresentaram diferenças significativas entre si.

Efectuaram-se as seguintes medições: potencial da água e teor relativo em água das folhas de madrugada e a meio do dia; trocas gasosas a concentração ambiente de CO₂, durante o período da manhã, em condições controladas de luz (840 µmol.m⁻².s⁻¹), de temperatura (temperatura média da folha de 27°C) e de défice de pressão de vapor do ar (21 Pa.kPa⁻¹); capacidade fotossintética determinada a 25°C, e em condições saturantes de luz e de CO₂ (15%); fluorescência da clorofila (F_v/F_m). A actividade e a quantidade de RuBisCO foi determinada em amostras colhidas na mesma folha em que foram efectuadas as trocas gasosas. Nestas amostras foi ainda quantificada a clorofila e a proteína solúvel. Determinaram-se, também, os teores foliares em hidratos de carbono não estruturais (solúveis e amido) em amostras colhidas de madrugada e a meio do dia.

RESULTADOS

Após 7 dias de interrupção da rega as plantas apresentaram de madrugada um potencial hídrico e um teor relativo em água foliares respectivamente de -1.4 MPa e de 66% (TABELA 6.IV); a meio do dia, nas folhas destas plantas o teor relativo em água pouco mais diminuiu em relação ao valor que apresentaram de madrugada (64%), enquanto que o das folhas das plantas regadas não foi inferior a 87%. Nas plantas em stress depois de rehidratadas, o teor relativo em água recuperou completamente para valores semelhantes aos das plantas regadas, 92%. O stress hídrico neste ensaio durou menos três dias mas o potencial da água foliar de madrugada decresceu mais (cerca de 0.4 MPa) do que no ano anterior.

TABELA 6.IV - Potencial da água (Ψ) e teor relativo em água (RWC) de folhas de plantas regadas (C), não regadas durante 7 dias (S) e rehidratadas (RH) de *Lupinus albus*, determinados de madrugada (PD) e a meio do dia (MD); os valores são médias \pm erro padrão de pelo menos 6 determinações.

	Ψ_{PD} (MPa)	RWC _{PD} (%)	RWC _{MD} (%)
C	-0.22 \pm 0.01	96.5 \pm 0.5	86.4 \pm 0.5
S	-1.36 \pm 0.02	65.5 \pm 2.1	64.8 \pm 1.7
RH	-	92.3 \pm 0.9	-

Os défices hídricos induziram reduções muito acentuadas nas trocas gasosas (FIG. 6.5), com condutâncias estomáticas extremamente baixas, as folhas em stress hídrico apresentaram decréscimos na fotossíntese a CO_2 ambiente de cerca de 80%; a pressão parcial de CO_2 intercelular (p_i) diminuiu para valores correspondentes a 43% dos das folhas testemunha. Também a capacidade fotossintética das folhas stress decresceu 40%, mas não se observaram alterações na razão F_v/F_m (FIG.6.5), o que indica que a limitação no mesófilo à actividade fotossintética não é consequência de alterações fotoquímicas.

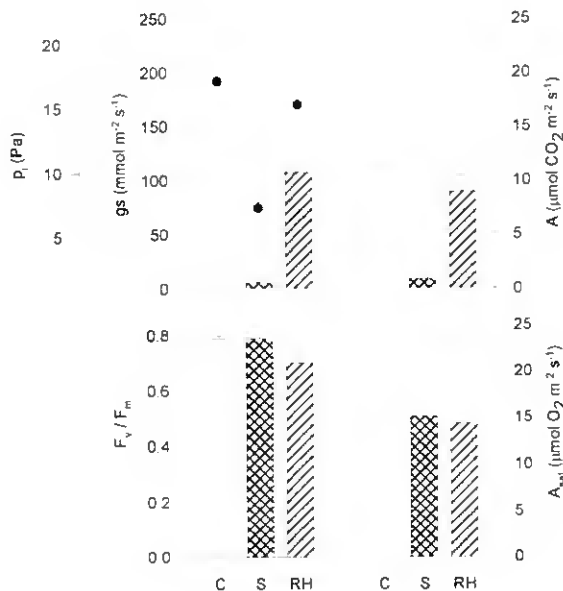


FIGURA 6.5 - Taxa de fotossíntese aparente (A), condutância estomática (gs), pressão parcial interna de CO_2 (p_i), capacidade fotossintética (A_{sat}) e razão entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima (F_v/F_m) determinados em folhas de plantas regadas (a branco), não regadas (a traço cruzado) e nestas depois de rehidratadas (a traço oblíquo) de *Lupinus albus*; os valores estimados de p_i estão representados por pontos (●); médias \pm erro padrão, $n = 6$.

Depois de rehidratadas as folhas das plantas em stress apresentaram recuperações incompletas dos valores da condutância estomática e da taxa de fotossíntese aparente a CO_2 ambiente (70% e 73%) relativamente aos valores das folhas das plantas regadas; também a fotossíntese em condições não limitantes de luz e de CO_2 não recuperou com o alívio das limitações hídricas, e manteve taxas reduzidas semelhantes às das folhas com défices hídricos.

Tanto a actividade inicial como a actividade total da RuBisCO diminuíram nas folhas em stress (determinada nos folíolos utilizados nas medições de trocas gasosas) (FIG. 6.6). No entanto a redução na actividade total foi menor o que parece resultar num decréscimo no estado de activação da RuBisCO induzido pelos défices hídricos. A actividade da RuBisCO recuperou completamente com a rehidratação dos tecidos.

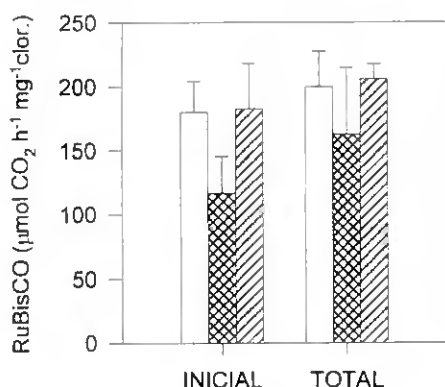


FIGURA 6.6 - Actividade inicial e total da RuBisCO em extractos foliares de plantas regadas (a branco), não regadas (duplo tracejado) e destas depois de reidratadas (tracejado) de *L. albus*; médias (\pm erro padrão) de pelo menos 4 réplicas.

A quantidade de RuBisCO, por outro lado, expressa em função da área foliar (ou mesmo em função da massa foliar seca) permaneceu inalterada durante o stress hídrico mas diminuiu após a rehidratação, apesar das diferenças não serem estatisticamente significativas (TABELA 6.V). Estas alterações reflectem-se na actividade total da enzima quando expressa em função da área (TABELA 6.V). Os valores da actividade e da quantidade da enzima quando expressas em função da clorofila recuperaram nas folhas reidratadas, ou decresceram apenas ligeiramente, porque diminuiu também o teor em clorofila. O teor em proteína solúvel das folhas stress também apresentou a mesma tendência, de diminuição mais acentuada, na rehidratação.

TABELA 6.V - Teores em clorofila, proteína solúvel, quantidade e actividade total de RuBisCO de folhas de plantas regadas (C), não regadas (S) e destas depois de reidratadas (RH) de *L. albus*. Os valores da quantidade de RuBisCO estão expressos em função da área foliar tal como os outros parâmetros, e ainda em função da clorofila e da massa foliar seca (LMA médio para cada tratamento, C = 41.8 g m⁻², S = 45.7 g m⁻², RH = 36.2 g m⁻²). Médias (\pm erro padrão) de pelo menos 4 amostras, com 2 réplicas.

	Clorofila	Prot. Sol.	RuBisCO			
	mg m ⁻²	g m ⁻²	g m ⁻²	mg g ⁻¹ m.s.	mg mg ⁻¹ clr.	µmol m ⁻² s ⁻¹
C	485 \pm 17	7.62 \pm 0.91	1.76 \pm 0.23	38.1 \pm 3.9	3.58 \pm 0.35	15.7 \pm 1.5
S	420 \pm 19	6.69 \pm 1.04	1.99 \pm 0.82	47.2 \pm 9.1	4.62 \pm 0.73	14.3 \pm 3.6
RH	381 \pm 26	5.30 \pm 0.56	1.31 \pm 0.18	35.8 \pm 3.3	3.39 \pm 0.25	11.4 \pm 1.5

Os resultados da quantificação dos açúcares não estruturais revelam que não há diferenças entre os tratamentos nas concentrações de açúcares solúveis das folhas (FIG. 6.7). No entanto são bem diferentes os teores em amido nas folhas dos tratamentos. As folhas stress apresentaram quantidades vestigiais de amido quer de madrugada quer a meio do dia, e iniciaram o restabelecimento das reservas amiláceas após rehidratação (FIG. 6.7).

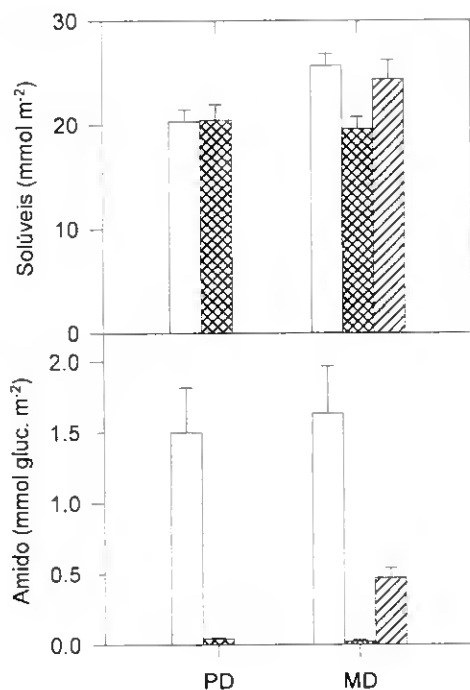


FIGURA 6.7 - Açúcares solúveis (glucose, frutose, sacarose) e amido (em equivalentes glucose) nas amostras de folhas de plantas de *L. albus* regadas (a branco), não regadas (a traço cruzado) e reidratadas (a traço oblíquo), colhidas de madrugada (PD) e a meio do dia (MD); média \pm erro padrão, n=8.

3º ENSAIO (Fevereiro de 1992)

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas plantas de *Lupinus albus* em crescimento vegetativo com cerca de 2 meses de idade, que cresceram sob abrigo no Horto da Universidade do Algarve em vasos de 12 dm³ com uma mistura comercial de turfa e solo da Serra de Monchique. O défice hídrico foi imposto interrompendo a rega durante 17 dias. Nos ensaios anteriores as medições foram efectuadas em folhas adultas de diferentes idades. Neste ensaio as medições foram efectuadas numa folha adulta completamente expandida, correspondente à folha mais nova dos outros ensaios, e numa folha jovem em expansão (i.e., por contagem basípeta, respectivamente, a 9ª e a 5ª folha). Todas as medições foram efectuadas paralelamente nos dois tipos de folhas de plantas regadas (C), não regadas durante 7 (SM) ou 17 (SS) dias, e nestas depois de reidratadas (RH).

Efectuaram-se as seguintes medições: potencial da água e teor relativo em água das folhas de madrugada (PD) e a meio do dia (MD); trocas gasosas, no período da manhã, a concentração ambiente de CO₂ e em condições controladas de luz (840 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), de temperatura (temperatura média da folha de 25°C) e de défice de

pressão de vapor do ar (20 Pa.kPa^{-1}). Os teores foliares em proteína solúvel, RuBisCO e clorofila total foram determinados em amostras colhidas na mesma folha em que foram efectuadas as trocas gasosas. Os açúcares não estruturais (glucose, frutose, sacarose e amido) foram quantificados em amostras foliares colhidas de madrugada e a meio do dia.

RESULTADOS

Nas plantas não regadas o potencial hídrico foliar de madrugada foi diminuindo ao longo dos 17 dias de indução dos défices hídricos atingindo valores mínimos de -0.7 MPa (TABELA 6.VI); o teor relativo em água das folhas não decresceu a meio do dia para além dos 70%. Após rehidratação, e em cerca de 12 horas, os parâmetros hídricos das folhas das plantas em stress mais severo recuperaram para valores muito próximos dos das plantas testemunha. Relativamente aos anos anteriores, neste ensaio obtiveram-se défices hídricos menos severos mas mais prolongados.

TABELA 6.VI - Potencial da água (Ψ) e teor relativo em água (RWC), determinados de madrugada (PD) e a meio do dia (MD), de folhas jovens e adultas de plantas de *Lupinus albus* regadas (C), não regadas durante 10 dias (SM) ou durante 17 dias (SS), e nestas após rehidratação (RH); médias \pm erro padrão, $n = 4$.

		Ψ PD		RWC PD		RWC MD	
		JOVEM	ADULTA	JOVEM	ADULTA	JOVEM	ADULTA
10 dias s/ rega	C	-0.14 ± 0.01	-0.26 ± 0.02	92.3 ± 0.4	95.2 ± 0.5	85.3 ± 1.1	90.0 ± 0.9
	SM	-0.31 ± 0.04	-0.33 ± 0.03	90.0 ± 0.4	94.6 ± 0.4	80.6 ± 0.7	83.2 ± 0.9
17 dias s/ rega	C	-0.20 ± 0.03	-0.18 ± 0.02	92.4 ± 0.1	95.0 ± 0.4	91.5 ± 1.5	87.5 ± 0.4
	SS	-0.61 ± 0.12	-0.79 ± 0.09	80.8 ± 1.9	85.5 ± 1.9	70.7 ± 1.3	73.4 ± 1.9
	RH	-0.28 ± 0.05	-0.29 ± 0.03	89.3 ± 1.2	92.5 ± 0.9	88.4 ± 1.7	89.0 ± 0.5

A taxa de fotossíntese aparente diminuiu um pouco ao longo do ciclo de secura (FIG. 6.8). Contudo, A diminuiu proporcionalmente menos que g_s , observando-se reduções importantes no valor estimado de π . Os valores da condutância estomática das plantas em stress severo decresceram acentuadamente, cerca de 60%, e não recuperaram totalmente 12 horas após rehidratação, passando a apresentar valores de condutância estomática semelhantes aos exibidos pelas plantas em stress hídrico moderado. As diferenças observadas entre folhas jovens e adultas não são estatisticamente significativas.

