

MARIA NEUDES SOUSA DE OLIVEIRA

COMPONENTES DA SEIVA XILEMÁTICA
ENVOLVIDOS NA SINALIZAÇÃO RAIZ-PARTE
AÉREA EM TOMATEIRO SUBMETIDO A DÉFICE
HÍDRICO

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

MARIA NEUDES SOUSA DE OLIVEIRA

COMPONENTES DA SEIVA XILEMÁTICA ENVOLVIDOS NA
SINALIZAÇÃO RAIZ-PARTE AÉREA EM TOMATEIRO
SUBMETIDO A DÉFICE HÍDRICO

Tese apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia
Vegetal, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 18 de maio de 2001.

Prof. Carlos Alberto Martínez Y Huaman
Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva
(Conselheiro)
(Conselheiro)

Prof. Luiz Edson Mota de Oliveira
Mosquim

Prof. Paulo Roberto

Prof. Marco Antônio Oliva Cano
(Orientador)

*Aos meus pais Manoel e Florisdalva
Aos meus irmãos Hélio, Cirleudes, Natalice e Cláudio
Aos meus sobrinhos Kamony, Paulo Cássio, Rodolfo,
Cláudia, Bárbara, Hugo e Daniela*

Ofereço

A alguém especial

Dedico

AGRADECIMENTOS

- Ao Ser Superior!
- À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade na realização deste curso.

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.
- Aos meus pais, Manoel e Florisdalva, pelo amor, carinho, dedicação, incentivo e importância dada a cada etapa da minha vida acadêmica.
- Aos meus irmãos Hélio, Cirleudes (“Cirloca”), Natalice (“Tazinha”) e Cláudio (“Pozinho”), pela união, carinho e amizade, em todos os tempos.
- A Mário Kiichiro Tanaka, pela felicidade que a sua companhia me traz.
- Ao meu orientador, Marco Antônio Oliva Cano, pelos ensinamentos, confiança e amizade.
- Aos meus conselheiros, professores Carlos Alberto Martínez Y Human e Marco Aurélio Pedron e Silva, pelas opiniões e ensinamentos na realização deste trabalho.
- Aos demais professores participantes da minha banca de defesa, Luiz Edson Mota de Oliveira e Paulo Roberto Mosquim, por toda minha admiração.
- Aos demais professores do curso de Fisiologia Vegetal, Raimundo Santos Barros, Rolf Puchman e Fábio da Motta, pelos ensinamentos.
- Ao professor Wagner Campos Ottoni, pelas sugestões e constante disposição em colaborar em algumas etapas do meu trabalho.
- À professora Helenice Mercier, do Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biociências da USP-SP, pela orientação na realização das análises de ABA e posteriores sugestões no artigo científico.
- Às alunas de mestrado do mesmo Instituto, Vivian Tamaki e Bia Maia, pela total assistência durante as análises de ABA. Meu carinho e amizade!
- Aos amigos e colegas do curso de Fisiologia Vegetal, especialmente os de minha maior convivência: Luzimar, Nelson (“Nelsito”), Antônio (“Tunico”), Maria Pereira, Ruy, Júlio e Fafá, Jailson e Claudinéia com a família, Marlos e família, Vespasiano (“Vespinha”) Armando e família, Francisco e Carmen, Claudivan e família, Jay e família, Lucinete e família, Natália (“Natalinha”),

Priminho, Diego, Juliana, Alberto e Daniela, por todos os momentos de alegria e dificuldades que compartilhamos no decorrer do curso.

- Aos demais colegas de outros cursos, especialmente Abelmon, por todo o carinho e convivência.

- Aos meus colegas, com os quais dividi república, Júlio Cascardo, Helena Bergi e Adriana Truta.

- Aos demais amigos, com os quais convivi em Viçosa, especialmente ao grande seresteiro “Zé Bóia” e aos componentes da Orquestra de Câmara de Viçosa: Flávio, nosso maestro; Kátia, nossa solista; Pompéia, minha professora de violino; Beto, Maria Eli, Mariana, professor Juarez, Terezinha, Lúcia, Talita, Éber, Miriam e Roberta, pelos momentos sempre alegres que a música nos proporcionou.

- Aos colegas do Centro de Arte e Música.

- Ao apoio da amiga e laboratorista Maria Mercês.

- Aos amigos e colaboradores da Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), João Bosco e Rogério.

- Às secretárias Beth, Glória e Ângela, pela constante disposição em todos os serviços prestados.

- Ao estudante de iniciação científica, Gil Cancela, pela disposição permanente para o trabalho.

ÍNDICE

	Página
EXTRATO	
.....	
ABSTRACT.....	
.....	
.....	
INTRODUÇÃO	1
GERAL.....	
.....	
CAPÍTULO 1 -Mudanças diurna e anual do pH e nutrientes da seiva do xilema de tomateiro e seus efeitos sobre a taxa transpiratória	
ABSTRACT.....	06
.....	
.....	
RESUMO.....	06
.....	
.....	
INTRODUÇÃO	08
.....	
.....	
MATERIAL E MÉTODOS	
Condições de cultivo e avaliações.....	09
.....	
Coleta e análise da seiva.....	09
.....	
Avaliação da taxa transpiratória em folhas destacadas.....	10
Análise estatística.....	11
.....	
RESULTADOS E DISCUSSÃO	
Variação sazonal e diurna do pH da seiva do xilema.....	12

Variação sazonal e diurna do teor de nutrientes da seiva do xilema.....	16
Taxa transpiratória em função da época e hora de coleta das seivas.....	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
.....	
CAPÍTULO 2 - Relação entre transpiração, potencial hídrico foliar, concentração de aba, nutrientes e pH da seiva xilemática em plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> var. Santa Clara submetidas a estresse hídrico lento e rápido	
ABSTRACT.....	25
.....	
.....	
RESUMO.....	25
.....	
.....	
INTRODUÇÃO.....	27
.....	
MATERIAL E MÉTODOS	
Condições de cultivo e avaliação.....	29
Experimento com plantas inteiras.....	29
Experimento com folhas destacadas.....	30
Avaliação da taxa transpiratória e análise da seiva do xilema.....	31
Análise de ABA.....	31
Análise de nutrientes na seiva do xilema.....	34
Atividade da redutase do nitrato.....	34
Análise estatística.....	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	
Efeito do estresse hídrico sobre a taxa transpiratória, potencial hídrico foliar e pH da seiva xilemática.....	36
Efeito do estresse hídrico sobre a concentração de ABA foliar, da seiva xilemática e da raiz.....	39
Efeito do estresse hídrico sobre a concentração de nutrientes da seiva xilemática.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
CAPÍTULO 3 - Sensibilidade estomática ao ABA em função dos níveis de alguns nutrientes do fluxo transpiratório	
ABSTRACT.....	61
.....	
.....	
RESUMO.....	61
.....	
.....	
INTRODUÇÃO.....	62
.....	
MATERIAL E MÉTODOS	
Condições de cultivo e	64

avaliação.....	
.....	
Sensibilidade estomática para ABA contido no xilema de plantas inteira.....	64
Efeito do nitrato, fosfato e cálcio sobre a sensibilidade estomática ao ABA exógeno em folhas destacadas.....	64
Avaliação da taxa transpiratória.....	65
Análise estatística.....	65
RESULTADOS E DISCUSSÃO	
Sensibilidade estomática ao ABA contido na seiva do xilema de plantas estressadas.....	66
Resposta estomática para ABA exógeno	70
Efeito do nitrato, fosfato e cálcio sobre a taxa transpiratória de folhas destacadas.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
.....	
CAPÍTULO 4 - Regulação da transpiração mediante a alteração do pH e constituintes orgânicos do fluxo xilemático	
ABSTRACT	80
.....	
.....	
RESUMO	80
.....	
.....	
INTRODUÇÃO	81
.....	
MATERIAL E MÉTODOS	
Condições de cultivo	83
Efeito do pH e de soluções de imersão sobre a taxa transpiratória.....	83
Efeito da concentração de compostos orgânicos sobre a taxa transpiratória.....	84
Efeito da adição de compostos orgânicos à seiva natural sobre a taxa transpiratória.....	85
Condições de avaliação.....	85
Coleta e análise da seiva do xilema.....	85
Análise estatística.....	86
RESULTADOS E DISCUSSÃO	
Variações diurna da transpiração e condutância estomática.....	87
Efeito do pH e das soluções de imersão sobre a taxa transpiratória.....	89
Efeito dos ácidos orgânicos sobre a taxa transpiratória.....	93
Efeito dos aminoácidos sobre a taxa transpiratória.....	99
Efeito dos açúcares-álcoois sobre a taxa transpiratória.....	101
Efeito de putrescina sobre a taxa transpiratória.....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
DISCUSSÃO GERAL	110
CONCLUSÕES GERAIS	113

RESUMO

OLIVEIRA, Maria Neudes Sousa de, D.S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2001. **Componentes da seiva xilemática envolvidos na sinalização raiz-parte aérea em tomateiro submetido a déficit hídrico.** Orientador: Marco Antônio Oliva Cano. Conselheiros: Carlos Alberto Martínez y Huaman e Marco Aurélio Pedron e Silva.

Plantas de tomate foram cultivadas em solução nutritiva, em casa-de-vegetação, e depois transferidas para sala-de-crescimento (fotoperíodo de 14 horas (iniciando-se às 8:00 horas), densidade de fluxo fotossintético de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura entre 20-23°C e umidade relativa do ar entre 60-63%), com a finalidade de determinar e avaliar a ação de sinalizadores, presentes na seiva do xilema de plantas submetidas a estresse hídrico, sobre a taxa transpiratória. Os estudos foram realizados em plantas inteiras e em folhas destacadas. Em plantas, sem estresse, foram determinadas as alterações diurnas e sazonais de nutrientes e pH da seiva xilemática. Em plantas submetidas a estresse hídrico rápido (horas após adição de PEG) e lento (dias após adição de PEG), induzidos mediante adição de PEG 6000 à solução nutritiva, avaliou-se a relação entre a transpiração, potencial hídrico foliar, concentração de ácido abscísico (ABA), Ca^{+2} , K^{+} , Mg^{+2} , NH_4^{+} , NO_3^{-} , PO_4^{-3} e SO_4^{-} e pH da seiva xilemática. Foi avaliada também a sensibilidade estomática ao ABA contido na seiva xilemática, em função da variação dos níveis de NO_3^{-} , Ca^{+2} e PO_4^{+3} da seiva de plantas submetidas a estresses. Em folhas destacadas de plantas não estressadas avaliou-se o efeito da fusicocina, cloreto de lantânio e vermelho de rutênio, em combinação com ABA exógeno, sobre a taxa transpiratória. Avaliou-se também a sensibilidade estomática ao ABA exógeno, em função dos níveis de NO_3^{-} , Ca^{+2} e PO_4^{+3} . Além disso, avaliou-se o efeito de diferentes pHs (5,5, 6,5 e 7,5), de diferentes soluções

de imersão (seiva natural, seiva artificial e solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ força) e concentrações de ácidos orgânicos (málico, maleico e cítrico), aminoácidos (ácido aspártico e glutâmico, asparagina, glutamina e prolina), açúcares-álcoois (manitol e sorbitol) e putrescina, sobre a taxa transpiratória. O pH da seiva xilemática variou de 5,4 a 6,6. Os pHs menos ácidos ocorreram nos meses de temperaturas médias do ar mais elevadas. A variação diurna do pH da seiva dependeu da época do ano. Exceto NO_3^- e PO_4^{+3} , cujas concentrações na seiva do xilema foram maiores nos meses de temperaturas médias mais baixas, as concentrações dos demais nutrientes analisados não apresentaram um padrão relacionado com a época do ano. A concentração de ABA e Ca^{+2} , K^+ , Mg^{+2} , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{-3} e SO_4^- na seiva das plantas submetidas aos estresses lento e rápido aumentou com a progressão dos estresses. Nas plantas submetidas a estresses rápido ocorreu um aumento de 0,7 unidade no pH da seiva xilemática. A adição de cloreto de lantânio e vermelho de rutênio à seiva artificial inibiu a redução da taxa transpiratória promovida por ABA. Fusicocina promoveu uma redução de 30% na taxa transpiratória e inibiu os efeitos do ABA sobre a mesma. A redução na taxa transpiratória, promovida por ABA exógeno, variou com o pH e com os níveis de Ca^{+2} e NO_3^- da solução de imersão e foi maior em folhas imersas em solução com pH 7,0, contendo NO_3^- e Ca^{+2} . Os ácidos málico e cítrico, quando adicionados à seiva natural com pH 7,0, retardaram as reduções nas taxas transpiratórias. Dentre os aminoácidos, o ácido glutâmico promoveu reduções na taxa transpiratória. Os resultados mostraram que as interações entre os componentes da seiva xilemática envolvidos na sinalização variaram com a forma do estresse. É possível que, em tomateiro, o cálcio e a H^+ -ATPase estejam envolvidos na rota de transdução da sinalização do estresse hídrico, uma vez que tanto os inibidores de canais de cálcio quanto o ativador da H^+ -ATPase inibiram os efeitos do ABA sobre a taxa transpiratória.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Maria Neudes Sousa de, D.S., Universidade Federal de Viçosa, May, 2001. **Components of the xylem sap involved in the signalling root-shoot in the tomato subjected to water deficit.** Adviser: Marco Antonio Oliva Cano. Committee Members: Carlos Alberto Martínez y Huamán e Marco Aurélio Pedron e Silva.