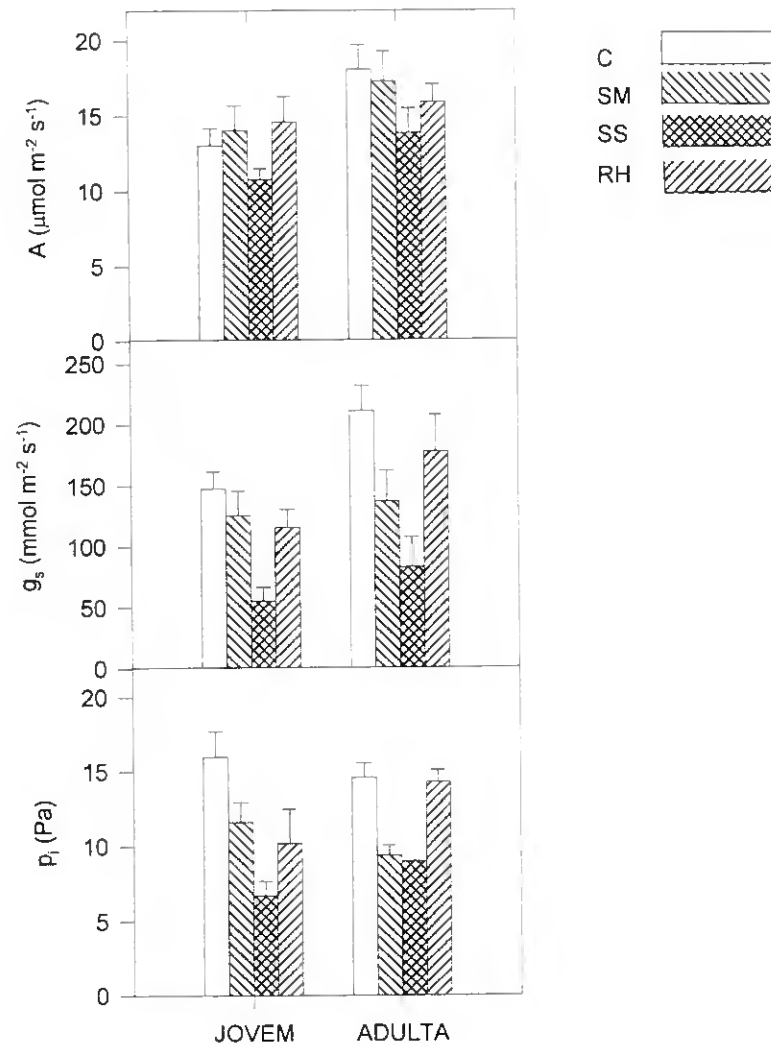


FIGURA 6.8 - Taxa de fotossíntese aparente (A), condutância estomática (g_s) e pressão parcial de CO_2 intercelular (p_i) de folhas jovens e adultas de *Lupinus albus*; medições efectuadas a concentração ambiente de CO_2 , em condições controladas de luz, temperatura da folha e déficit de pressão de vapor do ar, em plantas regadas (C), não regadas durante 10 dias (SM) ou durante 17 dias (SS) e nestas após rehidratação; médias \pm erro padrão, $n = 4$.

Os resultados da quantificação de açúcares não estruturais revelam um pequeno aumento no teor de solúveis e uma forte redução no teor em amido à medida que se intensificam os défices hídricos; estas alterações metabólicas estão patentes nas elevadas razões solúveis/insolúveis das folhas stress (TABELA 6.VII).

TABELA 6.VII - Razão entre o teor em açúcares não estruturais solúveis (glucose, frutose, sacarose) e insolúveis (amido) em folhas jovens (J) e adultas (A) de plantas de *Lupinus albus* regadas (C), não regadas durante 10 dias (SM) ou durante 17 dias (SS) e nestas depois de rehidratadas (RH); médias \pm erro padrão de 4 amostras de cada idade e de cada tratamento colhidas de madrugada (PD) e a meio do dia (MD).

		SOLÚVEIS/INSOLÚVEIS		
			PD	MD
10 dias s/ rega	C	J	1.58 \pm 0.42	0.85 \pm 0.15
		A	2.36 \pm 0.68	1.28 \pm 0.09
	SM	J	0.81 \pm 0.33	2.33 \pm 0.46
		A	0.79 \pm 0.30	2.96 \pm 0.41
17 dias s/ rega	C	J	2.07 \pm 0.28	1.95 \pm 0.62
		A	3.94 \pm 1.50	1.33 \pm 0.17
	SS	J	11.33 \pm 2.94	9.09 \pm 1.78
		A	21.32 \pm 5.58	8.89 \pm 1.80
	RH	J	3.31 \pm 0.78	3.05 \pm 0.69
		A	2.55 \pm 1.32	1.74 \pm 0.63

A quantidade de RuBisCO nos extractos foliares das plantas não regadas diminuiu ao longo do ciclo de secura entre 12% e 39% relativamente às plantas regadas, e decresceu mais acentuadamente nas folhas em stress depois de rehidratadas (TABELA 6.VIII). Nas folhas mais velhas das plantas rehidratadas o teor de RuBisCO reduziu-se em 53% relativamente ao contrôle, o que corresponde a 34 mg g⁻¹ massa foliar seca (ou 108 μ g cm⁻²). No entanto, a maior parte desta redução não ocorreu durante o ciclo de secura, de 34 mg g⁻¹ m.f.s., 22 mg g⁻¹ m.f.s. (ou seja 65%) foi degradada rapidamente durante a rehidratação.

TABELA 6.VIII - Quantidade de RuBisCO em extractos de folhas jovens (J) e adultas (A) de plantas regadas (C), não regadas durante 10 dias (SM) ou 17 dias (SS) e nestas depois de rehidratadas (RH) de *Lupinus albus*, expressa em função da massa foliar seca, da área foliar e do teor em clorofila total: média \pm erro padrão de 4 amostras com duas réplicas.

		RuBisCO		
		mg g ⁻¹ mfs	g m ⁻²	mg mg ⁻¹ clor
C	J	62.2 \pm 10.0	2.03 \pm 0.33	5.32 \pm 0.86
	A	60.6 \pm 9.5	1.90 \pm 0.31	4.97 \pm 0.79
SM	J	37.8 \pm 3.9	1.33 \pm 0.14	2.86 \pm 0.30
	A	51.0 \pm 5.6	1.59 \pm 0.18	3.68 \pm 0.41
C	J	61.6 \pm 10.0	2.10 \pm 0.34	6.52 \pm 1.06
	A	64.7 \pm 11.1	2.32 \pm 0.40	5.48 \pm 0.97
SS	J	54.3 \pm 8.4	2.46 \pm 0.38	4.91 \pm 0.76
	A	52.7 \pm 4.7	2.33 \pm 0.21	4.31 \pm 0.44
RH	J	42.7 \pm 3.7	1.77 \pm 0.16	4.02 \pm 0.36
	A	30.6 \pm 5.5	1.24 \pm 0.23	2.50 \pm 0.46

A contração dos tecidos sujeitos a défices hídricos mais severos parece mascarar o efeito do stress na quantidade de RuBisCO quando esta é expressa em função da área foliar (TABELA 6.VIII), uma vez que só se observa uma diminuição no teor desta enzima nas folhas das plantas em stress moderado ou rehidratadas e cujos teores relativos em água de madrugada são ainda superiores a 90%. Os valores obtidos para as folhas jovens em stress moderado é, mesmo assim, inexplicavelmente muito baixo.

Também os resultados da determinação do teor em clorofilas apresentados na TABELA 6.IX reflectem o aumento real de massa foliar por área amostrada, de que resulta uma maior concentração destes pigmentos por unidade de área foliar nas folhas sujeitas a stress hídrico mais severo; contudo as diferenças entre tratamentos anulam-se quando a clorofila é expressa em função da massa foliar seca.

TABELA 6.IX - Clorofila total em folhas de plantas de *Lupinus albus* regadas (C), não regadas durante 10 dias (SM) ou 17 dias (SS), e nestas depois de rehidratadas (RH), expressa em função da área ou da massa seca; médias \pm erro padrão, n=32 para C e n=16 para os restantes tratamentos; médias significativamente diferentes entre si ($p < 0.01$, Teste de TUKEY) são assinaladas com letras diferentes.

	C	SM	SS	RH
Clr. (mg m^{-2})	397 \pm 12 a	397 \pm 14 a	490 \pm 27 b	400 \pm 18 a
Clr. (mg g^{-1})	12.3 \pm 0.3 a	12.0 \pm 0.4 a	12.7 \pm 0.6 a	11.2 \pm 0.5 a

DISCUSSÃO

Apesar das diferenças de intensidade e de duração dos défices hídricos induzidos nos diferentes ensaios, observa-se uma tendência geral para o decréscimo da actividade inicial da RuBisCO em resultado dos défices hídricos. A actividade total e a quantidade da enzima são sobretudo afectadas nas folhas mais velhas. No entanto, folhas com um teor relativo em água de madrugada de cerca de 66% - ensaios de 1990 e 1991 - apresentam decréscimos na taxa de fotossíntese aparente de 80% relativamente às folhas testemunha, enquanto a actividade inicial da RuBisCO diminui 30%, sobretudo nas folhas mais velhas. Dados da bibliografia referem que apenas o stress hídrico severo ou de maior duração poderão induzir reduções apreciáveis na actividade e na quantidade da RuBisCO e que doutro modo as alterações observadas só parcialmente explicam os acentuados decréscimos na actividade fotossintética (Vu *et al.*, 1987; Mayoral *et al.*, 1981; Vapaavuori, 1986; Sharkey e Seemann, 1989; Fredeen *et al.*, 1991; Gimenez *et al.*, 1992).

Stitt *et al.* (1991) utilizaram plantas transgénicas de tabaco com diferentes teores de RuBisCO, transformadas com a sequência antisense para a pequena sub-unidade daquela enzima, para quantificar o grau de controle exercido pela RuBisCO sobre a fotossíntese em diferentes condições ambientais. Apesar deste estudo não ter sido aplicado a condições de secura no solo, na ausência de limitações hídricas os autores concluem que o coeficiente de controle da RuBisCO para a fotossíntese: (i.) é sempre superior ao dos estomas para as mesmas condições de luz, de CO₂ e de humidade relativa; (ii.) aumenta para condições de baixo CO₂; (iii.) diminui para baixas humidades relativas, e neste caso o controle sobre a taxa fotossintética é

consideravelmente compartilhado com os estomas. As plantas com menores teores de RuBisCO apresentam um padrão de resposta àquelas condições ambientais semelhante ao das plantas não transformadas, no entanto à medida que decresce a quantidade de RuBisCO aumenta o coeficiente de controle por ela exercido. Este coeficiente pode mesmo atingir valores entre 0.8 e 0.9 para condições ambientais extremas (elevadas irradiâncias e temperaturas) como as ensaiadas nas plantas transgênicas de tabaco por Krapp et al. (1994).

No tremoceiro, no 2º ensaio, a inibição fotossintética das folhas stress está associada não só ao encerramento dos estomas mas também a efeitos ao nível do mesófilo (note-se a diminuição da capacidade fotossintética) e a recuperação após rehidratação não é completa (FIG. 6.5). Durante o ciclo de stress a percentagem de activação da RuBisCO decresce cerca de 24% e diminui também a actividade total (FIG. 6.6) o que poderá ser indicador de que nesta espécie a regulação desta enzima por carbamilação e/ou por inibidores possa ser modulada por alterações no estado hídrico dos tecidos como já foi sugerido para outras espécies (Sage et al., 1990; Parry et al., 1993).

Em condições de défice hídrico mais severo (2º ensaio), ou de maior duração (1º e 3º ensaio), o decréscimo na actividade fotossintética observada no tremoceiro poderá resultar de um ajustamento coordenado do teor e actividade da RuBisCO às limitações no crescimento impostas pelos défices hídricos, eventualmente associadas às alterações observadas nos níveis de açúcares solúveis. Vários autores põem a hipótese do stress hídrico, tal como relações source-sink modificadas ou acumulação de hexoses, afectar outros passos enzimáticos do ciclo redutivo do carbono, distintos da carboxilação, que limitam a regeneração da RuBP (Stitt et al., 1990; Krapp et al., 1991; Schäfer et al., 1992; Gunasekera e Berkowitz, 1993).

Os resultados obtidos no presente estudo indiciam para a RuBisCO do tremoceiro um papel de proteína de reserva. Nas folhas que foram sujeitas a défices hídricos a quantidade de RuBisCO, assim como a quantidade de proteína solúvel, parece diminuir gradualmente, no entanto, após a rehidratação dos tecidos é mais acentuado o decréscimo no teor da enzima, expresso em função da área ou da massa foliar seca. Estes resultados estão de acordo com os obtidos em *Beta vulgaris* em stress hídrico (Dreesman et al., 1994). Neste estudo a actividade total específica diminuiu gradualmente apenas 20% durante o período de stress, decresceu 15% mais após a rehidratação e inicia a recuperação 48 horas depois. Os autores observaram decréscimos paralelos quer nos níveis do polipéptido da pequena sub-unidade da RuBisCO quer nos dos respectivos RNAm. Há indicações na bibliografia de que alterações fitohormonais associadas ao stress hídrico, nomeadamente nos níveis de ABA foliar, poderão mediar a inibição da expressão genética do rbcS - gene nuclear para a pequena sub-unidade da RuBisCO (Bartholomew et al., 1991). As células vegetais também parecem responder à diminuição da turgescência celular promovendo a transcrição de alguns genes, nomeadamente de proteases (Guerrero et al., 1990). No entanto, é sugerido que as proteases só penetrem no cloroplasto após alterações específicas ao nível das membranas que modificam a permeabilidade do invólucro plastidial (Stoddart e Thomas, 1982) e estas modificações ultraestruturais parecem ocorrer apenas após a rehidratação dos tecidos (Kaiser, 1982; 1987b). Os cloroplastos apresentam também proteases endógenas mas os mecanismos de regulação da actividade destas enzimas permanecem por esclarecer (Viestra, 1993).

Apesar de neste trabalho os dados respeitantes à actividade da RuBisCO serem limitados, a actividade *in vivo* das folhas stress parece recuperar para valores semelhantes aos das folhas que não foram sujeitas a limitações hídricas, não obstante o decréscimo na quantidade da enzima. A actividade fotossintética em condições ambiente de plantas transgénicas de tabaco é apenas marginalmente inibida - cerca de 6% - para decréscimos na expressão de RuBisCO até 60% da média exibida pelas plantas não transformadas (Stitt *et al.*, 1991; Quick *et al.*, 1991); a redução na quantidade da enzima era naqueles casos compensada pelo aumento do estado de activação. Gunasekera e Berkowitz (1993) apresentam um conjunto de evidências experimentais no mesmo tipo de plantas transgénicas sujeitas a condições de défice hídrico moderado, que suportam a hipótese de que a RuBisCO não constitui a principal limitação à taxa fotossintética naquelas condições, mesmo em plantas com reduções em cerca de 68% naquela enzima.

O efeito da rehidratação na mobilização da RuBisCO parece estar enquadrado num padrão geral de hidrólise das proteínas solúveis, que se reflectiu no caso do tremoeiro numa conspícua e rápida senescência das folhas mais velhas. A senescência foliar nestas condições pode ser interpretada, ao nível da planta inteira, como uma resposta dos indivíduos sujeitos a restrições ambientais erráticas no sentido de simultaneamente limitar os danos (às folhas mais velhas) e de manutenção do potencial produtivo e reprodutor (folhas jovens e ápices caulinares), que Stoddart e Thomas (1982) designaram como senescência "táctica". Outro estudo no tremoeiro em condições de stress hídrico (Ramalho *et al.*, 1992) revela que o número de folhas diminui com os défices hídricos sobretudo em resultado da senescência e queda das folhas mais velhas. Após a rehidratação a taxa de crescimento das folhas foi retomada de tal modo que a área final das folhas que se iniciaram durante o período de stress não foi significativamente afectada. Os autores observaram ainda que os teores de azoto foliar das plantas em stress diminuiu nas folhas basais e aumentou nas folhas apicais, relativamente a folhas da mesma idade/inserção das plantas regadas.

McMichael *et al.* (1973) observaram que plantas envasadas de algodoeiro sujeitas a défices hídricos (potencial da água foliar de madrugada -1 a -2.4 MPa) apenas iniciavam abscisão foliar um dia após a rehidratação, sendo as folhas mais velhas as mais afectadas. Os autores sugeriram que, embora o stress hídrico possa promover alterações no balanço hormonal conducentes à potencial senescência e abscisão foliares, estes fenómenos seriam despoletados irreversivelmente com a rehidratação, através de um processo dependente da turgescência. É possível que no tremoeiro, as modificações pós-rehidratação observadas na senescência foliar (ao nível da planta inteira), e nos teores de RuBisCO (ao nível da folha) radiquem num mecanismo semelhante, já que ambas as espécies apresentam senescência monocárpica e, nestes casos, o défice hídrico poderá constituir um sinal exterior de modulação do programa de desenvolvimento da espécie.

7. CONCLUSÕES GERAIS

O conjunto de resultados apresentados permite adiantar algumas afirmações conclusivas sobre os efeitos da desidratação do solo nas trocas gasosas e metabolismo fotossintético do carbono em plantas C_3 .

A inibição da taxa de fotossíntese em condições de défice hídrico é devida quer a limitações na difusão do CO_2 impostas pelo encerramento dos estomas, quer por limitações ao nível bioquímico do mesófilo. As reacções fotoquímicas revelaram ser muito tolerantes aos défices hídricos. No entanto a importância relativa da componente estomática e não estomática variou nas diferentes espécies analisadas: *Lupinus albus*, *Eucalyptus globulus* e *Vitis vinifera*. A condutância estomática parece ser a principal limitação à fotossíntese em condições de secura do solo. Mas, por exemplo, *V. vinifera* revelou-se mais susceptível às interacções dos défices hídricos com as irradiâncias e temperaturas elevadas que conduziram ao decréscimo, não só da capacidade fotossintética, mas também da razão F_m/F_0 , indicando a ocorrência de fotoinibição. Para *L. albus*, o encerramento estomático constitui a principal limitação à actividade fotossintética em condições de secura, mas a importância relativa desta limitação diminui com a intensidade e duração do stress hídrico. Nestas condições a actividade fotossintética, medida a concentrações de CO_2 saturante, também é afectada. Em dois ensaios nos quais a rega foi suspensa por período idêntico (cerca de 6 dias), uma diferença de 20% no teor relativo em água foliar de madrugada (RWC_{PD} de 85% e de 65%) conduziu ao decréscimo de 40% da capacidade fotossintética que não recuperou após a rehidratação. Por outro lado, comparando ensaios em que a intensidade dos défices hídricos foi semelhante ($RWC_{PD} \sim 85\%$), o prolongamento por mais uma semana na duração do stress induziu também alterações na capacidade fotossintética que foram recuperadas com a rehidratação apenas nas folhas mais jovens. Componentes do mesófilo parecem então ser mais afectadas em condições de stress hídrico prolongado ou mais severo, cujos efeitos são dependentes da idade/estádio de desenvolvimento da folha.

As alterações induzidas pelos défices hídricos na actividade do mesófilo podem ser devidas a mecanismos de inibição feedback associados às condições de crescimento limitado e/ou ao decréscimo na actividade das enzimas fotossintéticas. Nesse sentido foram analisadas as alterações no metabolismo fotossintético da sacarose e do amido, bem como na actividade e quantidade de RuBisCO, como componentes do mesófilo que poderiam estar associados aos efeitos observados do stress hídrico na actividade fotossintética. Para o tremoceiro, os resultados revelaram que um dos primeiros efeitos dos défices hídricos ao nível da folha é a depleção em amido e a manutenção de elevados teores de açúcares solúveis. Este efeito foi igualmente observado em culturas de células heterotróficas em suspensão de *Chenopodium rubrum*, que constituem um sistema-modelo de estudo em tecidos consumidores. Nestas células a acumulação de sacarose deverá estar relacionada com o aumento passivo (em virtude das reduções observadas no volume dos protoplastos) da concentração de metabolitos reguladores, pois não se detectaram alterações na actividade da SPS. Não foi possível analisar se ocorreram alterações na actividade desta enzima no tremoceiro. A manutenção de elevadas concentrações de açúcares

solúveis pode ter um significado aclimatativo importante a dois níveis. Ao nível das relações hídricas foliares, ao contribuir para o ajustamento osmótico, permite a manutenção de turgescência para baixos potenciais hídricos. Ao nível do metabolismo fotossintético, porque pode induzir alterações em algumas enzimas do ciclo de Calvin, nomeadamente na RuBisCO, ajustando a maquinaria fotossintética às condições de crescimento limitado

Os resultados dos estudos sobre os efeitos dos défices hídricos na quantidade e actividade da RuBisCO dão indicações de que as alterações observadas só parcialmente explicam os decréscimos na actividade fotossintética. Os efeitos são dependentes da idade da folha. As folhas mais velhas são as que apresentam reduções paralelas na actividade fotossintética e na quantidade e actividade da RuBisCO. No tremoceiro a RuBisCO parece poder desempenhar um papel de proteína de reserva: nas folhas que foram sujeitas a défices hídricos, especialmente nas folhas mais velhas, a quantidade de RuBisCO diminuiu gradualmente. Foi particularmente notório o efeito da rehidratação ao nível da planta inteira e que é menos referenciado na literatura. As plantas em stress depois de rehidratadas aceleram a senescência das folhas mais velhas e apresentam decréscimos acentuados em compostos azotados, nomeadamente em RuBisCO, efeito este menos pronunciado nas folhas mais jovens. Após a rehidratação, a realocação de compostos azotados nas zonas de crescimento activo e nas folhas jovens, à custa das folhas mais velhas, permite a manutenção do potencial produtivo das plantas sujeitas a défices hídricos ocasionais. Embora não tenham sido efectuadas quaisquer determinações de N nas raízes e caules, não fica excluída a hipótese de que possa ocorrer também mobilização de compostos azotados para aqueles órgãos à medida que se estabelecem os défices hídricos.

Os efeitos *a posteriori* dos défices hídricos e os processos reguladores da recuperação da actividade fotossintética pós-rehidratação, tanto ao nível da componente estomática como da não-estomática, necessitam ser mais bem esclarecidos. É neste sentido que tentaremos desenvolver os próximos estudos, de forma a integrar alterações fitohormonais e na expressão genética associadas ao stress hídrico e à rehidratação com os teores e os padrões das proteínas foliares, designadamente de RuBisCO. Quanto aos métodos de doseamento da RuBisCO, e como foi referido na SECÇÃO 3.2.12 (ii.), os resultados obtidos com anticorpos monoclonais no ELISA indirecto deixam prever a potencialidade da sua utilização na quantificação em extractos brutos. Serão ainda objectivos de estudos a realizar a conjugação desses anticorpos e sua posterior utilização em configurações do ELISA mais vocacionadas para a quantificação, por exemplo o DAS (double antibody sandwich) ELISA.

BIBLIOGRAFIA

1. Ackerson, R.C. (1981) Osmoregulation in cotton in response to water stress. II. *Plant Physiology* **67**: 489-493.
2. Ackerson, R.C. e Hebert, R.R. (1981) Osmoregulation in cotton in response to water stress I. Alterations in photosynthesis, leaf conductance, translocation and ultrastructure. *Plant Physiology* **67**: 484-488.
3. Arnon, D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *beta vulgaris*. *Plant Physiology* **24**: 1-15.
4. 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 & Sons Publ., New York.
5. Azcón-Bieto, J. (1983) Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. *Plant Physiology* **73**: 681-686.
6. Bano, A., Hansen, H., Dörfling, K. e Hahn, H. (1994) Changes in the content of free and conjugated abscisic acid and cytokinins in xylem sap of drought stressed sunflower plants. *Phytochemistry* **37**: 345-347.
7. Bartholomew, D.M., Bartley, G.E. e Scolnik, P.A. (1991) Abscisic acid control of *rbcS* and *cab* transcription in tomato leaves. *Plant Physiology* **96**: 291-296.
8. Beck, E. e Ziegler, P. (1989) Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annual Revue of Plant Physiology* **40**: 95-117.
9. Bensari, M., Calmés, J., e Viala, G. (1990) Répartition du carbone fixé par photosynthèse entre l'amidon et le saccharose dans la feuille de soja. Influence d'un déficit hydrique. *Plant Physiology and Biochemistry* **28**: 113-121.
10. Berkowitz, G.A. e Gibbs, M. (1982) Effect of osmotic stress on photosynthesis studied with isolated spinach chloroplasts. Generation and use of reducing power. *Plant Physiology* **70**: 1143-1148.
11. Berry, J. A. e Downton, W. J. S. (1982) Environmental regulation of photosynthesis. in *Photosynthesis: Development, Carbon Metabolism and Plant Productivity, Vol II*. Academic Press. pp.263-343.
12. Bewley, J.D. e Krochko, J.E. (1982) Desiccation-Tolerance. in Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. e Ziegler, H. (eds.). *Physiological Plant Ecology II. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series Vol. 12B*. A. Pirson e M.H. Zimmermann (eds). Springer-Verlag, Berlin. pp. 325-378.
13. Björkman, O. (1975) Environmental and biological control of photosynthesis in Marcelle, R. (ed.) *Environmental and biological control of photosynthesis*. Dr. W. Junk Publ., The Hague, pp. 1-16.
14. Björkman, O. (1981) Responses to Different Quantum Flux Densities. in Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. e Ziegler, H. (eds.). *Physiological Plant Ecology I. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series Vol. 12A*. A. Pirson e M.H. Zimmermann (eds). Springer-Verlag, Berlin. pp. 57-108.
15. Björkman, O. e Demmig, B. (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**: 489-504.

16. Björkman, O. e Powles, S.B. (1984) Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. *Planta* **161**: 490-504.
17. Björkman, O., Powles, S.B., Fork, D., Öquist, G. (1981) Interaction between high irradiance and water stress on photosynthetic reactions. *Carnegie Institution Year Book* **80**: 57-59.
18. Bradford, K.J. e Hsiao, T.C. (1982) Physiological responses to moderate water stress. in Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. e Ziegler, H. (eds.). *Physiological Plant Ecology II. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series Vol. 12B*. A. Pirson e M.H. Zimmermann (eds). Springer-Verlag, Berlin. pp. 263-324.
19. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
20. Bray, E.A. (1990) Drought-stress-induced polypeptide accumulation in tomato leaves. *Plant, Cell and Environment* **13**: 531-538.
21. Bunce, J.A. (1988) Nonstomatal inhibition of photosynthesis by water stress. Reduction in photosynthesis at high transpiration rate without stomatal closure in field-grown tomato. *Photosynthesis Research* **18**: 357-462
22. Castel, J.R. e Fereres, E. (1982) Responses of young almond trees to two drought periods in the field. *Journal of Horticultural Science* **57**: 175-187.
23. Catt, J.W. e Millard, P. (1988) The measurement of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase concentration in the leaves of potato plants by enzyme linked immunosorption assays. *Journal of Experimental Botany* **39**: 157-164.
24. Chaves, M.M., Osório, M.L., Osório, J. e Pereira, J.S. (1992) The photosynthetic response of *Lupinus albus* to high temperatures is dependent on irradiance and leaf water status. *Photosynthetica* **27**: 521-528.
25. Chaves, M.M. (1991) Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of experimental Botany* **42**: 1-16.
26. Chaves, M.M., Correia, M.J., David, M.M., Osório, J., Osório, M.L. e Pereira, J.S. (1990) Changes in photosynthetic carbon metabolism of *Lupinus albus* induced by slowly imposed soil water deficit. *Physiologia Plantarum* **79**: A132.
27. Cheeseman, J.M. (1991) Patchy: simulating and visualizing the effects of stomatal patchiness on photosynthetic CO₂ exchange studies. *Plant, Cell and Environment* **14**: 593-599.
28. Cheick, N. e Brenner, M.L. (1992) Regulation of key enzymes of sucrose biosynthesis in soybean leaves. Effect of dark and light conditions and role of gibberellins and abscisic acid. *Plant Physiology* **100**: 1230-1237.
29. Collatz, S.B., Badger, M., Smith, C. e Berry, J.A. (1979) A radioimmunoassay for RuP₂ carboxylase protein. *Carnegie Institution Year Book* **78**: 171-175.
30. Coombs, J., Hall, D.O., Long, S.P. e Scurlock, M.O. (1985) *Techniques in bioproductivity and Photosynthesis*. Pergamon Press, Oxford.
31. Cornic, G., Ghashghaie, J. Genty, B. e Briantais, J.-M. (1992) Leaf photosynthesis is resistant to mild drought stress. *Photosynthetica* **27**: 295-309.
32. Cornish, K. e Zevaart, J.A.D. (1984) Abscisic acid metabolism in relation to water stress and leaf age in *Xanthium strumarium*. *Plant Physiology* **76**: 1029-10035.