To determine the action of xylem sap signaling compounds on the transpiratory rate, tomato plants were subjected to water stress induced by polyethylene glycol 6000 (PEG). Before stress, plants were cultivated in nutritive solution, under glasshouse conditions, and then transferred to a growth room (photoperiod of 14 hours, beginning at the 8:00 hours), photosynthetic photon flux density of 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 20-23°C temperature and 60-63% relative humidity. The studies were accomplished in whole plants and in detached leaves. Plants were submitted to fast (hours after addition of PEG) and slow (days after addition of PEG) water stress. It was evaluated the relationship between transpiration and leaf water potential, concentration of abscisic acid (ABA), Ca^{+2} , K^{+} , Mg^{+2} , NH_4^{+} , NO_3^{-} , PO_4^{-3} and SO_4^{-} and pH of the xylem sap. It was also evaluated the stomata sensibility to ABA contained in the xylem sap, in function of the variation of the levels of NO_3^{-} , Ca^{+2} and PO_4^{+3} . In detached leaves of non-stressed plants, it was evaluated the effects of the fusicoccina, lanthanum chloride and ruthenium red, in combination with endogenous ABA, on the transpiratory rate. It was also evaluated the effects of different pH (5,5, 6,5 and 7,5), immersion solutions (nutrient solution 1/2 force, natural sap and artificial sap), concentrations of the organic acids malic, maleic and citric, the amino acids proline, asparagine, glutamine, aspartic acid and glutamic acid, the sugar-alcohols mannitol and sorbitol and the polyamine putrescine on transpiration. It was also evaluated the effects of the addition of those products to the natural sap pH 6,0 and 7,0 on the transpiratory rate. In plants, without stress, it was observed diurnal and seasonal alterations in pH and in nutrients of xylem sap. The pHs with values above 6 was observed on January and February, months of larger medium temperature. Starting from April the pH values were inferior to 6,0, reaching the smallest values, among 5,4-5,6, on June to September, months of smaller medium temperature. Except PO_4^{-3} , whose concentration in the sap stayed constant in the period, the other ions appeared in larger concentrations in the saps collected in April - June. K^{+} was the cation found in larger concentration in the sap (8-16 mM), representing 50-75% of the total concentration of all the analyzed cations. Its concentration reduced in 50% from 9:00 to 16:00 hours. NH_4^{+} , NO_3^{-} and PO_4^{-3} concentrations, increased during the day, while the concentrations of SO_4^{-} , Ca^{+2} and Mg^{+2} didn't vary. Under growth chamber it was observed reduction on stomatal conductance while transpiration remained constant. The transpiratory rate decreased as the pH became more alkaline, independent of the immersion solution or the addition of any composed to the solution. The acids maleic and citric just promoted small reductions in the transpiratory rate when added to the artificial sap. When added to the natural sap pH 6,0, which not corresponds to the

pH of the sap of stressed plants, none of the acids promoted any alteration in the transpiratory rate. In pH 7, that it corresponds to the pH of the sap of stressed plants, the addition of the malic and citric acids to the sap delayed the reductions in the transpiratory rate. The results showed that the interactions among the components of the xylem sap involved in the signaling they varied with the form of the stress. It is possible that, in tomato, the calcium and H^+ -ATPase are involved in the route of transduction of the signaling of the water stress, once so much the inhibitors of channels of calcium as the activator of H^+ -ATPase inhibited the effects of ABA on the transpiratory rate.

INTRODUÇÃO GERAL

O déficit hídrico é um dos estresses mais comuns do ambiente que afetam o crescimento e desenvolvimento das plantas por meio de alterações no metabolismo e expressão gênica (Jensen *et al.*, 1996). As plantas possuem mecanismos de resposta a estímulos do ambiente que incluem cadeias de eventos bioquímicos chamados rotas de transdução de sinais. Essas rotas funcionam numa sequência que envolve a percepção do sinal extracelular, conversão e transdução do sinal intracelular e iniciação da resposta, específica para cada sinal (Wilkinson e Davies, 1997). Desta forma, os sinais químicos ou físicos que atuam como indicadores das variações do meio tornam-se fatores importantes, no sentido de superar ou, pelo menos, reduzir os efeitos causados pelo estresse. A síntese de substâncias osmoprotetoras (Iyer e Caplan, 1998), alterações na permeabilidade (Roberts, 1998) e mudanças no potencial osmótico entre simplasto e apoplasto (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997) podem estar relacionadas a esta sinalização.

Durante o déficit hídrico do solo, processos fisiológicos na folha podem ser afetados por sinais transferidos da raiz para a parte aérea (Jensen *et al.*, 1996). Várias evidências sugerem que as raízes têm um papel essencial na percepção do déficit hídrico, via a produção e emissão de um sinal químico, translocado através do xilema, que, além de alterar o comportamento estomático, influencia outros processos metabólicos na parte aérea, como o ganho de carbono, iniciação e expansão foliar (Salah e Tardieu, 1997). Nesse sentido, o ABA, tido como mensageiro primário, parece exercer uma função fundamental, uma vez que é

conhecida a sua influência numa variedade de processos característicos de déficit hídrico, com o fechamento estomático, expansão foliar e acúmulo de solutos nas raízes.

O movimento estomático é o principal mecanismo de controle das trocas gasosas nas plantas superiores. É através dos estômatos que ocorre o influxo de CO₂, necessário ao processo fotossintético e ao crescimento, e o efluxo de água, por meio da transpiração. Em plantas crescendo em solo com reduzido suprimento de água, a abertura estomática é modulada por múltiplos fatores. Na literatura existem evidências mostrando que, nos estágios iniciais de déficit de água no solo, o ABA produzido pelas raízes em desidratação e transportado no fluxo xilemático, é o principal fator responsável pelas restrições iniciais na abertura estomática (Gollan *et al.*, 1992; Schurr *et al.*, 1995). Evidências da participação do ABA na comunicação raiz-parte aérea são deduzidas de experimentos com sistemas radiculares subdivididos com metade vertical das raízes hidratadas e metade secas, iniciados por Zhang *et al.* (1987), ou de experimentos usando a câmara de pressão tipo Passioura (Heckenberger *et al.*, 1996), nos quais a deficiência de água no sistema radicular é induzida sem que ocorra qualquer

alteração no potencial hídrico foliar. Nessas condições, os estômatos fecham e a concentração de ABA nas raízes e seiva do xilema é aumentada. Vários trabalhos mostram uma correlação entre a redução na disponibilidade de água do solo, concentração de ABA na seiva do xilema e condutância estomática (Gollan *et al.*, 1992; Schurr *et al.*, 1995; Correia e Pereira, 1995; Correia *et al.*, 1999).

Outros compostos envolvidos nos mecanismos estomáticos, e que amplificam a resposta do mensageiro primário, são os mensageiros secundários. Tanto os fosfatidilinosítídeos quanto o cálcio citossólico livre participam como mensageiros secundários em plantas, modulando as respostas dos estômatos às variações na disponibilidade de água no solo. Dependendo da concentração de ABA que alcança o apoplasto ao redor das células-guarda, o mecanismo regulatório do fechamento estomático promovido por ele pode operar via diferentes rotas de transdução: dependente de cálcio e independente de cálcio (Cousson e Vavasseur, 1998). Na rota dependente de cálcio, o fechamento estomático promovido por ABA é precedido por um aumento na concentração de cálcio

citossólico livre, resultante da combinação da abertura dos canais de influxo de cálcio extracelular e liberação intracelular de cálcio (McAinsh *et al.*, 1990). ABA e cálcio parecem agir sinergisticamente no fechamento estomático (Wilmer e Fricker, 1996) por inibir os canais de influxo de potássio e ativar os canais de efluxo de potássio e ânions.

No entanto, a reação estomática para o ABA não é simples. Em alguns casos o aumento na concentração de ABA não explica totalmente a extensão do fechamento estomático. Enquanto alguns trabalhos sugerem a participação de outros sinais (Fusseder *et al.*, 1992), alguns ainda desconhecidos, outros atribuem às alterações na sensibilidade estomática para o ABA. Os trabalhos mais recentes mostram que essa sensibilidade pode ser controlada por fatores como o estado nutricional da planta (Jeschke *et al.*, 1997), composição iônica do xilema (Schurr *et al.*, 1992), ABA conjugado e pH do fluxo xilemático (Thompson *et al.*, 1997; Hartung *et al.*, 1998). Além disso, condições de crescimento como temperatura (Correia *et al.*, 1999), nível de radiação (Heckenberger *et al.*, 1996), idade e estado hídrico da folha (Tardieu e Davies, 1993),

também influenciam a sensibilidade estomática para o ABA.

Diversas são as substâncias químicas translocadas para a parte aérea, através do xilema, e que são potencialmente capazes de fornecer informações quanto à disponibilidade de água no sistema radicular. Dependendo do tipo, intensidade e duração do estresse, sinais específicos podem ser produzidos e as interações com ABA na regulação do mecanismo estomático podem ser alteradas. Diante disso, este trabalho teve como objetivos estudar:

- 1- As influências diurnas e sazonais sobre aspectos da seiva xilemática de tomateiro;**
- 2- As alterações na composição da seiva xilemática, decorrentes de estresse hídrico, capazes de influenciar o comportamento estomático;**
- 3- Alterações na sensibilidade estomática para constituintes do fluxo transpiratório em plantas inteiras e folhas destacada;**
- 4- As influências de constituintes da seiva xilemática sobre a taxa transpiratória em folhas destacadas.**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CORREIA, M.J.; PEREIRA, J.S. The control of leaf conductance of white lupin by xylem ABA concentration decreases with the severity of water deficits. **Journal of Experimental Botany**, v.46, n.282, p.101-110, 1995.
- CORREIA, M.J.; RODRIGUES, M.L.; OSÓRIO, M.L.; CHAVES, M.M. Effects of growth temperature on response of lupin stomata to drought and abscisic acid. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.26, p.549-555, 1999.
- COUSSON, A.; VAVASSEUR, A. Two potential Ca^{+2} -dependent transduction pathways in stomatal closing in response to abscisic acid. **Plant Physiology Biochemistry**, v.36, n.3, p.257-262, 1998.
- FUSSEDER, A.; WARTINGER, A.; HARTUNG, W.; SCHULZE, E.D.; HEILMEIER, H. Cytokinins in the xylem sap of desert-grown almond (*Prunus dulcis*) trees: Daily course and their possible interactions with abscisic acid and leaf conductance. **New Phytologist**, v.122, p.45-52, 1992.
- GOLLAN, T.; SCHURR, U.; SCHULTZE, E.D. Stomatal responses to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. I. The concentration of cations, anions, amino acids in and pH of the xylem sap. **Plant, Cell and Environment**, v.15, p.551-559, 1992.
- HARTUNG, W.; WILKINSON, S.; DAVIES, W.J. Factors that regulate abscisic acid concentrations at the primary site of action at the guard cell. **Journal of Experimental Botany**, v.49, p.361-367, 1998.
- HECKENBERGER, U.; SCHURR, U.; SCHULZE, E.D. Stomatal response to abscisic acid fed into the xylem of intact *Helianthus annuus* (L.) plants. **Journal of Experimental Botany**, v.47, n.302, p.1405-1412, 1996.
- IYER, S.; CAPLAN, A. Products of proline catabolism can induced osmotically regulated genes in rice. **Plant Physiology**, v.116, p.203-211, Jan. 1998.
- JENSEN, A.B.; BUSK, P.K.; FIGUERAS, M.; ALBÀ, M.M.; PERACCHIA, G.; MESSEGUER, R.; GODAY, A.; PAGÈS, M

- Drought signal transduction in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 20, p. 105-111, 1996.
- JESCHKE, W.D.; PEUKE, A.D.; PATE, J.S.; HARTUNG, W. Transport, synthesis and catabolism of abscisic acid (ABA) in plants of castor bean (*Ricinus communis* L.) under phosphate deficiency and moderate salinity. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 314, p. 1727-1736, 1997.
- MAINSH, M.R.; BROWNLIE, C.; HETHERINGTON, A.M. Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca^{+2} precedes stomatal closure. **Nature**, v. 342, p. 186-188, 1990.
- ROBERTS, K.S. Regulation of channels in maize roots by water stress and abscisic acid. **Plant Physiology**, v. 116, p. 145-153, 1998.
- SALAH, H.B.H.; TARDIEU, F. Control of leaf expansion rate of drought maize plants under fluctuating evaporative demand. **Plant Physiology**, v. 114, p. 893-900, 1997.
- SCHURR, U.; GOLLAN, T.; SCHULTZE, E.D. Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. **Plant, Cell and Environment**, v. 15, p. 561-567, 1992.
- SCHURR, U.; SCHULTZE, E.D. The concentration of xylem sap constituents in root exudate, and in sap from intact, transpiring castor bean plants (*Ricinus communis* L.). **Plant, Cell and Environment**, v. 18, p. 409-420, 1995.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, v. 115, p. 327-334, 1997.
- TARDIEU, F.; DAVIES, W.J. Integration of hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and water status of drought plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 16, p. 341-349, 1993.
- THOMPSON, D.D.; WILKINSON, S.; BACON, M.A.; DAVIES, W.J. Multiple signals and mechanisms that regulate leaf growth and stomatal behavior during water deficit. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 303-313, 1997.
- WILMER, C.; FRICKER, M. **Stomata**. 2 ed., London: Chapman & Hall, 1996. 375p.
- WILKINSON, S.; DAVIES, W.J. Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell which involves the suppression of saturable ABA uptake by the epidermal symplast. **Plant Physiology**, v. 113, p. 559-573, 1997.
- ZHANG, J.; SCHURR, U.; DAVIES, W.J. Control of stomatal behavior by abscisic acid which apparently

originates in the roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 28, p. 1174-1181, 1987.