33. Cornish, K. e Zeevaart, J.A.D. (1985) Movement of abscisic acid into the apoplast in response to water stress in *Xanthium strumarium*. *Plant Physiology* **78**: 623-626.
34. Correia, M.J. (1993) *Envolvimento do ácido abscísico na regulação da abertura estomática em condições de défice hídrico*. Tese de Doutoramento, Universidade do Algarve, Faro.
35. Correia, M.J., Pereira, J.S. Chaves, M.M. Rodrigues, M.L. e Pacheco, C.A. (no prelo) ABA concentrations in xylem sap determine maximum daily stomatal aperture but not the diurnal variation in conductance in field-grown *Vitis vinifera* plants. *Plant, Cell and Environment*.
36. Correia, M.J. e Pereira, J.S. (1994) Abscisic acid in apoplastic sap can account for the restriction in leaf conductance of white lupins during moderate soil drying and after rewatering. *Plant Cell and Environment* **17**: 845-852.
37. Correia, M.J., Chaves, M.M. e Pereira, J.S. (1990) Afternoon depression in photosynthesis in grapevines - Evidence for high light stress effect. *Journal of Experimental Botany* **41**: 417-426.
38. Cowan, I.R. e Farquhar, G.D. (1977) Stomatal function in relation to leaf metabolism and environment. in Jennings, D.H. (ed.). *Integration of Activity in Higher Plants*. University Press, Cambridge. pp. 471-505.
39. Crafts-Brandner, S.J., Salvucci, M.E. e Egli, D.B. (1990) Changes in ribulose biphosphate carboxylase/ oxygenase and ribulose 5-phosphate kinase abundances and photosynthetic capacity during leaf senescence. *Photosynthesis Research* **23**: 223-230.
40. Cruz, R.T., Jordan, W.R., e Drew, M.C. (1992) Structural changes and associated reduction of hydraulic conductance in roots of *Sorghum bicolor* L. following exposure to water deficit. *Plant Physiology* **99**: 203- 212.
41. Cutler, J.M., Rains, D.W., Loomis, R.S. (1977) The importance of cell size in the water relations of plants. *Physiologia Plantarum* **40**: 255-260.
42. Dai, Z., Edwards, G.E. e Ku, M.S.B. (1992) Control of photosynthesis and stomatal conductance in *Ricinus communis* L. (castor bean) by leaf air vapor pressure deficit. *Plant Physiology* **99**: 1426-1434.
43. Dale, J.E. (1988) The control of leaf expansion. *Annual revue of Plant Physiology* **39**: 267-295.
44. Dancer, J., David, M.M. e 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.
45. Daveau, S. (1988) Organização, comentários e actualização. in Ribeiro, O. e Lautensach, H. *Geografia de Portugal. II. O Ritmo Climático e a Paisagem*. Sá da Costa (ed.), Lisboa.
46. Davies, W.J. e Zhang, J. (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Revue of Plant Physiology* **42**: 55-76.
47. Davies, W.J., Mansfield, T.A. e Hetherington, A.M. (1990) Sensing of soil water status and the regulation of plant growth and development. *Plant, Cell and Environment* **13**: 709-719.
48. Davis, S.C., van Bavel, C.H.M. e McCree, K.J. (1977) Effect of leaf aging upon stomatal resistance in bean plants. *Crop Science*. **17**: 640-645.

49. DeJong, T.M. e Doyle, J.F. (1985) Seasonal relationships between leaf nitrogen content (photosynthetic capacity) and leaf canopy light exposure in peach (*Prunus persica*). *Plant, Cell and Environment* **8**: 701-706.
50. Demirevska-Kepova, K., Kandiisky, D. e Juperlieva-Mateeva, B. (1990) Quantitative determination of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in leaf extracts from barley plants by enzyme-linked immunosorbent assay. *Photosynthetica* **24**: 637-640.
51. Demmig, B. e Björkman, O. (1987) Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher plants *Planta* **171**: 171-184.
52. Dickman, D.I., Gjerstad, D.H. e Gorgon, J.C. (1975) Developmental patterns of CO₂ exchange, diffusion resistance and protein synthesis in leaves of *Populus x Euroamericana*. in Marcelle, R. (ed.) *Environmental and Biological Control of Photosynthesis*. pp. 171-181. Dr.W. Junk Publ., The Hague.
53. Dietz, K-J. e Heber, U. (1983) Carbon dioxide gas exchange and the energy status of leaves of *Primula palinuri* under water stress. *Planta* **158**: 349-56.
54. Dohelert, D.C. e Huber, S.C. (1983) Regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase by glucose-6-phosphate, inorganic phosphate and pH. *Plant Physiology* **73**: 989-994.
55. Dreesmann, D.C., Harn, C. e Daie, J. (1994) Expression of genes encoding Rubisco in sugarbeet (*Beta vulgaris*) plants subjected to gradual desiccation. *Plant Cell Physiology* **35**: 645-653.
56. Drossopoulos, J.B., Karamanos, A.J. e Niavis, C.A. (1987) Changes in ethanol soluble carbohydrates during the development of two wheat cultivars subjected to different degrees of water stress. *Annales of Botany* **59**: 173- 180.
57. Dubbe, D.R., Farquhar, G.D., Raschke, K. (1978) Effect of abscisic acid on the gain of the feedback loop involving carbon dioxide and stomata. *Plant Physiology* **62**: 413-417.
58. Duckham, S.C., Linforth, R.S.T. e Taylor, I.B. (1991) Abscisic-acid-deficient mutants at the *aba* gene locus of *Arabidopsis thaliana* are impaired in the epoxidation of zeaxanthin. *Plant, Cell and Environment* **14**: 601-606.
59. Ellsworth, D.E. e Reich, P.B. (1992) Water relations and gas exchange of *Acer saccharum* seedlings in contrasting natural light and water regimes. *Tree Physiology* **10**: 1-20.
60. Epron, D. e Dreyer, E. (1990) Stomatal and non-stomatal limitation of photosynthesis by leaf water deficits in three oak species: a comparison of gas exchange and chlorophyll fluorescence data. *Annales des Sciences Forestières* **47**: 435-450.
61. Epron, D., Dreyer, E. e Bréda, N. (1992) Photosynthesis of oak trees [*Quercus petraee* (Matt.) Liebl] during drought under field conditions: diurnal course of net CO₂ assimilation and photochemical efficiency of photosystem II. *Plant, Cell and Environment* **15**: 809-820.
62. Erickson, R.O. e Michelini, F.J. (1957) The plastochron index. *American Journal of Botany* **44**: 297-305.
63. Esau, K. (1960) *Anatomy of Seed Plants*. Wiley Int. (ed.). New York.
64. Evans, J.R. (1983) Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology* **72**: 297-302.

65. Evans, J.R. (1989) Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. *Oecologia* **78**: 9-19.
66. Evans, J.R. e Terashima, I. (1987) Effects of nitrogen nutrition on electron transport components and photosynthesis in spinach. *Australian Journal of Plant Physiology* **14**: 59-68.
67. Farquhar, G.D. e Sharkey, T.D. (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Revue of Plant Physiology* **33**: 317-345.
68. Farquhar, G.D. e von Caemmerer, S. (1982) Modelling of photosynthetic response to environmental conditions. in Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. e Ziegler, H. (eds.). *Physiological Plant Ecology II. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series Vol. 12B. A.* Pirson e M.H. Zimmermann (eds). Springer-Verlag, Berlin. pp. 549-587.
69. Farquhar, G.D., Hubick, K.T., Terashima, I., Condon, A.G. (1987) Genetic variation in the relationship between photosynthetic CO₂ assimilation rate and stomatal conductance to water loss. in Biggins, J. (ed) *Progress in Photosynthesis Research Vol. 4.* Martinus Nijhoff, Dordrecht. pp. 209-212.
70. Farquhar, G.D., von Caemmerer, S. e Berry, J.A. (1980) A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* **149**: 78-90.
71. Fellows, R.J. e Boyer, J.S. (1976) Structure and activity of chloroplasts of sunflower leaves having various water potentials. *Planta* **132**: 229-239.
72. Fereres, E., Cruz-Romero, G., Hoffman, G.F. e Rawlins, S.L. (1979) Recovery of orange trees following severe water stress. *Journal of Applied Ecology* **16**: 833-842.
73. Field, C.B. (1987) Leaf age effects on stomatal conductance. in Zeiger et al. (eds) *Stomatal Function.* Stanford Univ. Press, Stanford, California. pp. 367-384.
74. Field, C. (1981) Leaf age effects on the carbon gain of individual leaves in relation to microsite. in Margaris, N.S. and Mooney, H.A. (eds) *Components of productivity of mediterranean-climate regions - Basic and applied aspects.* Dr W. Junj Publ., The Hague, pp. 41-50.
75. Flügge, U. e Heldt, H.W. (1991) Metabolite translocators off the chloroplast envelope. *Annual Revue of Plant Physiology* **42**: 129-144.
76. Foyer, C.H. (1987) The basis for source-sink interaction in leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* **25**: 649-657.
77. Foyer, C.H. (1988) Feedback inhibition of photosynthesis through source-sink regulation in leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* **26**: 483-492.
78. Fredeen, A.L., Gamon, J.A. e 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.
79. Frederick, J.R., Alm, D.M. e Hesketh, J.D. (1989) Leaf photosynthetic rates, stomatal resistances and internal CO₂ concentrations of soybean cultivars under drought stress. *Photosynthetica* **23**: 575-584.
80. Frederick, J.R., Alm, D.M., Hesketh, J.D. e Below, F.E. (1990) Overcoming drought-induced decreases in soybean leaf photosynthesis by measuring with CO₂ enriched air. *Photosynthesis Research* **25**: 49-57.
81. Friederich e Huffaker (1980) Photosynthesis, leaf resistance and ribulose-1,5-bisphosphate carboxilase degradation in senescing barley leaves. *Plant Physiology* **65**: 1103-1107.

82. Galtier, N., Foyer, C.H., Huber, J., Voelker, T.A. e Huber, S.C. (1993) Effects of elevated sucrose-phosphate synthase activity on photosynthesis assimilate partitioning and growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* var. VC 82B). *Plant Physiology* **101**: 535-543.
83. Geiger, D.R. (1987) Understanding interactions of source and sink regions of plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **25**: 659-666.
84. Gepstein, S. (1988) Photosynthesis in Noodén, L.D. e Leopold, A.C. (eds.) *Senescence and aging in plants*. Academic Press, San Diego, pp.85-109.
85. Gerhardt, R., Stitt, M. e Heldt, H.W. (1987) Subcellular metabolite levels in spinach leaves. Regulation of sucrose synthesis during diurnal alterations in photosynthetic partitioning. *Plant Physiology* **83**: 399-407.
86. Ghashgaie, J. e Saugier, B. (1989) Effects of nitrogen deficiency on leaf photosynthetic response of tall fescue to water deficit. *Plant, Cell and Environment* **12**: 261-271.
87. Gifford, R.M., Thorne, J.H., Hitz, W.d. e Gianquinta, R.T. (1984) Crop productivity and photoassimilate partitioning. *Science* **225**: 801-808.
88. Gimenez, C., Mitchell, V.J. e Lawlor, D.W. (1992) Regulation of photosynthetic rate of two sunflower hybrids under water stress. *Plant Physiology* **98**: 516-524.
89. Gimenez, C., Mitchell, V.J. e Lawlor, D.W. (1992) Regulation of photosynthetic rate of two sunflower hybrids under water stress. *Plant physiology* **98**: 516-524.
90. Goldschmidt, E.E. e Huber, S.C. (1992) Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose and hexoses sugars. *Plant Physiology* **99**: 1443-1448.
91. Gollan, T., Passioura, J.B. e Munns, R. (1986) Soil water stress affects the stomatal conductance of fully turgid wheat and sunflower leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **13**: 459-464.
92. Gowing, D.J.G., Davies, W.J. e Jones, H.P. (1990) A positive root-sourced signal as an indicator of soil drying in apple, *Malus x domestica* Borkh.. *Journal of Experimental Botany* **41**: 1535-1540.
93. Guerrero, F.D., Jones, J.T. e Mullet, J.E. (1990) Turgor responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Molecular Biology* **15**: 11-26.
94. Gulmon, S.L. e Chu, C.C. (1981) The effects of light and nitrogen on photosynthesis, leaf characteristics and dry matter allocation in the chaparral shrub *Diplacus aurantiacus*. *Oecologia* **49**: 207-212.
95. Gunasekera, D. e Berkowitz, G.A. (1993) Use of transgenic plants with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase antisense DNA to evaluate the rate limitation of photosynthesis under water stress. *Plant Physiology* **103**: 629-635.
96. Gunasekera, D. e Berkowitz, G.A. (1992) Heterogenous stomatal closure in response to leaf water deficits is not a universal phenomenon. *Plant Physiology* **98**: 660-665.
97. Gutteridge, S. (1990) Limitations of the primary events of CO₂ fixation in photosynthetic organisms: the structure and mechanisms of Rubisco.
98. Guy, C., Haskell, D., Neven, L., Klein, P. e Smelser, C. (1992) Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach. *Planta* **188**: 265-270.