CAPÍTULO 1

ALTERAÇÕES DIURNAS E SAZONAIS DO pH E NUTRIENTES DA SEIVA DO XILEMA DE TOMATEIRO

ABSTRACT - Plants of *Lycopersicon esculentum* Mill. var. Santa Clara was cultivated in nutrient solution under glasshouse conditions. Periodically, groups of plants, with approximately 40 days of age, were transferred to a growth room with 14 hour's photoperiod (beginning at the 8:00 hours), photosynthetic photon flux density of $500 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 20-23°C temperature, and 60-63% relative humidity. In those plants, the collections of xylem sap were accomplished monthly during one year, in elapsing of the day (9:00, 11:00, 14:00 and 16:00) and in two places in the plant (5 cm above the base and in the petiole of the 5^a leaf). After the collection, the pHs of the sap was determined, and soon after these were stored to -20°C for the determination of the contents of Ca^{+2} , K^{+} , Mg^{+2} , NH_4^{+} , NO_3^{-} , PO_4^{-3} and SO_4^{-} . Detached leaves of the same plants were submerged in the respective saps and the transpiratory rate was evaluated with an infrared gas analyzer. During the evaluation period, the pH of the xylem sap varied from 5,3 to 6,4. The pHs with values above 6,0 was observed on January and February, months of larger medium temperature. Starting from April the pH values were inferior to 6,0, reaching the smallest values, among 5,4-5,6, on June to September, months of smaller

medium temperature. Except PO_4^{-3} , whose concentration in the sap stayed constant in the period, the other ions appeared in larger concentrations in the saps collected in April - June. K^+ was the cation found in larger concentration in the sap (8-16 mM), representing 50-75% of the total concentration of all the analyzed cations. Its concentration reduced in 50% from 9:00 to 16:00 hours. NH_4^+ , NO_3^- and PO_4^{-3} concentrations, increased during the day, while the concentrations of SO_4^- , Ca^{+2} and Mg^{+2} didn't vary. The transpiratory rate of detached leaves and immersed in the saps varied with the month, but not with the hour of collection of the saps. The pH of the stem sap sampled 5cm above the base was shown less acid (6,1) when compared to the pH of the sap sampled in the petiole of the 5th leaf (5,6).

Additional index terms: *Lycopersicon esculentum*, transpiration, stomata.

RESUMO- Plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill. var. Santa Clara foram cultivadas em solução nutritiva, em casa-de-vegetação e, periodicamente, grupos de plantas, com aproximadamente 40 dias de idade, eram transferidos para uma sala-de-crescimento, com fotoperíodo de 14 horas (iniciando-se às 8:00 horas), densidade de fluxo fotossintético (DFF) de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura entre 20-23 °C e umidade relativa do ar entre 60-63%. Nessas plantas, a coleta de seiva do xilema, por exsudação, foram realizadas mensalmente durante um ano, no decorrer do dia (9:00, 11:00, 14:00 e 16:00) e em dois locais na planta (5 cm acima do colo e no pecíolo da 5^o folha). Após a coleta foi determinado o pH das seivas, e em seguida estas foram armazenadas a -20 °C, para a determinação dos teores de Ca^{+2} , K^+ , Mg^{+2} , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{-3} e SO_4^- . Folhas destacadas das mesmas plantas (5^a folha) tiveram seus pecíolos imersos nas respectivas seivas e a taxa transpiratória avaliada com um analisador de gás no infravermelho. Durante o período de avaliação o pH da seiva xilemática variou de 5,3 a 6,4. Os pHs menos ácidos, com valores acima de 6,0, foram observados nos meses de janeiro e fevereiro, meses de maior temperatura média. A partir de abril os valores foram inferiores a 6,0, atingindo os menores valores, entre 5,4-5,6, de junho a setembro, meses de menor temperatura média. Exceto PO_4^{-3} , cuja concentração na seiva permaneceu constante no período, os demais íons ocorreram em maiores concentrações nas seivas coletadas em abril/junho. K^+ foi o cátion encontrado em maior concentração na seiva, 8-16

mM, representando 50-75% da concentração total de todos os cátions analisados. Sua concentração reduziu em 50% de 9:00 às 16:00 horas. As concentrações de NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} aumentaram durante o dia, enquanto que as concentrações de SO_4^- , Ca^{+2} e Mg^{+2} não variaram. A alteração diurna do pH variou com a época de coleta da seiva. A taxa transpiratória de folhas destacadas e imersas nas seivas variou com a época, mas não com a hora de coleta das seivas. O pH da seiva exsudada do caule a 5cm acima do colo mostrou-se menos ácido (6,1) quando comparado ao pH da seiva exsudada no pecíolo da 5ª folha (5,6).

Termos adicionais para indexação: *Lycopersicon esculentum*, transpiração, estômatos.

INTRODUÇÃO

A composição iônica e o pH da seiva do xilema apresentam variações diurnas, sazonais, e até mesmo no percurso do xilema, da base para o ápice do caule (Schurr e Schultze, 1995; Schill *et al.*, 1996). O pH e alguns nutrientes da seiva do xilema parecem contribuir na sinalização entre raiz e parte aérea em plantas submetidas a estresses como déficit hídrico, salinidade, nutricional, deficiência de oxigênio e radiação (Dannel *et al.*, 1995; Schurr e Schulze, 1996; Else *et al.*, 1996; Heckenberger *et al.*, 1996). Diversos são os estudos que buscam analisar as interações entre os constituintes da seiva do xilema que podem interferir na atuação do ABA sobre o fechamento estomático. No entanto, essas interações podem não ser de natureza geral e mudanças diurnas e/ou sazonais em sua composição influenciá-las. Por isso, é de interesse identificar e quantificar o conteúdo da seiva do xilema para substâncias sinalizadoras e/ou moduladoras que ajudam a coordenar o comportamento entre raiz e parte aérea. Um requerimento inerente nesse caso é a necessidade de estimar quantitativamente as mudanças que ocorrem no conteúdo da seiva do xilema, uma vez que essa contém minerais, hormônios e outras substâncias fisiologicamente importantes e que são potencialmente capazes de atuar como sinalizadoras. Esse trabalho tem como objetivo avaliar as mudanças diurnas e sazonais do pH e teor de nutrientes da seiva do xilema e seus efeitos sobre a taxa transpiratória, em plantas de tomate.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições de cultivo e avaliações

Os experimentos foram conduzidos no Departamento de Biologia Vegetal – Unidade de Crescimento de Plantas – da Universidade Federal de Viçosa, no período de outubro de 1999 a janeiro de 2001. Sementes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L. var. Santa Clara) foram germinadas em areia. Após 18-20 dias, as plântulas foram transferidas para recipientes contendo 2,5 L de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), 1/2 força, pH 6,5, com sistema de aeração, e mantidas em casa-de-vegetação, sob condições do ambiente. A solução nutritiva era trocada a cada dois dias e o volume de água repostado diariamente com água destilada. Os dados de temperaturas médias mensais durante o período de duração dos experimentos foram obtidos de uma estação microclimática, localizada dentro da casa-de-vegetação.

Mensalmente, grupos de 20 plantas, com idade entre 40-45 dias após a germinação, eram transferidos para uma sala-de-crescimento com

fotoperíodo de 14 horas (iniciando-se às 8:00 horas), densidade de fluxo fotossintético (DFF) de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura entre 20-23 °C e umidade relativa do ar entre 60-63%, onde permaneceram por uma semana até utilização. Com essa idade as plantas apresentavam-se ainda no estágio vegetativo.

Todas as avaliações foram realizadas nessas condições, exceto as medições de taxas transpiratórias, que foram realizadas sob DFF de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a nível das folhas avaliadas. Esse valor DFF causou saturação lumínica para a variedade de tomateiro usada, de acordo com uma curva de intensidade de radiação versus fotossíntese, feita previamente. Para filtrar a radiação calorífica das lâmpadas e evitar o aquecimento das folhas, foi colocada uma cuba de vidro contendo uma lâmina de água corrente entre a fonte de luz e as plantas. As avaliações das taxas transpiratórias foram realizadas na 5ª folha, entre 8:00 e 12:00 horas.

Coleta e análise da seiva

A seiva foi coletada ao longo do ano (de outubro/1999 a janeiro/2001) e ao longo do dia (às 9:00, 11:00, 14:00 e 16:00 horas, para análise de nutrientes e às 8:00, 13:00 e 17:00 horas, para a determinação do pH), no xilema do caule, a 5 cm acima do colo da planta. Para verificar se havia diferença entre o pH e a composição de nutrientes da seiva do xilema coletada neste local e da seiva contida no xilema da folha usada nas avaliações, foi realizada uma terceira coleta em dois locais na planta (5 cm acima do colo e no pecíolo da 5ª folha). A primeira e a terceira coletas foram realizadas pela manhã, período de maior taxa de fluxo.

Para a coleta da seiva foi feita uma excisão no caule, a 5 cm acima do colo da planta, destacando-se a parte aérea. Foi feita também uma excisão no pecíolo da 5ª folha, destacando-se a mesma. Os cortes foram lavados com água destilada para evitar possíveis contaminações da seiva com substâncias contidas no suco das células rompidas durante a excisão. O exsudato que emergia no local do corte foi coletado com o auxílio de uma pipeta Pasteur durante ½ hora e o seu pH determinado. A coleta prosseguiu por mais duas horas e a seiva resultante foi armazenada a -20 °C. Nessa seiva foram

determinados os teores de Ca^{+2} , K^+ , Mg^{+2} , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} e SO_4^- . Os íons Ca^{+2} e Mg^{+2} foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica e o K^+ por fotometria de chama. Os teores de NO_3^- , PO_4^{3-} , NH_4^+ e SO_4^- foram determinados espectrofotometricamente, segundo Cataldo *et al.* (1975), Lindeman (1958), MacCulough (1967) e Malavolta *et al.* (1989), respectivamente.

Avaliação da taxa transpiratória em folhas destacadas

As seivas armazenadas foram degeladas, filtradas em papel de filtro e o pH ajustado para 6,0 com NaOH. Folhas destacadas (5ª folha) tiveram seus pecíolos imersos em água destilada e selecionadas para uma mesma taxa transpiratória inicial. 20 mL das seivas foram adicionados a tubos de ensaio colocados sobre um suporte, e os pecíolos das folhas imersos. Tempos após a imersão foram realizadas a avaliação da taxa transpiratória na epiderme abaxial das folhas, utilizando um analisador de gás no infravermelho modelo LCA-2 (ADC, UK).

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os tratamentos, representados pelas seivas coletadas nas várias épocas do ano, horas do dia e locais na planta, compunham de quatro repetições, tanto para a avaliação de taxa transpiratória como para a determinação do teor de nutrientes. A medição do pH foi realizada em seiva de 4 plantas, para variação diurna e de, no mínimo, 10 plantas, para as variação sazonal. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, a nível de 5% de probabilidade, sendo calculada a diferença mínima significativa pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Variação sazonal e diurna do pH da seiva do xilema

Na Figura 1A é mostrada a variação na temperatura média mensal e na Figura 1B a variação no pH da seiva do xilema de plantas de tomate, avaliados no período de janeiro de 2000 a janeiro de 2001. Os valores médios (mínimo de 10 plantas) de pH variaram de 5.4 a 6.6 e estão na faixa dos observados no apoplasto/xilema de outras espécies (Gollan *et al.*, 1992; Schurr *et al.*, 1992; Wilkinson e Davies, 1997; Correia *et al.*, 1999; Jokhan *et al.*, 1999), inclusive tomate (Else *et al.*, 1996; Bialczyk e Lechowski, 1995; Jackson *et al.*, 1996; Wilkinson *et al.*, 1998). Valores de pH de até 6.8 já foram observados na seiva do xilema de *Lupinus* (Correia *et al.*, 1999).