99. Hanson, A.D. e Hitz, W.D. (1982) metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Annual Revue of Plant Physiology* **33**: 163-203.
100. Harley, P.C., Loreto, F., DiMarco, G. e Sharkey, T.D. (1992) Theoretical considerations when estimating the mesophyll conductance to CO₂ flux by analysis of the response of photosynthesis to CO₂. *Plant Physiology* **98**: 1429-1436.
101. Hashimoto, H. Kura-Hotta, M. e Katoh, S. (1989) Changes in protein content and in structure and number of chloroplasts during leaf senescence in rice seedlings. *Plant Cell Physiology* **30**: 707-715.
102. Havaux, M. (1992) Stress tolerance of photosystem II *in vivo*. Antagonistic effects of water, heat and photoinhibition stresses. *Plant Physiology* **100**: 424-432.
103. Hawker, J.S., Jenner, C.F. e Niemietz, C.M. (1991) Sugar metabolism and compartmentation. *Australian Journal of Plant Physiology* **18**: 227-237.
104. Herold, A. (1980) Regulation of photosynthesis by sink activity: the missing link. *New Phytologist* **86**: 131-144.
105. Herzog, B., Stitt, M. e Heldt, H.W. (1984) Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2,6-bisphosphate. III. Properties of the cytosolic fructose 1,6-bisphosphate. *Plant Physiology* **75**: 561-565.
106. Ho, L.C. (1988) Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annual Revue of Plant Physiology* **39**: 355-378.
107. Ho, L.C. (1979) Partitioning of ¹⁴C-assimilate within individual tomato leaves in relation to the rate of export. in Marcelle, Clijsters e van Poucke (eds.) *Photosynthesis and plant development*. Dr.W. Junk Publ., The Hague, pp. 243-250.
108. Ho, T.-Y. e Mishkind, M.L. (1991) The influence of water deficits on mRNA levels of tomato. *Plant, Cell and Environment* **14**: 67-75.
109. Horsenall, J. (1984) Studies in the digestion of plant proteins by ruminants. *Tese de Doutorado*. Universidade de Cambridge. *op. cit.* Catt e Millard, 1988.
110. Hsiao, T.C. (1973) Plant responses to water stress. *Annual Revue of Plant Physiology* **24**: 519-570.
111. Hsiao, T.C., Ferreres, E., Acevedo, E., Henderson, D.W. (1976) Water stress and dynamics of growth and yield of crop plants. in Lange, O.L., Kappen, L. e Schulze, E.-D. (eds.). *Water and Plant Life Problems and Modern Approaches*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 281-305.
112. Huber, S.C., Huber, J.A. e Hanson, K.R. (1990) Regulation of the partitioning of products of photosynthesis. in Zelitch, I. (ed.) *Perspectives in Biochemical and Genetic Regulation of Photosynthesis* pp. 85-101. Alan R. Liss, Inc.
113. Huber, S.C. (1989) Biochemical mechanism for regulation of sucrose accumulation in leaves during photosynthesis. *Plant Physiology* **91**: 656-662.
114. Huber, S.C. e Huber, J.L. (1992) Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. *Plant Physiology* **99**: 1275-1278.
115. Huber, S.C. e Huber, J.L., Campbell, W.H. e Redinbaugh, M.G. (1992a) Apparent dependence of the light activation of nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase activities in spinach leaves on protein synthesis. *Plant Cell Physiology* **33**: 639-646.

116. Huber, S.C. e Huber, J.L., Campbell, W.H. e Redinbaugh, M.G. (1992b) Comparative studies of the light modulation of nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase activities in spinach leaves. *Plant Physiology* **100**: 706-712.
117. Huber, S.C., Rogers, H.H. e 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
118. Huck, M.G., Ishiara, K., Peterson, C.M. e Ushijima, T. (1983) Soybean adaptation to water stress at selected stages of growth. *Plant Physiology* **73**: 422-427.
119. Huffaker, R.C. (1982) Biochemistry and physiology of leaf proteins. in Boulter, D. e Parthier, B. (ed.), Nucleic Acids and proteins in plants I. Structure biochemistry and Physiology of proteins. *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series* Vol. 14A. Springer Verlag, Berlin, pp. 370- 400.
120. Hurewitz, J. e James, H.W. (1987) The relationship between the activity and the activation state of RuBPCarboxylase and carbon exchange rate affected by sink and developmental changes. *Photosynthesis Research* **12**: 105-117.
121. Huseman, W. e Barz, W. (1977) Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Physiologia Plantarum* **40**: 77-81.
122. Jensen, R.G. e Bahr, J.T. (1977) Ribulose 1.5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Annual Revue of Plant Physiology* **28**: 379-400.
123. Jones, H.G. (1973) Limiting factors in photosynthesis. *New Phytologist* **72**: 1089-1094
124. Jones, H.G. (1992) *Plants and microclimate*. Cambridge University Press, Cambridge (2^a ed.).
125. Jones, H.G. (1985) Partitioning stomatal and non-stomatal limitations to photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* **8**: 95-104
126. Jones, M.G.K., Outlaw, W.H. e Lowry, O.H. (1977) Enzymic assay of 10⁻⁷ to 10⁻¹⁴ moles of sucrose in plant tissues. *Plant Physiology* **60**: 379-383.
127. Jones et al. (1980) *Australian Journal of Plant Physiology* **7**: 181-192.
128. Kacser, H. e Burns, J.A. (1973) The control of flux. *Symposium of the Society for Experimental Biology* **27**: 65-107.
129. Kaiser, W. e Brendle-Behnish, E. (1991) Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase activity by photosynthesis. I. Modulation *in vivo* by CO₂ availability. *Plant Physiology* **96**: 363-367.
130. Kaiser, W. e Förster, J. (1989) Low CO₂ prevents nitrate reduction in leaves. *Plant Physiology* **91**: 970-974.
131. Kaiser, W. M. (1987b) Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum* **71**: 142-149.
132. Kaiser, W.M. (1982) Correlation between changes in photosynthetic activity and changes in total protoplast volume in leaf tissue from hygro-, meso- and xerophytes under osmotic stress. *Planta* **154**: 538-545.
133. Kaiser, W.M. (1983a) Photosynthetic activity and osmotic volumes of isolated-intact chloroplasts and of cells in leaf tissue from various plants under osmotic stress. in Marcelle, R., Clijsters, H. e van Poucke, M. (eds.). *Effects of Stress on Photosynthesis*. Advances in Agricultural Biotechnology. Martinus Nijhoff, The Hague. pp. 55-63.

134. Kaiser, W.M. (1983b) Sites and mechanisms for the inhibition of photosynthesis by water stress. *in Photosynthesis Meeting*. Brussels.
135. Kaiser, W.M. (1987a) Non-stomatal, primary dehydration effects on photosynthesis: Possible mechanisms for reversible and irreversible damage. *in Interdisciplinary Plant Group, Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology, Vol. 6*. University of Missouri Press, Columbia. pp.119-133.
136. Kaiser, W.M. e Heber, U. (1981) Photosynthesis under osmotic stress. Effect of high solute concentrations on the permeability properties of the chloroplast envelope and on activity of stroma enzymes. *Planta* **153**: 423- 429.
137. Kaiser, W.M., Prachuab, G., Kaiser, G., Wildman, S.G. e Heber, U. (1981) Photosynthesis under osmotic stress: Inhibition of photosynthesis of intact chloroplasts, protoplasts and leaf slices at high osmotic potentials. *Planta* **153**: 416-422.
138. King, S.W., Vierling, R.A. e Nguyen, H.T. (1992) Changes in mRNA species during drought stress in winter wheat. *Crop Science* **32**: 822-825.
139. Kirschbaum, M.U.F. (1987) Water stress in *Eucalyptus pauciflora*: comparison of effects on stomatal conductance with effects on the mesophyll capacity for photosynthesis, and investigation of a possible involvement of photoinhibition. *Planta* **171**: 466-473.
140. Kobayashi, Y., Köster, S. e Heber, U. (1982) Light scattering, chlorophyll fluorescence and state of adenylate system in illuminated spinach leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* **682**: 44-54.
141. Krapp, A., Chaves, M.M., David, M.M., Rodrigues, M.L. Pereira, J.S. e Stitt, M. (1994) Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in transgenic tobacco transformed with 'antisense' *rbcS*. VIII. Impact on photosynthesis and growth in tobacco growing under extreme high irradiance and high temperature. *plant, Cell and Environment*. **17**: 945-953.
142. Krapp, A., Quick, W.P. e Stitt, M. (1991) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase, other Calvin cycle enzymes, and chlorophyll decrease when glucose is supplied to mature spinach leaves via the transpiration stream. *Planta* **186**: 58-69.
143. Ku, M.S.B., Scmitt, M.R. e Edwards, M.R. (1979) Quantitative determination of RuBP Carboxylase -Oxygenase in leaves of several C3 and C4 plants. *Journal of Experimental Botany* **30**: 89-98.
144. Lammattina, L., Lezica, R.P. e Conde, R.D. (1985) Protein metabolism in senescing wheat leaves. *Plant Physiology* **77**: 587-590.
145. Lange, O.L. e Tenhunen, J.D. (1984) A minicuvette system for measurement of CO₂ exchange and transpiration of plants under controlled conditions in field and laboratory. Heinz Walz (ed.), Effeltrich.
146. Laurell, C.-B. (1966) Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Analytical Biochemistry* **15**: 45-52.
147. Lawlor, D.W. e Milford, G.F.J. (1975) The control of water and carbon dioxide flux in water stressed sugar beet. *Journal of Experimental Botany* **26**: 657-665.
148. Lawlor, D.W. (1983) Integration of biochemical processes in the physiology of water stressed plants. *in* Marcelle, R., Cljisters, H. e van Poucke, M. (eds.). *Effects of Stress on Photosynthesis*. Advances in Agricultural Biotechnology. Martinus Nijhoff. The Hague. pp. 35-44.

149. Lawlor, D.W. (1993) Regulation of photosynthesis and associated metabolism in water stressed leaves. *in Relaciones Hidricas en las Plantas*. 1.er. Simposium Hispano-Portugues, Palma de Mallorca. pp. 35-44.
150. Lawlor, D.W. e Fock (1978) Photosynthesis, respiration and carbon assimilation in water stressed maize at two oxygen concentrations. *Journal of Experimental Botany* **29**: 579-593.
151. Lawlor, D.W. e Leach, J.E. (1985) Leaf growth and water deficits: bichemistry in relation to biophysics. *in Baker, N.R., Davies, W.J. e Ong, C.K. (eds.) Control of leaf growth*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 267-294.
152. Leegood, R.C. (1984) Regulation of photosynthetic CO₂- pathway enzymes by light and other factors. *in 4th Congress FESPP, Strasbourg*. pp. 10.
153. Lichtenthaler, H.K. e Rinderle, U. (1988) The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *Analytical Chemistry* **19**: S29-S85.
154. Lilley, R.M.C. e Walker, D.A. (1974) An improved spectrophotometric assay for ribulose biphosphate carboxylase. *Biochimica et Biophysica Acta* **358**: 226-229.
155. Lloyd, J., Syversten, J.P., Kriedeman, P.E. e Farquhar, G.D. (1992) Low conductance for CO₂ diffusion from stomata to the sites of carboxylation in leaves of woody species. *Plant Cell and Environment* **15**: 873-899.
156. Loreto, F. e Sharkey, T.D. (1990) Low humidity can cause uneven photosynthesis in olive (*Olea europea* L.) leaves. *Tree physiology* **6**: 409-415.
157. Loreto F., Harley, P.C., DiMarco, G. e Sharkey, T.D. (1992) Estimation of mesophyll conductance to CO₂ flux by three different methods. *Plant Physiology* **98**: 1437-1443.
158. Lorimer, G.H. (1981) The carboxylation and oxygenation of Ribulose 1,5-bisphosphate: the primary events in photosynthesis and photorespiration. *Annual Revue of Plant Physiology* **32**: 49-83.
159. Lorimer, G.H., Badger, M.R. e Andrews, T.J. (1977) D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. Improved methods for the activation and assay of catalytic activities. *Analytical Biochemistry* **78**: 66-75.
160. Loske, D. e Raschke, K. (1988) Determination of carbon-reduction-cycle intermediates in leaves of *Arbutus unedo* L. suffering depressions in photosynthesis after application of abscisic acid or exposure to dry air. *Planta* **173**: 275-281.
161. Loveys, B.R. e Kriedmann, P.E. (1973) Rapid changes in abscisic acid-like inhibitions following alterations in vine leaf water potential. *Physiologia Plantarum* **28**: 476-479.
162. Ludlow, M.M. (1975) Effect of water stress on the decline of leaf net photosynthesis with age. *in Marcelle, R. (ed) Environmental and Biological Control of Photosynthesis*. pp. 123-134. Dr. W. Junk Publ., The Hague.
163. Lurie, S., Paz, N., Struch, N. e Bravdo, B.A. (1979) Effect of leaf age on photosynthesis and photorespiration. *in Marcelle, Clijsters e van Poucke (eds.) Photosynthesis and plant development*. Dr. W. Junk Publ., The Hague. pp. 31-38.
164. Makino, A., Mae, T., Ohira, K. (1984) Effect of nitrogen, phosphorus or potassium on the photosynthetic rate and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase content in rice leaves during expansion. *Soil Science and Plant Nutrition* **30**: 63-70.