Observou-se que valores de pH, acima de 6,0, foram obtidos em seivas coletadas nos primeiros meses do ano (Figura 1B) e coincidiram com os meses de temperaturas médias mensais mais elevadas (Figura 1A). Entre abril e novembro, meses de menor temperatura média, os valores de pH

estiveram abaixo de 6,0, atingindo os menores valores, entre 5,4-5,6, de junho a setembro. Esse comportamento de pH da seiva do xilema, com um padrão de resposta relacionado com a temperatura média do ar, foi observado mesmo após as plantas terem permanecido durante uma semana na sala-de-crescimento, antes da coleta da seiva, mostrando que foi mantida a resposta do ambiente.

Na Figura 2 é mostrada a variação diurna do pH da seiva do xilema coletada durante meia hora de exsudação, em cinco meses durante o período experimental. Esse tempo de coleta não implicou em alteração no pH da seiva quando esta foi exposta ao ambiente. Logo, qualquer alteração no pH ocorrida nesse período torna-se insignificante e o pH avaliado representa o existente na seiva da planta intacta. Schurr e Schulze (1995) observaram um aumento de 0,5 unidade de pH da seiva do xilema somente nove horas após a coleta do exsudato.

O pH da seiva coletada nos meses de fevereiro, maio e setembro de 2000 não apresentou variação diurna. Na seiva coletada em dezembro/00 e em janeiro/01 o pH ficou em torno de 5.92 ± 0.08 , em coletas realizadas das 9:00 às 9:30 horas, e de 6.5 ± 0.09 , em coletas realizadas das 17:30 às 18:00 horas (pontos isolados no gráfico).

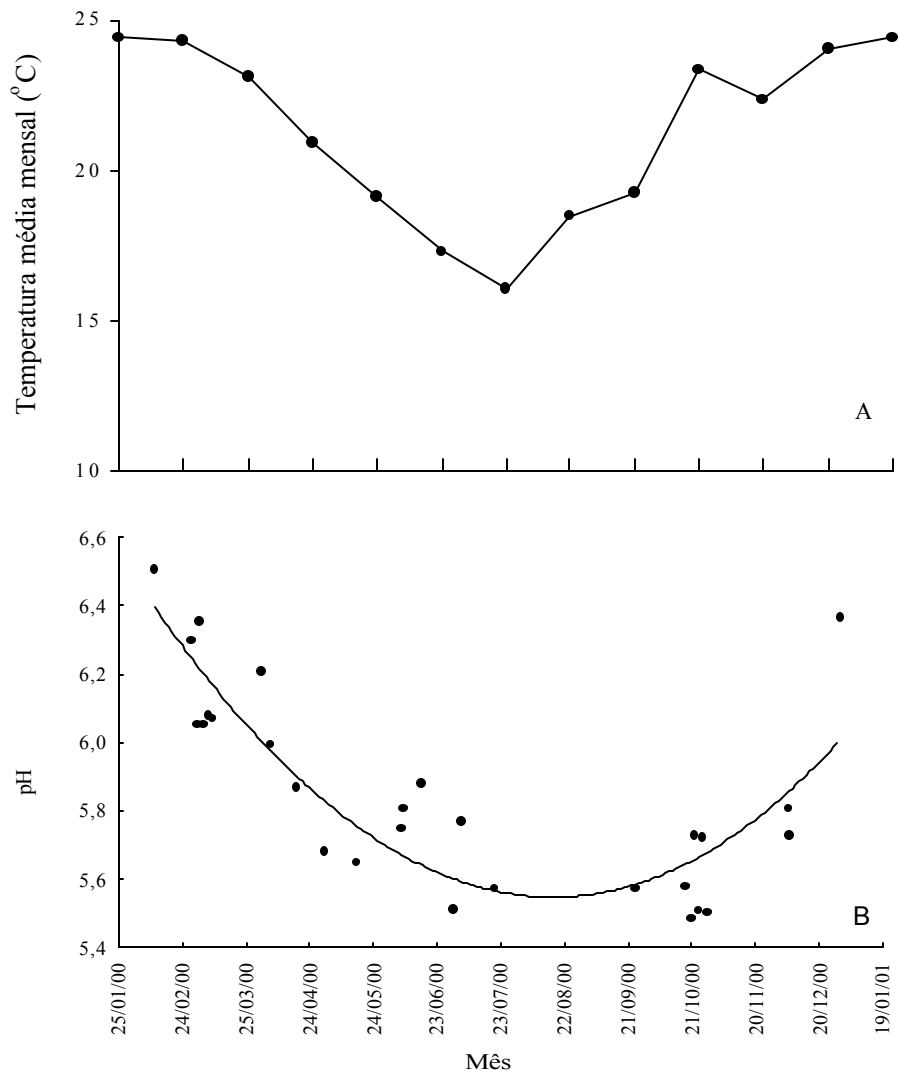


Figura 1. Temperatura média mensal durante o período de avaliação (A) e variação sazonal do pH da seiva do xilema (B), coletada no caule a 5 cm do colo de plantas de tomate com idade entre 40-45 dias. Cada ponto de valor de pH representa a média de, pelo menos, 10 plantas.

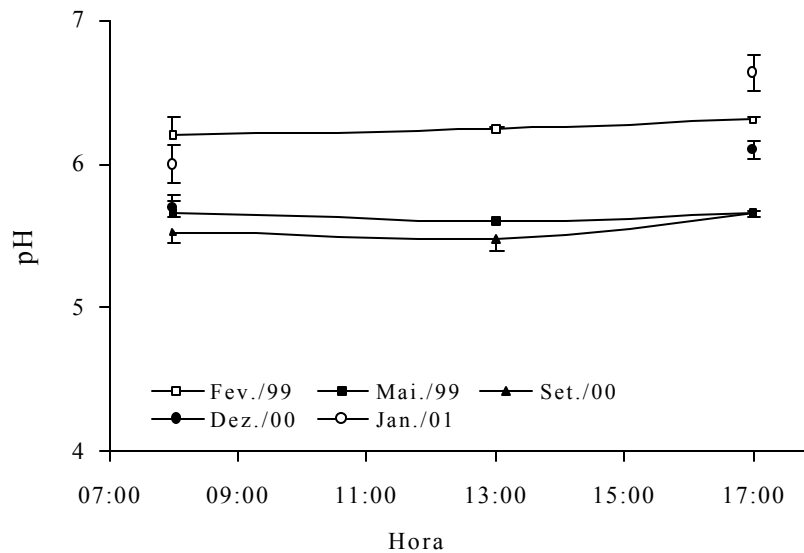


Figura 2. Variação diurna do pH da seiva do xilema coletada no caule a 5 cm acima do colo de plantas de tomate com idade entre 40-45 dias. Cada ponto representa a média da seiva xilemática de quatro plantas.

Resultados sobre variação diurna do pH da seiva semelhantes aos observados em dezembro foram os de Schurr e Schulze (1995) na seiva de *Ricinus communis*, na qual o pH aumentou de 6,0, nas primeiras horas da manhã, para 6,6, no final do dia. À semelhança dos resultados obtidos nas demais épocas, Wilkinson *et al.* (1998) observaram em *L. esculentum* cv. Ailsa que os valores de pH da seiva permaneciam constantes no período diurno. Como nesses trabalhos não são citadas as épocas em que os experimentos foram realizados, os resultados divergentes podem estar associados à espécie ou à época de coleta da seiva.

Alguns autores atribuem as variações diurnas e sazonais do pH da seiva do xilema às variações de temperatura e de radiação, que influenciam a atividade da H^+ -ATPase e, por sua vez, o pH (Wilkinson, 1999). Os maiores valores de pH da seiva foram observados nos meses de temperaturas mais elevadas. Esse comportamento pode estar relacionado ao efeito da temperatura sobre a atividade da H^+ -ATPase da membrana plasmática e, conseqüentemente, do pH apoplástico (Correia *et al.*, 1999). Os

resultados do presente experimento foram diferentes dos observados na seiva do xilema de outras espécies, em que o pH apresenta-se mais ácido no início da primavera e mais próximo da neutralidade no inverno (Fromard *et al.*, 1995). Embora o mecanismo de alteração do pH da seiva não seja conhecido, algumas células vivas associadas aos vasos do xilema e detentoras de uma grande quantidade de H^+ -ATPase da membrana plasmática parecem controlar o pH. Variações na densidade da H^+ -ATPase, na regulação e na carga energética estão implicados na variação sazonal do controle do pH, pelas células associadas aos vasos (Fromard *et al.*, 1995). A composição de açúcares da seiva apoplástica também apresenta variações diurnas e anuais e altera a atividade da H^+ -ATPase (Wilkinson, 1999). Como o transporte de íons e nutrientes orgânicos através da membrana plasmática depende do gradiente de potencial elétrico e de pH gerado em cada lado da membrana, alterações diurnas e anuais na composição iônica da seiva também contribuem para alterações no pH (Gollan *et al.*, 1992; Correia *et al.*, 1999).

Variações no pH da seiva do xilema são normalmente tamponadas, mas podem ter efeitos potenciais em regiões e/ou processos localizados dentro da folha (Schurr e Schulze, 1995). O pH da seiva do xilema pode variar da base do caule até o ápice (Schill *et al.*, 1996). Os valores apresentados no presente experimento foram obtidos de seivas coletadas acima da primeira folha definitiva (5 cm acima do colo da planta). O pH medido em seiva exsudada do pecíolo da quinta folha, usada nas avaliações, foi 0,6 unidades mais alcalino; subiu de 5,64, no colo, para 6,13, na seiva do pecíolo da 5ª folha (dados não apresentados). Essa variação de pH não pode ser atribuída à variação nos teores de nutrientes, uma vez que não houve diferenças de concentração nos dois locais de coleta da seiva (Figura 3). Considerando que em alguns sítios apoplásticos próximos às células-guarda o pH pode ser mais alcalino que no apoplasto da epiderme e este mais alcalino que no xilema (Wilkinson, 1999), e que o pH torna-se mais alcalino à medida que distancia da base do caule, essas variações podem ser significantes em alguns processos.

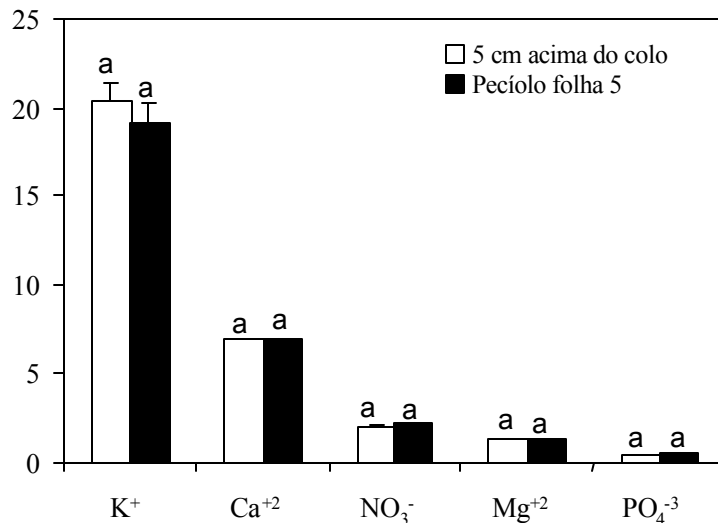


Figura 3. Concentração de nutrientes na seiva do xilema coletada no caule, a 5 cm acima do colo da planta, e no pecíolo da 5ª folha, em plantas de tomate com 43 dias de idade.

Variação sazonal e diurna do teor de nutrientes da seiva do xilema

Na Figura 4 é mostrada a variação na concentração de nutrientes na seiva do xilema coletada em vários meses no período de outubro de 1999 a outubro de 2000. Para os cátions em geral e nitrato, as maiores concentrações na seiva ocorreram em abril/junho. As menores concentrações de nitrato e potássio ocorreram nas seivas coletadas em outubro, aumentando até abril/junho e reduzindo novamente a partir daí. Esses íons ocorreram em maior concentração nas seivas coletadas nos meses de temperaturas mais baixas. As concentrações dos demais nutrientes variaram muito no decorrer do período avaliado, não apresentando um padrão relacionado com a época de coleta.

Na Figura 5 é mostrada a variação diurna na concentração de cátions e ânions da seiva do xilema, cujas coletas foram realizadas às 9:00, 11:00, 14:00 e 16:00 horas, no mês de julho. A amplitude na variação das concentrações, no intervalo analisado, foi pequena para todos os nutrientes, exceto potássio, o qual apresentou com valores de 8 a 16 mM, representando 75% e 57% da concentração total de todos os cátions analisados às 9:00 e 16:00 horas, respectivamente. Foi o único íon, cuja concentração foi

reduzida durante o dia; na seiva coletada às 16:00 horas sua concentração foi 50% menor em relação à encontrada na seiva coletada às 9:00 horas.