165. Makino, A. e Osmond, B. (1991) Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. *Plant Physiology* **96**: 355-362.
166. Maksymowitch, R. (1973) *Analysis of leaf development*. Cambridge Univ. Press, London.
167. Mancini, G., Carbonara, A.O. e Heremans, J.F. (1965) Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* **2**: 235-254.
168. Mansfield, T.A., Hetherington, A.M. e Atkinson, C.J. (1990) Some current aspects of stomatal physiology. *Annual Revue of Plant Physiology* **41**: 55-75.
169. Martin, B. e Ruiz-Torres, N.A. (1992) Effects of water deficits stress on photosynthesis, its components and component limitations, and on water use efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology* **100**: 733-739.
170. Massacci, A., Corradini, D., di Marco, G. e Giardi, M.T. (1987) Ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase protein in higher plants by a new rapid HPLC method. in Biggins, J. (ed) *Progress in Photosynthesis Research. Vol III*. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, pp. 5.427-5.430.
171. Matthews, M.A. e Boyer, J.S. (1984) acclimation of photosynthesis to low leaf water potentials. *Plant Physiology* **74**: 161-166.
172. Mayoral, M.L., Atsmon, D. Shimushi, D. e Gromet-Elhanan, Z. (1981) Effect of water stress on enzyme activities in wheat and related wild species: carboxylase activity, electron transport and photophosphorylation in isolated chloroplasts. *Australian Journal of Plant Physiology* **8**: 385-393.
173. McCoy, E.L., Boersma, L. e Ekasingh, M. (1990) Net carbon allocation in soybean seedlings as influenced by soil water stress at two soil temperatures. *Botanical Gazette* **151**: 497-505.
174. McMichael, B.L., Jordan, W.R. e Powell, R.D. (1973) Abscission processes in cotton: induction by water deficit. *Agronomy Journal* **65**: 202-204.
175. Meidner, H. e Mansfield, T.A. (1968) *Physiology of stomata*. McGraw-Hill, London.
176. Metcalfe, J.C., Davies, W.J. e Pereira, J.P. (1989) Leaf growth of *Eucalyptus globulus* seedlings under water deficit. *Tree Physiology* **6**: 221-227.
177. Metodiev, M. e Demirevska-Kepova, K. (1992) Rubisco Quantitation in leaves of different varieties by enzyme-linked immunisorbent assay. *Journal of Experimental Botany* **43**: 155-158.
178. Meyer, S. e Kouchkovsky, Y. (1992) ATP'ase state and activity in thylacoids from normal and water-stressed lupins. *FEBS Letter* **303**: 233-236.
179. Milthorpe, I.L. e Moorby, J. (1969) Vascular transport and its significance in plant growth. *Annual Revue of Plant Physiology* **20**: 117-138.
180. Montenegro, G., Riveros, F, e Alcalde, C. (1980) Morphological structure and water balance of four chilean shrub species. *Flora* **170**: 554-564.
181. Mooney, H.A. e Gulmon, S.L. (1982) Constraints on leaf structure and function in reference to herbivory. *BioScience* **32**: 198-206.
182. Mooney, H.A., Björkman, O. e Collatz, G.J. (1977) Photosynthetic acclimation to temperature and water stress in the desert shrub *Larrea divaricata*. *Carnegie Institution Year Book* **76**: 328-335.

183. Mooney, H.A., Ferrar, P.J. e Slatyer, R.O. (1978) Photosynthetic capacity and carbon allocation patterns in diverse growth forms of *Eucalyptus*. *Oecologia* **36**: 103-111.
184. Mooney, H.A., Harrison, A.T. e Morrow, P.A. (1975) Environmental limitations of photosynthesis on a californian evergreen shrub. *Oecologia* **19**: 293-301.
185. Morgan, J.M. (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Revue of Plant Physiology* **35**: 299-319.
186. Mota, M. (1986) Conservação dos recursos genéticos de proteaginosas. O caso dos *Lupinus* em especial. in I Jornadas Portuguesas de Proteaginosas. E.A.N., Oeiras (Portugal). pp. 55-61.
187. Munns, R. e Sharp, R.E. (1993) Involvement of abscisic acid in controlling plant growth in soils of low water potential. *Australian Journal of Plant Physiology* **20**: 425-437.
188. Munns, R. (1993) Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypothesis. *Plant, Cell and Environment* **16**: 15-24.
189. Munns, R. e Weir, R. (1981) Contribution of sugars to osmotic adjustment in elongating and expanded zones of wheat leaves during moderate water deficits at two light intensities. *Australian Journal Plant Physiology* **8**: 93-105.
190. Murashige, T. e Skooge, F. (1962) A revised media for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.
191. Neales, T.F. e Incoll, L.D. (1968) The control of leaf photosynthesis rate by the level of assimilate concentration in the leaf. A review of the hypothesis. *Botanical review* **34**: 107-125.
192. Neuhaus, H.E., Quick, W.P. Siegl, G. e Stitt, M. (1990) Control of photosynthate partitioning in spinach leaves. Analysis of the interaction between feedforward and feedback regulation of sucrose synthesis. *Planta* **181**: 583-592.
193. Neuhaus, H.E., Kruckeberg, A.L., Feil, R. e Stitt, M. (1989) Reduced activity mutants of phosphoglucose isomerase in the cytosol and chloroplast of *Clarkia xantiana*. II. Study of the mechanisms which regulate photosynthate partitioning. *Planta* **178**: 110-122.
194. Ng, T.T., Wilson, J.r. e Ludlow, M.M. (1975) Influence of water stress on water relations and growth of a tropical C4 grass *Panicum maximum* var. trichoglume. *Australian Journal of Plant Physiology* **2**: 581-595.
195. Ni, B.R. e Pallardy, S.G. (1992) Stomatal and non-stomatal limitations to net photosynthesis in seedlings of woody Angiosperms. *Plant Physiology* **99**: 1502-1508.
196. Noodén, L.D. (1988) The phenomena of senescence and aging. in Noodén, L.D. e Leopold, A.C. (eds.) *Senescence and aging in plants*. Academic Press, San Diego, pp. 2- 50.
197. Olesinski, A.A., Wolf, S., Rudich, J. e Marani, A. (1989) Effect of leaf age and shading on photosynthesis in potatoes (*Solanum tuberosum*). *Annales of Botany* **64**: 643-650.
198. Ortiz-Lopez, A., Ort, D.R. e Boyer, J.S. (1991) Photophosphorylation in attached leaves of *Helianthus annuus* at low water potentials. *Plant Physiology* **96**: 1018-1025.
199. Ottoo, e., Ishii, R. e Kumara, A. (1989) Interaction of nitrogen supply and soil stress on photosynthesis and transpiration in rice. *Journal of Crop Science*. **58**: 424_429.

200. Paech, C. e Dybing, C.D. (1986) Purification and degradation of ribulose biphosphate carboxylase from soybean leaves. *Plant Physiology* **81**: 97-102.
201. Pammenter, N.W., Loreto, F. e Sharkey, T.D. (1993) End product Feedback on photosynthetic electron transport. *Photosynthesis Research* **35**: 5-14.
202. Parry, M., Delgado, E., Vadell, J., Keys, A., Lawlor, D.W. e Medrano, H. (1993) water stress and the diurnal activity of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase in field grown *Nicotiana tabacum* genotypes selected for survival at low CO₂ concentrations. *Plant Physiology and Biochemistry* **31**: 113-120.
203. Passioura, J.B. (1988) Root signals control leaf expansion in wheat seedlings growing in drying soil. *Australian Journal of Plant Physiology* **15**: 687-693.
204. Pate, J.S., Atkins, G.A., Hamel, K., McNeil, D.L. e Layzell, D.B. (1979) Transport of organic solutes in phloem and xylem of a nodulated legume. *Plant Physiology* **63**: 1082-1088.
205. Peng, S. e Krieg, D.R. (1991) Single leaf and canopy photosynthesis response to plant age in cotton. *Agronomy Journal* **83**: 704-708.
206. Peoples, M.B., Beilharz, V.C., Waters, S.P., Simpson, R.J. e Dalling, M.J. (1980) Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Chloroplast senescence and the degradation of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase. *Planta* **149**: 241-251.
207. Peoples, M.B., Pate, J.S. e Atkins, G.A. (1983) Mobilization of nitrogen in fruiting plants of a cultivar of cowpea. *Journal of Experimental Botany* **34**: 563-578.
208. Pereira, J.S., Chaves, M.M., Fonseca, F., Araújo, M.C. e Torres, F. (1992) Photosynthetic capacity of leaves of *Eucalyptus globulus* (Labill.) growing in the field with different nutrient and water supplies *Tree Physiology* **11**: 381-389.
209. Plaut, Z., Mayoral, M.L. e Reinhold, L. (1987) Effect of altered sink-source ratio on photosynthetic metabolism of source leaves. *Plant Physiology* **85**: 786-791.
210. Poole, D.K., Roberts, S.W. e Miller, P.C. (1981) Water utilization. in Miller, P.C. (ed.) *Resource Use by Chaparral and Matorral. A Comparison of Vegetation Function in Two Mediterranean Type Ecosystems*. Springer-Verlag, New-York. pp. 123-149.
211. Portis, A.R. (1992) Regulation of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Annual Revue of Plant Physiology* **43**: 415-437.
212. Preiss, J. (1982) Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Annual Revue of Plant Physiology* **33**: 431-454.
213. Quick, W.P., Chaves, M.M., Wendler, R., David, M., Rodrigues, M.L., Passarinho, J.A., Pereira, J.S., Adock, M.D., Leegood, R.C. e 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.
214. Quick, W.P., Schurr, U., Scheibe, R. Sculze, E-D., Rodormel, S.R., Bogorad, L. e Stitt, M. (1991) Decreased ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with "antisense" *rbcS*. I. Impact on photosynthesis in ambient growth conditions. *Planta* **183**: 542-554.
215. Quick, W.P., Siegl, G., Neuhaus, E., Feil, R. e Stitt, M. (1989) Short term water stress leads to a stimulation of sucrose synthesis by activating sucrose phosphate synthase. *Planta* **177**: 535-547.
216. Ramalho, J.D.C., David, M.M., Rodrigues, M.L. Pereira, J.S. e Chaves, M.M. (1992) Leaf gas exchange and growth in *lupinus albus* subjected to drought. in

- Martins, J.M. e Beirão da Costa, M.L. (eds) *Advances in lupin Science 2^a* Congresso, Évora, Portugal. (em publ.).
217. Ramalho, J.D.C. e Chaves, M.M. (1992) Drought effects on plant water relations and carbon gain in two lines of *Lupinus albus* L.. *European Journal of Agronomy* **1**: 271-280.
 218. Randall, H.C. e Sinclair, T.R. (1988) Sensitivity of soybean leaf development to water deficits. *Plant, Cell and Environment* **11**: 835-839.
 219. Raschke, K. e Resemann, A. (1986) The midday depression of CO₂ assimilation in leaves of *Arbutus unedo* : Diurnal changes in photosynthetic capacity related to changes in temperature and humidity. *Planta* **168**: 546-558.
 220. Reviron, M.-P., Vartanian, N., Sallatin, M., Huet, J.C., Pernollet, J.-C. e Vienne, D. (1992) Characterization of a novel protein induced by progressive or rapid drought and salinity in *Brassica napus* leaves. *Plant Physiology* **100**: 1486-1493.
 221. Robinson, S.P., Grant, W.J.R. e Loveys, B.R. (1988) Stomatal limitation of photosynthesis in abscisic acid-treated and in water-stressed leaves measured at elevated CO₂. *Australian Journal of Plant Physiology* **15**: 495-503.
 222. Rodrigues, M.L., Chave, M.M., Wendler, R., David, M.M., Quick, W.P., Leegood, R.C., Stitt, M. e Pereira, J.S. (1993) Osmotic adjustment in water stressed grapevine leaves in relation to carbon assimilation. *Australian Journal of Plant Physiology* **20**: 309-321.
 223. Saab, I.N. Sharp, R.E. , Pritchard, J. e Voetberg, G.S. (1990) Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiology* **93**: 26-33.
 224. Saab, I.N. e Sharp, R.E. (1989) Non-hydraulic signals from maize roots in drying soil: inhibition of leaf elongation but not stomatal conductance. *Planta* **179**: 466-474.
 225. Sage, R.F. (1990) A model describing the regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, electron transport and triose phosphate use in response to light intensity and CO₂ in C₃ plants. *Plant Physiology* **94**: 1728-1734.
 226. Sage, R.F., Sharkey, T.D. e Seemann, J.R. (1990) Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in response to light intensity and CO₂ in the C₃ annuals *Chenopodium album* L. and *Phaseolus vulgaris* L.. *Plant Physiology* **94**: 1735-1742.
 227. Sage, R.F., Sharkey, T.D. e Seemann, J.R. (1988) The *in vivo* response of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activation state and the pool sizes of photosynthetic metabolites to elevated CO₂ in *Phaseolus vulgaris*. *Planta* **174**: 407-416.
 228. Salvucci, M.E. (1989) Regulation of Rubisco activity *in vivo*. *Physiologia Plantarum* **77**: 164-171.
 229. Salvucci, M.E., Portis Jr., A.R. e Ogren, W.L. (1986) Light and CO₂ responses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation in arabidopsis leaves. *Plant Physiology* **80**: 655-659.
 230. Sandman, G., Khun, M. e Böger, P. (1993) Carotenoids in photosynthesis: protection of D1 degradation in light. *Photosynthesis Research* **35**: 185-190.
 231. Schäffer, A.A., Simper, H. e Hofman, B. (1992) Glucose feeding results in coordinated changes of chlorophyll content, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase activity and photosynthetic potential in photoautotrophic