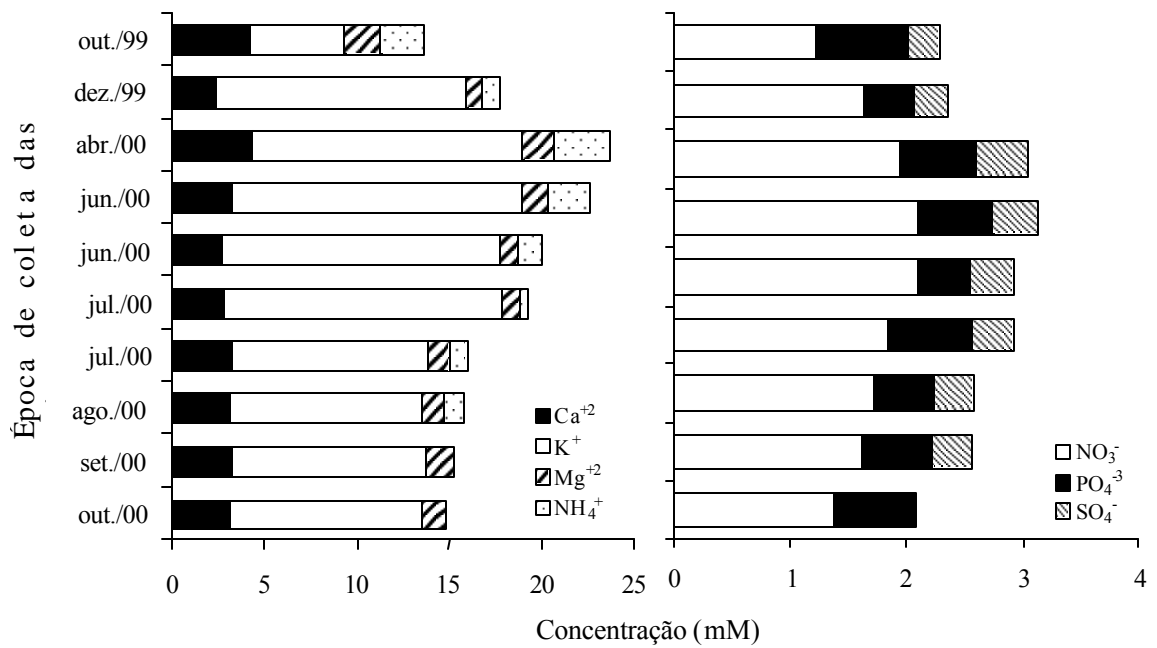


Figura 4. Variação sazonal da concentração de cátions (gráfico à esquerda) e de ânions (gráfico à direita) na seiva do xilema, coletada no caule a 5 cm acima do colo de plantas de tomate com idade entre 40-45 dias.

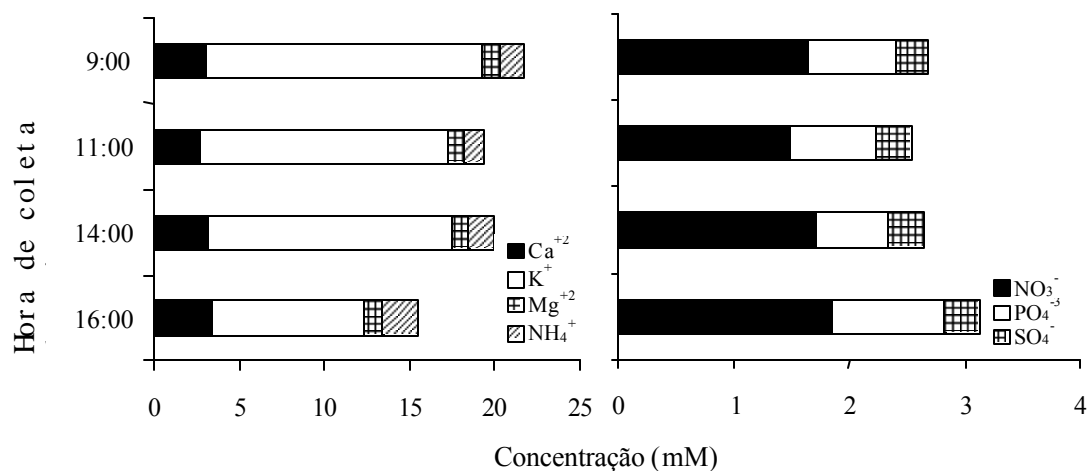


Figura 5. Variação diurna da concentração de cátions (gráfico à esquerda) e de ânions (gráfico à direita) na seiva do xilema coletada no caule a 5 cm acima do colo de plantas de tomateiro com 45 dias de idade, no mês de julho de 2000.

O contrário ocorreu com amônio, cuja concentração na seiva coletada às 16:00 horas foi 36% maior em relação à coletada às 9:00 horas. As concentrações de cálcio e magnésio não apresentaram variações significativas durante o dia. Dentre os ânions, NO_3^- foi o encontrado em maior concentração, 1,6-1,8 mM, representando 59% de todos os ânions analisados. Sua menor concentração na seiva foi observada às 11:00 horas (1,48 mM), mostrando uma tendência de aumento no final da tarde (1,84 mM). A concentração de PO_4^{3-} foi 20% maior na seiva coletada às 16:00 horas em relação à das 9:00 horas. A concentração de sulfato na seiva não apresentou variação diurna.

A quantidade total de cátions inorgânicos foi maior que a de ânions, com variação diurna entre 21,6-15,4 mM e 2,6-3,1 mM, respectivamente. A relação cátions/ânions, em torno de 8 no início da manhã, reduziu para 5 no final do dia, provavelmente, devido à grande redução ocorrida nos teores de potássio.

A proporção cátions/ânions na seiva do xilema das plantas do presente experimento diferiram grandemente da observada por Bialczyk e

Lechowski (1995). Estes autores, trabalhando com *Lycopersicon esculentum* var. Ailsa, observaram que a proporção cátions/ânions da seiva xilemática estava em torno 1, ao contrário do presente experimento em que essa relação variou de 5 a 8 durante o dia. Por outro lado, excesso de cátions sobre ânions em apoplastos/xilema é uma observação comum (Dietz, 1997; Gabriel e Kesselmeier, 1999). Gabriel e Kesselmeier (1999) observaram que no apoplasto de algumas espécies havia uma concentração de 4 a 17 vezes mais de cátions inorgânicos em relação à de ânions inorgânicos. Segundo os autores, esse comportamento está associado à alta capacidade de troca de cátions da parede celular, o apoplasto servindo como um reservatório para cátions.

A pequena amplitude de variação diurna observada no presente experimento concorda com outros resultados reportados, mas está aquém das variações observadas por Schurr e Schulze (1996) na seiva do xilema de plantas intactas, na qual mostraram grandes variações diurnas para constituintes minerais e orgânicos. Uma razão para a diferença está no processo de obtenção da seiva; no fato de eliminar a parte aérea e da aplicação ou não de pressão no sistema radicular. Essas diferenças são atribuídas aos transportes passivos e ativos de carregamento de constituintes do xilema, que podem ser alterados devido às diferenças nas taxas de fluxo entre uma planta intacta e uma, cujo sistema radicular foi separado da parte aérea. Segundo Huang *et al.* (1992), estudos em que a parte aérea tem que ser eliminada para a obtenção da seiva devem ser conduzidos dentro de um intervalo mínimo de tempo para evitar os efeitos deletérios da abscisão da parte aérea sobre a absorção.

Taxa transpiratória em função da época e hora de coleta das seivas

Na Figura 6 são mostradas as taxas transpiratórias de folhas destacadas e imersas em seivas coletadas em outubro e dezembro de 1999 e abril, junho e julho de 2000, cujos pHs foram ajustados para 6,0. Até duas horas após imersão do pecíolo das folhas nas seivas, a transpiração manteve-se constante, reduzindo após três horas de imersão, a magnitude da redução

variando em função da época de coleta. Na seiva coletada em dezembro de 1999 a taxa transpiratória manteve-se constante durante as quatro horas de avaliação. As maiores reduções da taxa transpiratória ocorreram em folhas imersas nas seivas coletadas em outubro de 1999 e julho de 2000.

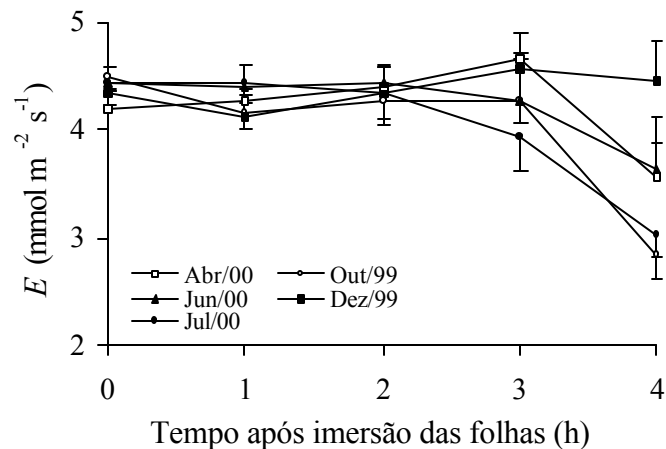


Figura 6. Taxa transpiratória (E) de folhas destacadas e imersas em seivas do xilema coletadas de plantas de tomate com idade entre 40-45 dias, em várias épocas do ano. O pH da seiva foi ajustado para 6.0.

Reduções na taxa transpiratória e na condutância estomática em folhas destacadas e com pecíolos imersos em seivas artificiais são geralmente atribuídas a diferenças no pH, níveis de ABA e de nutrientes do fluxo transpiratório (Wilkinson e Davies, 1997; Wilkinson *et al.*, 1998). Em todos os casos as maiores reduções são sempre observadas nas folhas imersas em seivas com pH mais alcalino. No presente experimento, o pH da seiva foi ajustado para 6,0, e o teor de ABA na seiva não foi quantificado nas diferentes épocas de coleta da seiva.

As pequenas variações diurnas de pH podem ser tamponadas dentro do mesófilo e ter pequeno efeito na concentração do ABA foliar (Jarvis e Davies, 1997; Tardieu e Simonneau, 1998). Isso pode justificar o fato de que

as taxas transpiratórias não diferiram entre folhas imersas em seivas coletadas pela manhã e à tarde (Figura 7), quando o pH foi ajustado.

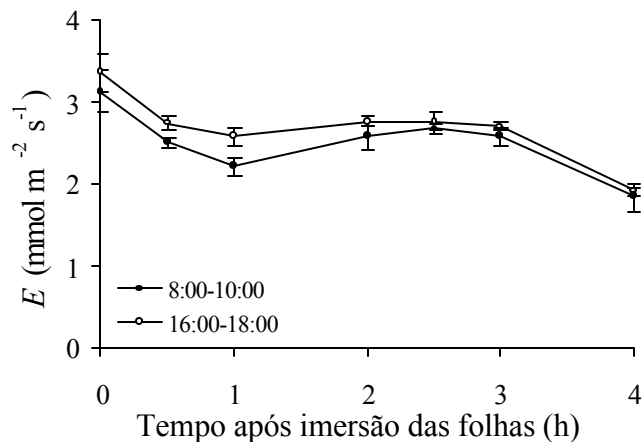


Figura 7. Taxa transpiratória (E) de folhas destacadas e imersas em seiva do xilema coletadas de plantas de tomate com idade entre 40-45 dias, em dois horários durante o dia. O pH da seiva foi ajustado para 6,0.

Para uma dada concentração de ABA na seiva, a redução na condutância estomática é maior em plantas crescidas em temperaturas mais elevadas (Correia *et al.*, 1999). Embora não tenham sido realizadas avaliações comparativas de transpiração, para um dado nível de ABA na seiva, entre plantas cultivadas nos diferentes períodos de avaliação de pH, a taxa transpiratória das folhas de plantas cultivadas durante o inverno (temperaturas menores) foi, em geral, menor que a das folhas de plantas cultivadas durante o verão (temperaturas mais elevadas), com avaliações realizadas nas mesmas condições.

A concentração de fosfato, nitrato e cálcio na seiva do xilema alteram a sensibilidade estomática para ABA (Radin *et al.*, 1982; Ruiz *et al.*, 1993). Embora as concentrações dos íons nitrato e fosfato tenham variado no decorrer do dia (Figura 5), o que poderia alterar a resposta estomática, suas

determinações não foram feitas nas mesmas seivas utilizadas no experimento da Figura 7.

As seivas coletadas nas várias épocas tiveram tempos diferenciados de armazenamento a -20°C . O congelamento a essa temperatura parece formar polímeros que inibem a taxa transpiratória, embora isso parece acontecer apenas em seivas armazenadas coletadas de plantas estressadas (Munns *et al.*, 1993). Portanto, as variações observadas na taxa transpiratória de folhas imersas em seivas coletadas nas diferentes épocas do ano podem estar relacionadas às variações ocorridas nos teores de ABA e/ou nutrientes. Além disso, a alteração no pH em função de variação na concentração de nutrientes pode ser a forma como os nutrientes afetam o comportamento estomático, efeito que não pode ser inferido no presente experimento, uma vez que o pH da seiva foi ajustado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIALCZYK, J.; LECHOWSKI, Z. Chemical composition of xylem sap of tomato grown on bicarbonate containing medium **Journal of Plant Nutrition**, v.18, n.10, p.2005-2021, 1995.
- CATALDO, D.A.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Soil Science and Plant Analysis Communication**, Monticello, v.6, p.71-80, 1975.
- CORREIA, M.J.; RODRIGUES, M.L.; OSÓRIO, M.L.; CHAVES, M.M. Effects of growth temperature on response of lupin stomata to drought and abscisic acid. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.26, p.549-555, 1999.
- DANNEL, F.; PFEFFER, H.; MARSCHNER, H. Isolation of apoplasmic fluid from sunflower leaves and its use for studies on influence of nitrogen supply on apoplasmic pH **Journal Plant Physiology**, 146:273-278, 1995.
- DIETZ, K.J. Functions and responses of the leaf apoplast under stress. In: **Progress in Botany, structural botany, physiology, genetics, taxonomy, geobotany**. Ed. Springer Verlag, Berlin. p.221-254. 1997.
- ELSE, M.A.; TIEKSTRA, A.E.; CROKER, S.J.; DAVIES, W.J.; JACKSON, M.B. Stomatal closure in flooded tomato plants involves abscisic acid and a chemically unidentified anti-transpirant in xylem sap. **Plant Physiology**, v.112, p.239-247, 1996.
- FROMARD, L.; BABIN, V.; FLEURAT-LESSARD, P.; FROMONT, J.C.; SERRANO, R.; BONNEMAIN, J.L. Control of vascular sap pH by the vessels-associated cells in woody species. **Plant Physiology**, v.108, p.913-918, 1995.
- GABRIEL, R.; KESSELMEIER, J. Apoplastic solute concentration of organics acids and mineral nutrients in the leaves of several fagaceae. **Plant Cell Physiology**, v.40, n.6, p.604-612, 1999.
- GOLLAN, T.; SCHURR, U.; SCHULTZE, E.D. Stomatal responses to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. I. The concentration of cations, anions, amino acids in and ph of the xylem sap. **Plant, Cell and Environment**, v.15, p.551-559, 1992.
- HECKENBERGER, U.; SCHURR, U.; SCHULZE, E.D. Stomatal response to abscisic acid fed into the xylem of intact

- Helianthus annuus* (L.) plants. **Journal Experimental of Botany**, v. 47, n. 302, p. 1405-1412, 1996.
- HUANG, Z. Z.; YAN, X.; JALIL, A.; NORLYN, J. D.; EPSTEIN, E. Short term experiments on ion transport by seedlings and excised roots. **Plant Physiology**, v. 100, p. 1914-1920, 1992.
- ILAN, N.; MORAN, N.; SCHWARTZ, A. The role of potassium channels in the temperature control of stomatal aperture. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1161-1170, 1995.
- JACKSON, M. B.; DAVIES, W. J.; ELSE, M. A. Pressure-flow relationships, xylem solutes and root hydraulic conductance in flooded tomato plants. **Annual Review Botanical**, v. 77, p. 17-24, 1996.
- JARVIS, A. J.; DAVIES, W. J. Whole plant ABA flux and the regulation of water loss in *Cedrella odorata*. **Plant, Cell and Environment**, v. 20, p. 521-527, 1997.
- JOKHAN, A. D.; HARI NK, R. J.; JACKSON, M. B. Concentration and delivery of abscisic acid in xylem sap are greater at the shoot than at a target leaf nearer to the shoot apex. **Plant Biology**, v. 1, p. 253-260, 1999.
- LINDEMAN, W. Observations on the behaviour of phosphate compounds in *Clorella* at transition from dark to light. In: **UNITED NATIONS INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE PEACEFUL USES OF ATOMIC ENERGY**, 2, 1958, Geneva. Proceedings... Geneva:[s.n.], 1958. Vol. 24, pt.1, p.8-15: Isotopes in Biochemistry and Physiology.
- MACCULOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta**, v. 17, p. 297-304, 1967.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; E OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas. Principios e aplicações**. Associação Brasileira para Pesquisa da Potássio e do Fósforo. Piracicaba, SP, 1989, 201p.
- MUNNS, R.; PASSIOURA, J. B.; MILBORROW, B. V.; JAMES, R. A.; CLOSE, T. J. **Plant Cell and Environment**, v. 16, p. 867-872, 1993.
- RADIN, J. W.; PARKER, L. L.; GUINN, G. Water relations of cotton plants under nitrogen deficiency. V. Environmental control of abscisic acid accumulation and stomatal sensitivity to abscisic acid. **Plant Physiology**, v. 70, p. 1066-1070, 1982.
- RUIZ, L. P.; ATKINSON, C. J.; MANSFIELD, T. A. Calcium in the xylem and its influence on the behaviour of stomata. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v. 341, p. 67-74, 1993.
- SCHILL, V.; HARTUNG, W.; ORTHEN, B.; WEISENSEEL, M. H. The xylem sap of maple (*Acer platanoides*) trees-sap obtained by a novel method shows changes with season and height. **Journal Experimental of Botany**, v. 47, p. 123-133, 1996.

- SCHURR, U.; GOLLAN, T.; SCHULTZE, E. D. Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. **Plant, Cell and Environment**, v.15, p.561-567, 1992.
- SCHURR, U.; SCHULTZE, E. D. The concentration of xylem sap constituents in root exudate, and in sap from intact, transpiring castor bean plants (*Ricinus communis* L.). **Plant, Cell and Environment**, v.18, p.409-420, 1995.
- SCHURR, U.; SCHULZE, E. D. Effects of drought on nutrient and ABA transport in *Ricinus communis*. **Plant, Cell and Environment**, v.19, p.665-674, 1996.
- TARDIEU, F.; SIMONNEAU, T. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand. Modelling isohydric and anisohydric behaviours. **Journal of Experimental Botany**, v.49, Special Issue, 1998.
- WILKINSON, S. PH as a stress signal. **Plant Growth Regulation**, v.29, p.87-99, 1999.
- WILKINSON, S.; CORLETT, J.E.; OGER, L.; DAVIES, W.J. Effects of xylem pH on transpiration from wild-type and *flacca* tomato leaves. **Plant Physiology**, v.117, p.703-709, 1998.
- WILKINSON, S.; DAVIES, W.J. Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. **Plant Physiology**, v.113, p.559-573, 1997.
- ZHANG, J.; SCHURR, U.; DAVIES, W.J. Control of stomatal behavior by abscisic acid which apparently originates in the roots. **Journal of Experimental Botany**, v.28, p.1174-1181. 1987.

CAPÍTULO 2

RELAÇÃO ENTRE TRANSPIRAÇÃO, POTENCIAL HÍDRICO FOLIAR, CONCENTRAÇÃO DE ABA, NUTRIENTES E pH DA SEIVA XILEMÁTICA EM TOMATEIROS SUBMETIDOS AO ESTRESSE HÍDRICO

ABSTRACT- Plants of *Lycopersicon esculentum* Mill. var. Santa Clara, with age among 43-45 days, was submitted to slow and fast water stress. The slow stress was induced by the crescent application of PEG 6000 to the nutrient solution: day 1 (1% of PEG), day 2 (3% of PEG), day 3 (5% of PEG), day 4 (7% of PEG). In those concentrations of PEG, the osmotic potential of the

solutions were of $-0,06$, $-0,24$, $-0,49$ and $-0,83$ MPa, respectively. In each of those days, at the 9:00 hours, after evaluation of the transpiratory rate (E) and of the leaf water potential, the sap of the xylem was collected for the determination of the pH, contents of Ca^{+2} , K^+ , Mg^{+2} , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{-3} and SO_4^{-2} and of abscisic acid. The fast stress was induced by the addition from 7% of PEG 6000 to the nutrient solution. After 1, 2, 3, 4 and 5 hours the same evaluations were accomplished, besides the ABA content in the leaves and roots. In the plants subjected to the slow stress, E decreased by the second day. In the plants subjected to the fast stress, reduction of E was observed two hours after the addition of PEG to the solution. The concentration of ABA in the xylem sap of the stressed plants was two (in fast stress) and six times (in slow stress) larger than in the plants control. The increase in the concentration of ABA was larger in the plants subjected to the slow stress. The pH of the xylem sap increased in 0,7 units in the plants subjected to the fast stress, while in the plants subjected to the slow stress there was not variation. Both stresses promoted an increase in the total amount of nutrients in the sap, mainly in the potassium and ammonium. The concentration of nitrate increased in the sap of plants subjected to the two forms of stresses, while the one of calcium just increased in the sap of plants subjected to fast stress. The addition of fusicoccin, lanthano chloride and red of ruthenium to the artificial sap promoted alterations in the stomatal closing induced by ABA in detached leaves. The activity of the nitrate reductase in leaves and roots was also reduced with the imposition of the stresses. The results show that the signaling between root and its leaves aerial it can be modulated differently in function of the intensity and duration of the stress.

Additional index terms: water deficits, xylem sap, root-to-shoot communication, abscisic acid, cations, anions.

RESUMO- Plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill. var. Santa Clara, com idade entre 43-45 dias, foram submetidas a estresse hídrico lento e rápido. O estresse lento foi induzido mediante a aplicação gradativa, diária e crescente de PEG 6000 à solução nutritiva: dia 1 (1% de PEG), dia 2 (3% de PEG), dia 3 (5% de PEG), dia 4 (7% de PEG). Nessas concentrações de PEG, os potenciais osmóticos das soluções foram de $-0,06$, $-0,24$, $-0,49$ e $-0,83$ MPa, respectivamente. Em cada um desses dias, às 9:00 horas, após avaliação da taxa

transpiratória (E) e do potencial hídrico foliar (Ψ_f), a seiva do xilema foi coletada para a determinação do pH, teores de Ca^{+2} , K^+ , Mg^{+2} , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{-3} e SO_4^{-2} e de ácido abscísico (ABA). O estresse rápido foi induzido mediante a adição de 7% de PEG 6000 à solução nutritiva e após 1, 2, 3, 4 e 5 horas foram realizadas as mesmas avaliações, além do teor de ABA nas folhas e raízes. Nas plantas submetidas ao estresse lento, E diminuiu a partir do segundo dia, e nas plantas submetidas ao estresse rápido, duas horas após a adição de PEG à solução. Em ambos os casos, a redução em E foi observada em plantas cujo Ψ_f ainda não havia sido alterado, e a concentração de ABA na seiva do xilema das plantas estressadas era duas (estresse rápido) e seis vezes (estresse lento) maior que nas plantas controle. A magnitude de aumento na concentração de ABA foi maior nas plantas submetidas ao estresse lento. O pH da seiva do xilema aumentou em 0,7 unidades nas plantas submetidas ao estresse rápido, enquanto que nas plantas submetidas ao estresse lento não houve variação. Ambos os estresses promoveram um aumento na quantidade total de nutrientes na seiva, principalmente nos teores de potássio e amônio. A concentração de nitrato aumentou na seiva de plantas submetidas às duas formas de estresses, enquanto que a de cálcio aumentou apenas na seiva de plantas submetidas a estresse rápido. A adição de fusicocina, cloreto de lantânio e vermelho de rutênio à seiva artificial promoveram alterações no fechamento estomático induzido por ABA em folhas destacadas. A atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes também foi reduzida com a imposição dos estresses. Os resultados mostram que a sinalização entre raiz e parte aérea pode ser modulada diferentemente em função da intensidade e duração do estresse.

Termos adicionais para indexação: déficit hídrico, seiva do xilema, comunicação raiz- parte aérea, ácido abscísico, cátions, ânions.

INTRODUÇÃO

As plantas são capazes de "perceber" a deficiência de água no solo, independente de alterações no estado hídrico da parte aérea, mediante transferência de sinais químicos da raiz para as folhas (Jenssen *et al.*, 1996). Raízes em desidratação sintetizam ácido abscísico (ABA) mais rapidamente que tecidos túrgidos, o que resulta no aumento de sua concentração na seiva do xilema. O ABA na seiva do xilema é translocado para a parte aérea, via fluxo transpiratório, onde promove o fechamento estomático e influencia outros processos metabólicos (Salah e Tardieu, 1997; Bacon *et al.*, 1998). Dessa forma, a planta é capaz de manter estável o estado hídrico

foliar apesar da redução na disponibilidade de água no solo.

Entretanto, os estômatos podem fechar, em resposta ao déficit hídrico, antes do início da síntese de ABA na raiz ou parte aérea (Thompson *et al.*, 1997). O aumento no pH da seiva do xilema, que geralmente ocorre em plantas crescendo em solo com reduzida disponibilidade de água (Gollan *et al.*, 1992; Correia e Pereira, 1995; Bacon *et al.*, 1998), pode intensificar o fechamento estomático por alterar a distribuição de ABA sem requerer sua síntese (Schurr *et al.*, 1992). Esta hipótese é baseada no fato de ser o ABA um ácido fraco e seu acúmulo ocorrer em compartimentos mais alcalinos. Em apoplastos mais alcalinos é reduzida a capacidade das células do mesofilo e da epiderme de sequestrar o ABA (Wilkinson e Davies, 1997), mantendo-o no apoplasto. Reduções na taxa transpiratória, associada ao aumento no pH apoplástico, já foram observadas em várias espécies (Wilkinson e Davies, 1997; Thompson *et al.*, 1997; Wilkinson *et al.*, 1998), que tinham níveis de ABA correspondentes aos encontrados em plantas irrigadas. Nesses casos, o aumento no pH apoplástico tem sido associado à redução na atividade da H⁺-ATPase da membrana plasmática (Patonnier *et al.*, 1999), a mudanças no sítio de redução do nitrato (Dannel *et al.*, 1995) e a alterações na composição da seiva do xilema (Schurr *et al.*, 1992; Netting, 2000).