- suspension cultured of *Chenopodium rubrum*. *Plant, Cell and Environment* **15**: 343-350.
232. Scheuermann, R., Biehler, K., Stuhlfauth, T. e Fock, H.P. (1991) Simultaneous gas exchange and fluorescence measurements indicate differences in the response of sunflower, bean and maize to water stress. *Photosynthesis Research* **27**: 189-197.
 233. Scholander, P.F., Hammel, H.T., Hemmingsen, E.A. e 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.
 234. Schreiber, U. e 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. e Oechel, W.C. (ed.) *Plant Response to Stress: Functional Analysis in Mediterranean Ecosystems*. NATO ASI Series Vol 615, Springer Verlag, Berlin, pp. 27-53.
 235. Schulze, E.-D. (1982) Carbon dioxide and water vapor exchange in response to drought in the atmosphere and in the soil. *Annual Revue of Plant Physiology* **37**: 247-274.
 236. Schulze, E.-D. e Hall, A.E. (1982) Stomatal responses, water loss and CO₂ assimilation rates of plants in contrasting environments. in Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. e Ziegler, H. (eds.). *Physiological Plant Ecology II. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series Vol. 12B*. A. Pirson e M.H. Zimmermann (eds). Springer-Verlag, Berlin. pp. 181-230.
 237. Schulze, E.-D., Lange, O.L., Buschbom, U. Kappen, L. e Evenari, M. (1972) Stomatal responses to changes in humidity in plants growing in the desert. *Planta* **108**: 259-270.
 238. Schulze, E.-D., Robicheaux, R.H., Grace, J., Rundel, P.W. e Ehleringer, J.R. (1987) Plant water balance. *BioScience* **37**: 30-37.
 239. Seemann, J.R. e Berry, J.A. (1982) Interspecific differences in the kinetic properties of RuBPC'ase protein. *Carnegie Institution Yearbook* **81**: 78-83.
 240. Seemann, J.R., Kobza, J. e d.Moore, B. (1990) Metabolism of 2-carboxyarabinitol 1-phosphate and regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase activity. *Photosynthesis Research* **23**: 119-130. .
 241. Semaan, A. Cruziat, P. e Vartanian, N. (1982) Cinétique de réhydratation de plantes entières en relation avec le potentiel hydrique initiale et les conditions de transpiration. *Acta oecologica* **3**: 359-371.
 242. Sen Gupta, A. e Berkowitz, G.A. (1988) Chloroplast osmotic adjustment and water stress effects on photosynthesis. *Plant Physiology* **88**: 200-206.
 243. Sharkey, T.D. (1985a) Photosynthesis in intacted leaves of C₃ plants: physics, physiology and rate limitaions. *The Botanical Revue* **51**: 53-105.
 244. Sharkey, T.D. (1985b) O₂-insensitive Photosynthesis in C₃ plants. Its ocurrence and possible explanation. *Plant Physiology* **78**: 71-75.
 245. Sharkey, T.D. e Badger, M.R. (1982) Effects of water stress on photosynthetic electron transport, photophosphorylation and metabolite levels of *Xantium strumarium* mesophyll cells. *Planta* **156**: 199-206.
 246. Sharkey, T.D. e Seemann, J.R. (1989) Mild water stress effects in carbon-reduction cycle intermediates, ribulose bisphosphate carboxylase activity and

- stomatal homogeneity of photosynthesis of intact leaves. *Plant Physiology* **89**: 1060-1065
247. Sharkey, T.D., Kobza, J., Seemann, J.R. e Brown, R.H. (1988) Reduced cytosolic fructose-1,6-bisphosphate activity to loss of O₂ sensitivity in *Flaveria linearis* mutant. *Plant Physiology* **86**: 667-671.
 248. Sharkey, T.D., Seemann, J.R. e Berry, J.A. (1986a) Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in response to changing partial pressure of O₂ and light in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* **81**: 788-791.
 249. Sharkey, T.D., Stitt, M., Heineke, D., Gerhardt, D., Raschke, K. e Heldt, H.W. (1986b) Limitation of photosynthesis by carbon metabolism. II. O₂-insensitive CO₂ uptake results from limitation of triose phosphate utilization. *Plant Physiology* **81**: 1123-1129.
 250. Sheen, J. (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. *The plant Cell* **2**: 1027-1038.
 251. Silvius, J.E., Kremer, D.F. e Lee, D.R. (1978) Carbon assimilation and translocation in soybean leaves at different stages of development. *Plant Physiology* **62**: 54-58.
 252. Skriver, K. e Mundy, J. (1990) Gene expression response to abscisic acid and osmotic stress. *The Plant Cell* **2**: 503-512.
 253. Sobrado, M.A. (1990) Drought responses of tropical corn. 1. Leaf area and yield components in the field. *Maydica* **35**: 221-226.
 254. Sommerville, C.R., Portis Jr., A.R. e Ogren, W.L. (1982) A mutant of *Arabidopsis thaliana* which lacks activation of RuBPCarboxylase *in vivo*. *Plant Physiology* **70**: 381-387.
 255. Sonnwald, U. e Willmitzer, L. (1992) Molecular approaches to sink-source interactions. *Plant Physiology* **99**: 1267-1270.
 256. Steinberg, S.L., Miller, J.C. e McFarland, M.J. (1990) Dry matter partitioning and vegetative growth of young peach trees under water stress. *Australian Journal of Plant Physiology* **17**: 23-36.
 257. Stewart, C.R. (1971) Effect of wilting on carbohydrates during incubation of excised bean leaves in the dark. *Plant Physiology* **48**: 792-794.
 258. Stitt, M. (1990b) Fructose-2,6-bisphosphate. *in* Lee, P. (ed.) *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 7, Academic Press, London.
 259. Stitt, M. (1990a) Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annual Review of Plant Physiology* **41**: 153-185.
 260. Stitt, M. (1991) Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* **14**: 741-762.
 261. Stitt, M. e Heldt, H.W. (1985) Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2,6-bisphosphate. VI. Regulation of cytosolic fructose 1,6-bisphosphate in spinach leaves by an interaction between metabolic intermediates and fructose 2,6-bisphosphate. *Plant Physiology* **79**: 599-608.
 262. Stitt, M. e Quick, W.P. (1989) Photosynthetic carbon partitioning: its regulation and possibilities for manipulation. *Physiologia Plantarum* **77**: 633-641.
 263. Stitt, M., Quick, W.P., Schurr, U., Schulze, E.-D., Rodermel, S.R. e Bogorad, L. (1991) Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with «antisense» rbcS. II. Flux control coefficients for photosynthesis in varying light, CO₂, and air humidity. *Planta* **183**: 555-566.

264. Stitt, M. von Schaewen, A. e Willmitzer, L. (1990) 'Sink' regulation of photosynthetic metabolism in transgenic tobacco plants expressing yeast invertase in their cell wall involves a decrease of the Calvin cycle enzymes and an increase of glycolytic enzymes. *Planta* **183**: 40-50.
265. Stitt, M. Wirtz, W. e Heldt, H.W. (1983) Regulation of sucrose synthesis by cytoplasmic fructose biphosphatase and sucrose phosphate synthase during photosynthesis in varying light and carbon dioxide. *Plant Physiology* **72**: 767-774.
266. Stitt, M., Herzog, B. e Heldt, H.W. (1985b) Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2,6-bisphosphate. V. Modulation of the spinach leaf cytosolic fructose 2,6-bisphosphate activity *in vitro* by substrate, products, pH, magnesium, fructose 2,6-bisphosphate, adenosine monophosphate and dihydroxyacetone phosphate. *Plant Physiology* **79**: 590-598.
267. Stitt, M., Huber, S. e Kerr, P. (1987) Control of photosynthetic sucrose formation. *in* Hatch, M.D. e Boardman, N.K. (eds.) *The Biochemistry of Plants, vol.10*. Academic Press, New York. pp.327-409.
268. Stitt, M., Wilke, I. Feil, R. e Heldt, H.W. (1988) Coarse control of sucrose-phosphate synthase in leaves: alterations of the kinetic properties in response to the rate of photosynthesis and accumulation of sucrose. *Planta* **174**: 217-230.
269. Stitt, M., Bulpin, P.V. e Ap Rees, T. (1978) Pathway of starch breakdown in photosynthetic tissues of *Pisum sativum*. *Biochimica et Biophysica Acta* **544**: 200-214.
270. 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.
271. Stoddart, J.L. e Thomas, H. (1982) Leaf senescence. *in* Boulter, D. e Parthier, B. (ed) *Nucleic acids and proteins in Plants I. Structure Biochemistry and Physiology of Proteins. Encyclopedia of Plant Physiology. Neu Series*. Vol 14A, Springer Verlag, Berlin, pp. 592-636.
272. Stuhlfauth, T., Steuer, B. e Fock, H.P. (1990) Chlorophylls and carotenoids under water stress and their relation to primary metabolism. *Photosynthetica* **24**: 412-418.
273. Stuhlfauth, T., Sultmeyer, D.F., Weinz, S. e Fock, H.P.(1988) Fluorescence quenching and gas exchange in a water stressed C₃ plant *Digitalis lanata*. *Plant Physiology* **86**: 246-250.
274. Sundari, D. e Raghavendra, A.S. (1990) Sensitivity of photosynthesis by spinach chloroplast membranes to osmotic stress *in vitro*: rapid inhibition of O₂ evolution in presence of magnesium. *Photosynthesis Research* **23**: 325-330.
275. Sung, F.J.M. e Krieg, D.R. (1979) Relative sensitivity of photosynthetic assimilation and translocation of ¹⁴Carbon to water stress. *Plant Physiology* **64**: 852-856.
276. Terashima, I. (1992) Anatomy of non-uniform leaf photosynthesis. *Photosynthesis Research* **31**: 195-212.
277. Thomas, C. Davies, S.D. e Tallman, G. (1991) Responses of stomata of senescing and nonsenescing leaves of *Nicotiana glauca* to changes in intercellular concentrations of carbon dioxide. *Plant Cell and Environment* **14**: 971-978.

278. Throughton e Slayter (1969) Plant water status, leaf temperature and the calculated mesophyll resistance to carbon dioxide of cotton leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **22**: 815-827.
279. Tsuchiya, M., Munandar e Ogo, T. (1992) Growth response of rice (*Oryza sativa* L.) to drought. II. Varietal difference in transpiration under water stress and its related plant characteristics. *Japanese Journal of Crop Science* **61**: 676-682.
280. Turner, N.C. (1974) Stomatal behaviour and water status of maize, shorgum and tobacco under field conditions. II. At low soil water potential. *Plant Physiology* **53**: 360-365.
281. Turner, N.C., Stern, W.R. e Evans, P. (1987) Water relations and osmotic adjustment of leaves and roots of lupins in response to water deficits. *Crop Science* **27**: 977-983.
282. Tyree, M.T. e Jarvis, P.G. (1982) Water in tissues and cells. in Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. e Ziegler, H. (eds.). *Physiological Plant Ecology II. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series Vol. 12B*. A. Pirson e M.H. Zimmermann (eds). Springer-Verlag, Berlin. pp. 35-77.
283. Van Kraanningen, D.W.G. (1990) Implications of non-uniform stomatal closure on gas exchange calculations. *Plant, Cell and Environment* **13**: 1001-1004.
284. Vapaavuori, E.M. (1986) Correlation of activity and amount of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase with chloroplast stroma crystals in water stressed willow leaves. *Journal of Experimental Botany* **37**: 89-98.
285. Vapaavuori, E.M. e Vuorinen, A.H. (1989) Seasonal variation in the photosynthetic capacity of a willow (*Salix cv. Aquatica gigantea*). 1. Changes in the activity and amount of Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase and the content of nitrogen and chlorophyll at different levels in the canopy. *Tree Physiology* **5**: 423-444.
286. Vapaavuori, E.M., Korpilahti, E. e Nurmi, A.H. (1984) Photosynthetic rate in willow leaves during water stress and changes in the chloroplast ultrastructure with special reference to crystal inclusions. *Journal of Experimental Botany* **35**: 306-321.
287. Vapaavuori, E.M., Nurmi, A.H., Vuorinen, A.H. e Kangas, T. (1989) Seasonal variation in the photosynthetic capacity of a willow (*Salix cv. Aquatica gigantea*) canopy. 2. Comparison of the structure and function of chloroplasts at different levels in the canopy. *Tree Physiology* **5**: 445-457.
288. Vassey, T.L. e 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.
289. Vassey, T.L., quick, W.P., Sharkey, T.D. e Stitt, M. (1991) Water stress, carbon dioxide and light effects on sucrose-phosphate synthase activity in *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum* **81**: 37-44.
290. Vendeland, J.S., Sinclair, T.R., Spaeth, S.C. e Cortes, P.M. (1982) Assumptions of plastochron index: evaluation with soya bean under field drought conditions. *Annals of Botany* **50**: 673-680.
291. Vierstra, R.D. (1993) Protein degradation in plants. *Annual Revue of Plant Physiology* **44**. 385-410.
292. Virgona, J.M. e Barlow, E.W.R. (1991) Drought stress induced changes in the non-structural carbohydrate composition of wheat stems. *Australian Journal of Plant Physiology* **18**: 239-247.