Embora haja uma boa correlação entre o declínio na condutância estomática e aumento na concentração de ABA na seiva do xilema em plantas submetidas à deficiência hídrica, alguns trabalhos (Schurr *et al.*, 1992; Correia e Pereira, 1995) mostram que a concentração de ABA não explica totalmente o

fechamento estomático em resposta à seca. As observações de que em plantas individuais (Schurr *et al.*, 1992) o decréscimo na condutância estomática ocorre linearmente com o aumento na concentração de ABA no xilema sugerem que a quebra na correlação é devida à variação na sensibilidade estomática para o ABA do xilema. Decréscimo nos teores de cálcio, fosfato e nitrato na seiva do xilema de plantas de girassol submetidas à deficiência foi observado por Schurr *et al.* (1992). Nessa espécie, aumento no pH da seiva xilemática de 5,8 para 7,1 mostrou uma forte correlação com a concentração de nitrato. Por outro lado, aumentos nos teores de cálcio na seiva do xilema de plantas submetidas à deficiência hídrica já foram observadas por Ruiz *et al.* (1993) e Correia *et al.* (1999). Desses resultados, concluiu-se que a sensibilidade estomática para o ABA importado das raízes é fortemente dependente do estado nutricional das plantas.

Uma vez que alterações na composição e pH da seiva do xilema ocorrem em plantas submetidas ao déficit hídrico, e considerando que os componentes da seiva podem alcançar o apoplasto circundante às células-guarda, e alterar o funcionamento estomático, estudou-se os efeitos: 1) do déficit hídrico, induzido de forma lenta e rápida, sobre as alterações na composição da seiva do xilema e sua relação com a taxa transpiratória, e sobre a alteração no sítio de redução do nitrato; 2) de inibidores de canais de cálcio e ativador da H-ATPase sobre o fechamento estomático induzido por ABA.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições de cultivo e avaliação

O experimento foi conduzido no Departamento de Biologia – Unidade de Crescimento de Plantas – da Universidade Federal de Viçosa. Sementes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L. var. Santa Clara) foram germinadas em areia e após 18-20 dias as plântulas foram transferidas para vasos (2 plantas/vaso) contendo 2,5 L de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), 1/2 força, pH 6,5, com sistema de aeração, e mantidas em casa-de-vegetação. A solução era trocada a cada dois dias e o volume de água transpirada repostado diariamente com água destilada.

Uma semana antes das avaliações, as plantas, com idade entre 43-45 dias, contados a partir da data de semeadura, foram transferidas para sala de crescimento com fotoperíodo de 14 horas (com início às 8:00 horas) e densidade de fluxo luminoso, na altura das plantas, de 500 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura entre 20-23 °C e umidade relativa do ar entre 60-63%. Durante as avaliações, a densidade de fluxo luminoso foi de 600 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ na altura das folhas avaliadas. Para filtrar a radiação calorífica das lâmpadas e evitar o aquecimento das folhas, foi colocada uma camada de água corrente entre a fonte de luz e as plantas.

Experimento com plantas inteiras

O estresse hídrico foi induzido com polietileno glicol 6000 (PEG 6000) em plantas com idade entre 43 - 45 dias. Com essa idade as plantas apresentavam-se ainda no estágio vegetativo.

Estresse rápido – Foi induzido mediante a adição de 7% de PEG 6000 à solução nutritiva. Nessa concentração de PEG o potencial osmótico (Ψ_s) da solução nutritiva foi de $-0,83$ MPa, calculado segundo Villela *et al.* (1991). Após 1, 2, 3, 4 e 5 horas da adição de PEG à solução foram determinados a taxa

transpiratória (E), o potencial hídrico foliar (Ψ_f) e realizada a coleta de seiva para a determinação do pH, potencial osmótico (Ψ_s), teores de Ca^{+2} , K^+ , Mg^{+2} , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{-3} , SO_4^{-2} e ácido abscísico (ABA). Os teores de ABA foram determinados também na raízes e nas folhas. A indução do estresse iniciou-se às 8:00 horas.

Estresse lento – foi induzido mediante a aplicação gradativa, diária e crescente de PEG 6000 à solução nutritiva: dia 1 (1% de PEG), dia 2 (3% de PEG), dia 3 (5% de PEG), dia 4 (7% de PEG). Nessas concentrações de PEG, os potenciais osmóticos das soluções foram de $-0,06$, $-0,24$, $-0,49$ e $-0,83$ MPa, respectivamente. Vinte e quatro horas após a adição do PEG 6000 à solução nutritiva, sempre às 9:00 horas, foram avaliados a taxa transpiratória (E), o potencial hídrico foliar (Ψ_f) e realizada a coleta de seiva para a determinação do pH, Ψ_s , teores de Ca^{+2} , K^+ , Mg^{+2} , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{-3} , SO_4^{-2} e ABA. Nesse caso, o ABA foi determinado apenas na seiva do xilema.

O Ψ_f foi determinado com uma bomba de pressão tipo Scholander (Skye, SKPM 1400) e o potencial osmótico da solução nutritiva e das seivas, com um osmômetro (OSMETTE, modelo 2007).

Experimento com folhas destacadas

Utilizou-se a quinta folha, destacada de plantas não estressadas e mantidas na sala-de-crescimento. Para avaliar o efeito da fusicocina, uma substância ativadora da H^+ -ATPase da membrana plasmática (Fromard *et al.*, 1995), sobre os estômatos, as folhas destacadas tiveram seus pecíolos imersos em seiva artificial (Wilkinson *et al.*, 1998), pH 7,0, constituída de 1,0 mM de KH_2PO_4 , 1,0 mM de K_2HPO_4 , 1,0 mM de CaCl_2 , 0,1 mM de MgSO_4 , 3,0 mM de KNO_3 e 0,1 mM de MnSO_4 . À seiva artificial foi ou não adicionado ABA para uma concentração final de 2,5 μM (Heckenberger *et al.*, 1996). A fusicocina (5 e 10 μM) foi dissolvida em dimetil sulfóxido (DMS) 0.2% (v/v) (Eung e Lee, 2000). O controle (seiva artificial sem fusicocina) continha a mesma percentagem de DMS.

Para avaliar o efeito de inibidores de canais de cálcio sobre os estômatos, folhas destacadas tiveram seus pecíolos imersos na mesma seiva artificial

contendo 100 μM de vermelho de rutênio e 10 mM de cloreto de lantânio, exceto que a concentração de cálcio foi de 3,0 mM, pH 6,0, contendo 2.5 μM de ABA.

Em todos os tratamentos, as folhas, imediatamente após destacadas, tiveram seus pecíolos imersos em água destilada e selecionadas para uma mesma taxa transpiratória inicial. Após isso, foram transferidas para as respectivas soluções de tratamento. O potencial osmótico da seiva artificial, avaliado logo após a adição dos compostos, não foi alterado. A taxa transpiratória foi avaliada tempos após às imersões.

Avaliação da taxa transpiratória e análise da seiva do xilema

Em todos os tratamentos o comportamento estomático foi observado avaliando-se as taxas transpiratórias (E), realizadas na superfície abaxial da quinta folha, com um analisador de gases pelo infravermelho portátil (modelo LCA-2, ADC, UK).

A coleta do exsudato do xilema foi realizada após as avaliações de E e Ψ_f . Para isso, foi feita uma excisão no caule acima da primeira folha definitiva, destacando-se a parte aérea. O corte foi lavado com água destilada, para evitar possíveis contaminações da seiva com substâncias contidas no suco das células rompidas durante a excisão. Após a excisão, as plantas foram transferidas para água destilada, para a coleta do exsudato. Esse procedimento foi utilizado para evitar a pressurização, que seria necessária para a coleta da seiva das plantas tratadas com PEG. Segundo Hartung e Radin (1989), a pressurização pode causar desidratação das raízes e afetar a composição da seiva.

Gotículas do exsudato foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur e os primeiros 500 μL foram colocados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para análise de ABA. Um outro grupo de plantas foi submetido ao mesmo tratamento. Usando o mesmo procedimento, a seiva foi coletada, medido o pH, e armazenada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para a análise dos nutrientes.

Análise de ABA

A separação do ABA da seiva foi feita em HPLC, e a quantificação (dosagem) por um teste imunológico (ELISA), usando anticorpos monoclonais,

segundo a metodologia descrita por Peres *et al.* (1997) e usada rotineiramente no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP).

Extração do ABA

Um grama de massa fresca de raiz e folha (5^a) foi macerado em metanol 80% gelado e acrescido de benzil hidróxi tolueno (0,18 mM) para diminuir a oxidação. O padrão radioativo (0,5 µCi) também foi adicionado nessa fase e a extração realizada sob 4°C durante 60 horas. Após a extração, os extratos foram passados em papel de filtro, filtros de nitrocelulose de 0,45 µm e 0,22 µm de crivo e depois em cartucho “sep-pak” G18, previamente ativado com metanol 80%. Para a seiva do xilema, 500 µL foram filtrados da mesma maneira, omitindo-se a filtragem no papel de filtro. O conteúdo do filtrado foi concentrado em rotavapor a 45°C, utilizando balões previamente silanizados. Os extratos resultantes foram então, ressuspensos em 400 µL (material vegetal) e 120 µL (seiva) de água ácida (pH 3,0), para posterior injeção em HPLC.

Separação do ABA em HPLC

Do extrato ressuspensado acima, 100 µL foram utilizados para injeção em HPLC. Durante o fracionamento em HPLC, as frações correspondentes ao ABA foram recolhidas em intervalos regulares e 100 µL de cada uma dessas frações foram adicionados a frascos contendo 2 ml de líquido de cintilação e realizada a contagem radioativa, para o cálculo do rendimento de extração. Para o ajuste das condições de separação do ABA em HPLC foram utilizadas soluções 100 µM do padrão desse hormônio.

Na cromatografia de fase reversa, utilizou-se como fase estacionária octadecil sílica C-18 em uma coluna preparativa Waters μ Bondapak 19 mm DI x 300mm. A fase móvel consistiu de uma mistura de metanol com água ultra purificada. Para aumentar a polaridade dos solventes adicionou-se o ácido fórmico à água (pH 3,0). Todos os solventes foram previamente desaerados com a aplicação de vácuo acoplado a um banho em ultrassom.

Após o fracionamento, as frações de interesse (correspondentes ao ABA) foram secas em "speed-vac" e posteriormente metiladas com 250 μ L de diazometano (dividido em três aplicações: 100 μ L + 100 μ L + 50 μ L) para cada tubo relacionado com o tempo de retenção do ABA e secas em capela. A metilação é necessária, pois os anticorpos utilizados para o ABA possuem melhor reação com as formas metiladas desse hormônio. O diazometano foi preparado dissolvendo-se 2,14 g de p-toluisulfonilmetilnitrosamida ou Diazald^{MR} em 30 mL de éter gelado e misturando-se esse conteúdo em 10 mL de etanol 96% acrescido de 0,4 g de KOH. A mistura foi destilada a 65°C, sendo o produto da destilação o diazometano.

Após metiladas, as frações foram ressuspensas em 420 μ L de água ultrapurificada, adicionada de NaN₃ 2,53 mM e utilizadas posteriormente na dosagem em ELISA.

Rendimento de extração do ABA

Adicionou-se 5 μ L de uma solução contendo aproximadamente de cis-trans(\pm) [³H] ABA em 2 mL do líquido de cintilação. A contagem da radioatividade das frações foi realizada em cintilômetro (Beckman LS 700). Para o cálculo do rendimento de extração comparou-se a contagem radioativa inicial (padrão) com

a do final do processo de extração e fracionamento dos extratos.

Dosagem do ABA em ELISA

Para a quantificação do ABA utilizou-se um teste tipo ELISA indireto que compreendeu três etapas: para a fixação foram utilizados 100 μL /orifício do antígeno conjugado ABA-OVA (AgF) dissolvido em tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,6, acrescido de azida de sódio 0,253 mM. A incubação foi realizada no escuro, a 4°C, durante 12 horas. Após isso, as placas foram lavadas 4 vezes com uma solução de “Tween 20” a 0,05%. Nas placas secas, foram adicionados 50 μL /orifício de AgL (ABA-M_e) em 10 diluições (para curva padrão). Ao mesmo tempo, foram adicionados 50 μL /orifício das amostras vegetais e incubou por 30 minutos a 4°C. A competição começou quando foram adicionados 50 μL /orifício do anticorpo monoclonal (AC1) diluído em tampão PBS adicionado de NaN_3 0,253 mM e 0,1 mL L⁻¹ de Triton 100x. As placas foram incubadas a 4°C, por 2 horas. Para a revelação, após lavagem das placas com “Tween 20” a 0,05%, depositou-se 100 μL /orifício do anticorpo AC2 (ligado à peroxidase) diluído em tampão tris-HCl, pH 8,0, acrescido de 0,2 mL L⁻¹ de Triton 100x. As placas foram incubadas por 1 hora, a 40°C. Após lavadas com “Tween 20” a 0,05%, foram depositados 100 μL /orifício de ABTS dissolvido (0,5 mg mL⁻¹) em tampão perborato, pH 4,4, e as placas incubadas por mais 1 hora, a 40°C, antes das leituras das densidades óticas a 405 nm.