293. Von Caemmerer, S. e Evans, J.R. (1991) Determination of the average partial pressure of CO₂ in chloroplasts from leaves of several C₃ plants. *Australian Journal of Plant Physiology* **18**: 287-305.
294. von Caemmerer, S. e Farquhar, G.D. (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **153**: 376-387.
295. Vu, J.C.V., Allen Jr., L.H. e Bowes, G. (1987) Drought stress and elevated CO₂ effects on soybean ribulose biphosphate carboxylase activity and canopy photosynthetic rates. *Plant Physiology* **83**: 573-578.
296. Walker, D. (1987) The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. Robert Hill Institute, Univ. Sheffield, Sheffield.
297. Walker, D.A., Leegood, R.C. e Sivak, M.N. (1986) Ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase: its role in photosynthesis. *Philosophical Transactions Royal Society London, Ser. B* **313**: 305-324.
298. Wang, Z.Y. e Portis Jr., A.R. (1992) Dissociation of ribulose-1,5-biphosphate bound to ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase and its enhancement by ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase activase-mediated hydrolysis of ATP. *Plant Physiology* **99**: 1348-1353.
299. Ward, D.A. e Keys, A.J. (1989) A comparison between coupled spectrophotometric and uncoupled radiometric assays for RuBP carboxylase. *Photosynthesis Research* **22**: 167-171.
300. Wardlaw, I.F. (1980) Translocation and source-sink relationships. in Carlson, P.S. (ed.) *The Biology of Crop Productivity*. Academic Press, New York, pp. 297-339.
301. Wareing, P.F. (1979) Inaugural address: plant development and crop yield. in Marcelle, Clijsters e van Poucke (eds.) *Photosynthesis and plant development*. Dr.W. Junk Publ., The Hague, pp. 1-17.
302. Weiner, H., McMichael Jr., R.W. e Huber, S.C. (1992) Identification of factors regulating the phosphorylation status of sucrose-phosphate synthase *in vivo*. *Plant Physiology* **99**: 1435-1442.
303. Wise, R.R., Frederick, J.R., Alm, D.M., Kramer, D.M. e Hesketh, J.D. (1990) Investigation of the limitation to photosynthesis induced by leaf water deficit in field-grown sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell and Environment* **13**: 923-931.
304. Wishnick, M. e Lane, M.D. (1971) Ribulose diphosphate carboxylase from spinach leaves. in Colowick, S.P. e Kaplan, N.O.. *Methods in Enzymology. Vol XXIII Part A Photosynthesis*. San Pietro, A. (ed.). Academic Press, London, pp. 570-577.
305. Wittenbach, V.A. (1979) Ribulose biphosphate carboxylase and proteolytic activity in wheat leaves from anthesis through senescence. *Plant Physiology* **64**: 884-887.
306. Wittenbach, V.A., Ackerson, R.C., Giaquinta, R.T. e Hebert, R.R. (1980) Changes in photosynthesis, ribulose biphosphate carboxylase, proteolytic activity and ultrastructure of soybean leaves during senescence. *Crop Science* **20**: 225-231.
307. Wong, S.C., Cowan, I.R. e Farquhar, G.D. (1979) Stomatal conductances correlates with photosynthetic capacity. *Nature* **282**: 424-426.

308. Wong, S.C., Cowan, I.R. e Farquhar, G.D. (1985) Leaf conductance in relation to rate of CO₂ assimilation. I. Influence of nitrogen nutrition, phosphorus nutrition, photon flux density and ambient partial pressure of CO₂ during ontogeny. *Plant Physiology* **78**: 821-825.
309. Woodrow, I.E. e Berry, J.A. (1988) Enzymatic regulation of photosynthetic CO₂ fixation in C₃ plants. *Annual Revue of Plant Physiology* **39**: 533-594.
310. Woodrow, I.E., Ball, J.T. e Berry, J.A. (1990) Control of photosynthetic carbon dioxide fixation by the boundary layer, stomata and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant, Cell and Environment* **13**: 339-347.
311. Woolhouse, H.W. (1978) Senescence processes in the life cycle of flowering plants. *BioScience* **28**: 25-31.
312. Worrel, A.C., Bruneau, J.-M., Summerfelt, K., Boersig, M. e Voelker, T.A. (1992) Expression of maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *The Plant Cell* **3**: 1121-1130.
313. Wullschlager, S.D. e Oosterhuis, D.M. (1990) Photosynthesis of individual field-grown leaves during ontogeny. *Photosynthesis Research* **23**: 161-170.
314. Yeoh, H.-H., Badger, M.R. e Watson, L. (1980a) Variations in Km(CO₂) of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase among grasses. *Plant Physiology* **66**: 1110-1112.
315. Yeoh, H.-H., Badger, M.R. e Watson, L. (1980b) Variations in kinetic properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase among plants. *Plant Physiology* **67**: 1151-1155.
316. Zeiger, E. e Schwartz, A. (1982) Longevity of guard cell chloroplasts in falling leaves: Implication for stomatal function and cellular aging. *Science* **218**: 680-682.
317. Zeiger, E., Farquhar, G.D. e Cowan, I. (1987) *Stomatal Function*. Stanford University Press, Stanford, California.
318. Zelitch, I. (1975) Environmental and biological control of photosynthesis: general assessment. in Marcelle, R. (ed.) *Environmental and biological control of photosynthesis*. Dr. W. Junk Publ., The Hague, pp. 251-262.
319. Zhang, J. e Davies, W.J. (1989) Sequential responses of whole plant water relations to prolonged soil drying and the involvement of xylem sap ABA in the regulation of stomatal behaviour of sunflower plants. *New Phytologist* **113**: 167-174.
320. Zimmermann, U. (1978) Physics of turgor and osmoregulation. *Annual Revue of Plant Physiology* **29**: 121-148.
321. Zrenner, R. e 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.

RESUMO

Apresentam-se neste trabalho os resultados de um conjunto de estudos sobre os efeitos do stress hídrico nas trocas gasosas e no metabolismo fotossintético do carbono de plantas C_3 , em especial de *Lupinus albus* L.. Nos diferentes ensaios foi possível induzir défices hídricos moderados ou severos, obtidos rápida ou mais lentamente. As trocas gasosas foram claramente afectadas nas plantas stress, que apresentaram valores de condutância estomática muito inferiores aos das plantas regadas. As alterações na capacidade fotossintética (taxa de fotossíntese a concentrações de CO_2 e a irradiância saturantes) das plantas em stress e a recuperação depois de rehidratadas, e ainda os resultados da análise de parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, sugerem que, no tremoceiro, a fotossíntese ao nível do mesófilo só é significativamente afectada em condições de défice hídrico severo ($RWC < 65\%$) ou prolongado. Enquanto que para esta espécie a componente estomática parece revestir-se de maior importância na limitação da taxa fotossintética em condições de secura, estudos efectuados em condições idênticas com eucalipto e videira revelaram que a principal limitação à fotossíntese no eucalipto está também associada à componente estomática, enquanto que na videira estão evidenciadas alterações ao nível do funcionamento foto e bioquímico do mesófilo.

No tremoceiro, os efeitos do stress hídrico na fotossíntese a CO_2 ambiente foi mais acentuado nas folhas velhas do que nas novas. No entanto, após rehidratação, são as folhas mais novas as que apresentaram maiores atrasos na recuperação da condutância estomática. Pelo contrário as folhas velhas não recuperaram a capacidade fotossintética pré-stress. Os efeitos dos défices hídricos nas proteínas fotossintéticas foi estudado ao nível da quantidade e actividade da RuBisCO em folhas de diferentes idades. Durante o ciclo de stress a actividade inicial da RuBisCO decresceu independentemente da idade; a actividade total e a quantidade desta enzima diminuíram apenas nas folhas mais velhas. Após rehidratação a quantidade de RuBisCO decresceu mais acentuadamente, em paralelo com a quantidade de proteína solúvel, tanto nas folhas novas como nas velhas. Estes resultados aliados à observação da aceleração do padrão acrópeto de senescência foliar induzido pelo stress hídrico, mais conspícua após a rehidratação, são discutidos numa perspectiva da planta inteira.

Os défices hídricos também induziram alterações ao nível da partição dos assimilados recentes. A síntese da sacarose e/ou a hidrólise do amido parecem ter sido estimuladas tanto em tecidos essencialmente consumidores (culturas em suspensão de células heterotróficas de *Chenopodium rubrum*), como em tecidos essencialmente produtores (folhas de *L. albus*). O aumento resultante na razão entre os teores de açúcares não estruturais solúveis e insolúveis é discutido face ao papel desempenhado pela acumulação de solutos compatíveis na osmoregulação. Discute-se também os possíveis efeitos inibitórios da acumulação de açúcares solúveis na actividade fotossintética mediados por mecanismos de *down regulation* e/ou por modificações na expressão genética.

Conclui-se que, para o tremoceiro, o decréscimo na actividade fotossintética em condições de stress hídrico moderado ou de pouca duração pode ser atribuído principalmente à limitação na difusão do CO_2 imposta pelo encerramento dos estomas. Em condições de stress hídrico mais severo ou prolongado sobrepoem-se a esta limitação as que parecem resultar de um ajustamento coordenado do teor e actividade da RuBisCO, a par de alterações ao nível do metabolismo da sacarose e do amido, às condições de crescimento limitado pelos défices hídricos. Para algumas plantas, e.g. videira, a importância relativa da componente não-estomática é maior mesmo para défices hídricos muito moderados.

ABSTRACT

The effects of imposed soil dehydration on gas exchange and photosynthetic carbon metabolism was studied in potted plants of *Lupinus albus*. Photosynthesis in air and leaf conductance were strongly reduced in stressed (non-watered) plants. Photosynthetic capacity (in saturating CO₂ and irradiance) and chlorophyll *a* fluorescence parameters, together with the recovery capacity on rehydration, revealed that stomatal components were the most important limiting factor of photosynthesis in lupin plants submitted to moderate or rapidly induced water deficits. Photosynthetic capacity decreased only significantly when leaf RWC < 65 % or after prolonged water stress (over two weeks). Measurements carried out in *Eucalyptus globulus* and *Vitis vinifera* showed that the inhibition of photosynthesis under soil drought conditions was due in *E. globulus* mainly to closure of stomata; in *V. vinifera* modifications of the photo and biochemical functioning of the mesophyll were also important.

In lupins water stress effects on photosynthesis were most severe in old leaves. Although young leaves showed a longer delay in stomatal reopening after rehydration, old leaves did not fully recover their photosynthetic capacity. RuBisCO initial activity decreased in all leaves. RuBisCO total activity and amount were only significantly reduced in old leaves. After rehydration both young and old leaves showed a further decrease in the amount of RuBisCO in parallel with soluble protein. The acceleration of the acropetal pattern of senescence induced by water deficits and subsequent rehydration is discussed in a whole plant approach.

At the partition level of the recent assimilated carbon, water stress seemed to induce alterations both on sink (*Chenopodium rubrum* suspension cell cultures) and source (*Lupinus albus* leaves) tissues. Starch was depleted and cells accumulated or maintained high levels of soluble sugars. The resulting higher ratios, solubles/insolubles, are discussed in terms of osmotic regulation and in terms of down regulation of the photosynthetic activity mediated by mechanism involving genetic expression.

The main conclusions of this study are that in lupins, the reduced photosynthetic activity under short or moderate water stress is attributed to CO₂ diffusion limitations imposed by stomatal closure; under more severe or longer water deficit conditions other limitations are superimposed, namely those resulting from a coordinated adjustment of the level and activity of RuBisCO, together with changes in the sucrose and starch metabolism, to the stress limited conditions of growth; for some plants, e.g. grapevine, non stomatal components are evoked early during the development of water stress.

AGRADECIMENTOS

Desejo deixar manifesto o meu agradecimento a todos os que na Universidade do Algarve, no Instituto Superior de Agronomia e na Universidade de Bayreuth me acompanharam e que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

Quero, mesmo assim, expressar a minha gratidão em particular àqueles que mais directamente se envolveram na minha formação académica ou com quem colaborei ao longo destes últimos anos de trabalho:

Ao Professor João Santos Pereira, meu orientador, o grato reconhecimento que os seus ensinamentos e ajuda, bem como o estímulo e o aconselhamento que sempre me ofereceu, foram não só indispensáveis para levar a bom termo a concretização desta tese, mas também porque me auxiliaram a compreender melhor a Ciência e o Mundo.

À Professora Manuela Chaves, que na prática foi minha co-orientadora quer na parte experimental, quer durante a elaboração da tese, porque acompanhou sempre de muito perto, e de um modo que considero extraordinário, todas as fases de realização do trabalho. Também porque, ao proporcionar contactos com outras instituições, me ofereceu oportunidades únicas de aperfeiçoar conhecimentos técnicos e científicos.

De um modo muito especial, à minha amiga e "colega de carteira" Maria João Correia, por todo o apoio que soube dar, e porque com a sua valorosa ajuda e tenacidade tornou mais fácil encarar e ultrapassar as dificuldades deste percurso. Também à Leonor Osório e ao Júlio Osório, pela estima e pronta colaboração que me ofereceram. Aos três agradeço terem compartilhado comigo as longas horas de trabalho.

Ao Professores Mark Stitt e Paul Quick da Universidade de Bayreuth, pelos ensinamentos e pela experiência inovadora que me proporcionaram ao participar na actividade de um Laboratório de Bioquímica Vegetal. Também à Jane Dancer, Regina Feil, Anne Krapp e Peter Geigenberger que, naquele laboratório, me acolheram amigavelmente e me ajudaram na aprendizagem dos métodos bioquímicos que viria a aplicar nos ensaios em Portugal.

Ao grupo de Botânica e Fisiologia Vegetal, da Área Científica de Biologia Vegetal da U.C.T.A. da Universidade do Algarve, Maria João Correia, Filomena Fonseca, Natália Marques, Isabel Barrote e Paula Mesquita, porque com a sua compreensão e espírito de entajuda possibilitaram que pudesse dedicar mais tempo aos trabalhos da tese.

Ao colega Gustavo Nolasco, e à sua contagiante forma de trabalhar, pela ajuda e preciosas sugestões durante as tentativas de realização dos testes imunológicos ELISA para a quantificação da RuBisCO, e também ao Carlos Canas que se envolveu neste procedimento, libertando-me dos passos mais rotineiros.

À Eng^a Lucília Rodrigues, com quem colaborei em alguns estudos e que amigavelmente cedeu equipamento para a realização de alguns ensaios.

Não posso deixar de expressar também o meu agradecimento a outras instituições que, de diferentes maneiras, melhoraram as condições de exequibilidade do trabalho: aos responsáveis pelo projecto de investigação inter-universitário (Universidade Técnica de Lisboa, Universidade de Sheffield e Universidade de Bayreuth) "The effects of water stress on photosynthesis"; ao Departamento de

Tecnologia de Indústrias Químicas do LNETI, na pessoa da Dr^a Alda Fidalgo; à Estação Experimental de Rothamsted, na pessoa do Dr. Mathew Paul.

Gostaria ainda de agradecer ao extinto Instituto Nacional de Investigação Científica pela concessão da Bolsa de Doutoramento.

Finalmente, aos Conselhos Científico e Directivo da Unidade de Ciências e Tecnologias Agrárias da Universidade do Algarve expresse os meus agradecimentos pelas condições de trabalho que facilitaram para a execução deste trabalho. Um último agradecimento aos colegas e funcionários da U.C.T.A. por terem compreendido o insuficiente tempo que dediquei às tarefas administrativas a que estaria obrigada pelo cargo que ocupo.