Análise de nutrientes na seiva do xilema

Os teores de Ca^{+2} , Mg^{+2} e K^+ foram analisados por absorção atômica e espectrofotometria de chama. As concentrações de NO_3^- , PO_4^{-3} , NH_4^+ e SO_4^{-2} foram

determinadas espectrofotometricamente, conforme Cataldo *et al.* (1975), Lindeman (1958), Macculough (1967) e Malavolta *et al.* (1989), respectivamente.

Atividade da redutase do nitrato

A atividade da enzima redutase do nitrato seguiu a metodologia descrita por Cairo *et al.* (1991). Nas plantas submetidas ao estresse rápido, a coleta de material foi realizada 3 horas após a adição de 7% de PEG 6000 à solução de cultivo. Nas plantas submetidas ao estresse lento, a coleta foi realizada 24 horas após a adição de 3% de PEG 6000 à solução de cultivo. Nessas ocasiões, os estresses haviam promovido reduções na taxa transpiratória.

Após a coleta, as plantas foram separadas em raízes e folhas (lâminas foliares da 5^o folha), cujas partes foram subdivididas em fragmentos de aproximadamente 3 mm; 500 mg desse material foi colocado em recipientes contendo 5 mL de um meio de incubação, constituído de KNO₃ 100 mM, n-propanol 5% e tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,5. Esse conjunto, após ser submetido à infiltração à vácuo durante 2 minutos por duas vezes, foi colocado em banho-maria a 30°C, no escuro. A atividade da enzima foi medida durante 0,5 hora, retirando-se do meio de incubação alíquotas de 0,5 mL, aos 10 e 40 minutos de reação. Cada alíquota foi adicionada a um meio contendo 1 mL de sulfanilamida 1% em HCl 1,5 N, 1 mL de n-2-nafil-etileno diamino di-HCl 0,02% e água destilada para um volume final de 4 mL. As leituras espectrofotométricas foram feitas a 540 nm e os resultados expressos em $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ g}^{-1}$ de massa fresca h^{-1} .

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Todos os tratamentos compunham de pelo menos quatro repetições, exceto para a determinação de ABA, na qual foram utilizadas amostras compostas, resultantes de quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo teste F, a nível de 5% de probabilidade, sendo calculada a diferença mínima significativa pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do estresse hídrico sobre E , Ψ_f e pH da seiva xilemática

A taxa transpiratória (E) das plantas submetidas ao estresse hídrico rápido diminuiu duas horas após a adição de 7% de PEG 6000 à solução nutritiva (Figura 1A), mantendo-se mais ou menos constante até o final do experimento (5 horas após o início da indução do estresse). Nessa ocasião, o potencial hídrico foliar (Ψ_f) não havia sofrido alteração significativa (Figura 1C), mas o pH da seiva xilemática havia aumentado em 0,6 unidades (Figura 1C). Três horas após a adição de PEG 6000 à solução, o Ψ_f foi reduzido de -0,15 MPa (plantas controle) para -0,48 MPa (plantas tratadas com PEG 6000), mantendo-se estatisticamente constante até o final do experimento. O pH da seiva xilemática aumentou gradativamente até três horas após a adição de PEG à solução, tendo alcançado 0,7 unidades superior ao controle, diminuindo de valor após esse tempo (Figura 1C).

Nas plantas cuja adição de PEG 6000 à solução foi gradativa e crescente (estresse lento), E reduziu

(Figura 2A), sem qualquer redução no Ψ_f (Figura 2B), 24 horas após a adição de 1% de PEG 6000 à solução de cultivo (dia 2 no gráfico). Nessas plantas, o Ψ_f diferiu estatisticamente do controle 24 horas após a adição de 7% de PEG à solução (dia 4 no gráfico), quando o Ψ_s da mesma era de $-0,83$ MPa. Ao contrário do que ocorreu nas plantas submetidas ao estresse rápido, o pH da seiva xilemática das plantas submetidas ao estresse lento não foi alterado após o tratamento com PEG 6000 (Figura 2C).

Durante o tempo de imposição dos estresses rápido (5 horas) e lento (5 dias) não foram observadas alterações significativas no Ψ_s da seiva do xilema. Considerando plantas controle e tratadas, a média do Ψ_s da seiva do xilema variou entre $-0,079$ e $-0,081$ MPa (Tabela 1).

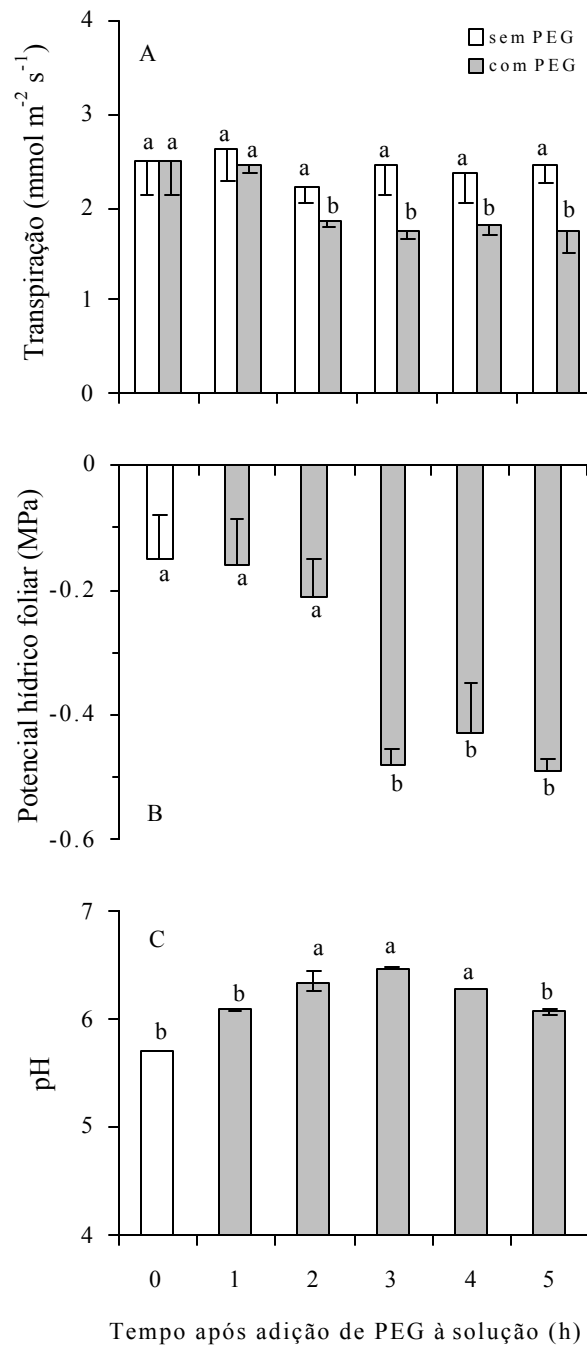


Figura 1. Transpiração (A), potencial hídrico foliar (B) e pH (C) da seiva xilemática de plantas de tomate, com 43 dias de idade, submetidas a estresse hídrico rápido, induzido pela aplicação de 7% de PEG 6000 à solução nutritiva.

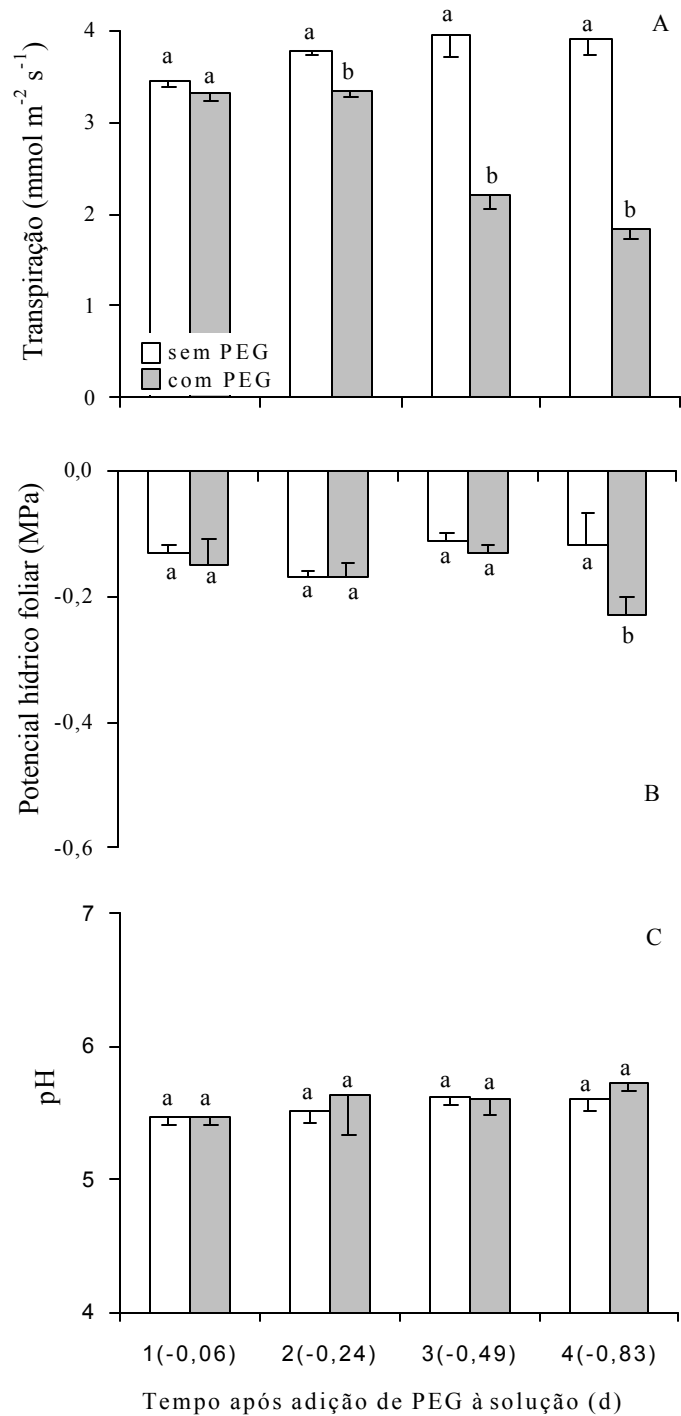


Figura 2. Transpiração (A), potencial hídrico foliar (B) e pH da seiva xilemática (C) de plantas de tomate, com idade entre 41-45 dias, submetidas a estresse hídrico lento, induzido pela adição gradativa, diária e crescente de PEG 6000 à solução nutritiva. Os números entre parênteses indicam o Ψ_s (MPa) da solução.

Tabela 1. Valores médios de Ψ_s da seiva do xilema (MPa), avaliado no final de cada experimento; 5 horas (nas plantas submetidas a estresse rápido) e 5 dias (nas plantas submetidas a estresse lento) após a adição de PEG 6000 à solução de cultivo.

	Ψ_s (MPa)	
	Estresse lento	Estresse rápido
Seiva das plantas controle	-0.079	-0.083
Seiva das plantas estressadas	-0.081	-0.080

Efeito do estresse hídrico sobre a concentração de ABA foliar, da seiva xilemática e da raiz

A concentração de ABA nas folhas das plantas submetidas ao estresse rápido mostrou uma ligeira redução à medida que o estresse progrediu (Figura 3A). Esse resultado contraria a maior parte dos observados em outros trabalhos que mostram que a concentração de ABA tende a aumentar em folhas de plantas submetidas a estresses com déficit hídrico (Wilkinson e Davies., 1997), salinidade (Wölf *et al.*, 1990), anoxia (Else *et al.*, 1996). Em condição de deficiência hídrica tanto a redução no metabolismo foliar de ABA (Wilkinson e Davies., 1997) quanto a redução no seu transporte via floema (Wölf *et al.*, 1990; Else *et al.*, 1996) são reduzidos. Por outro lado, Wölf *et al.* (1990) observaram um aumento na degradação de ABA em folhas de *Lupinus albus* submetido a estresse salino. Um estímulo na degradação de ABA por estresses foi observado também em alguns trabalhos citados pelos últimos autores.

A concentração de ABA determinada na seiva do xilema e nas raízes das mesmas plantas aumentou gradativamente com o tempo de estresse. Uma hora após

a adição de PEG 6000 à solução de cultivo, a concentração de ABA na seiva do xilema das plantas tratadas duplicou de valor, em relação às plantas controle (Figura 3B), enquanto que nas raízes o aumento foi de 30% (Figura 3C). Duas horas após a adição de PEG à solução, a concentração de ABA na seiva do xilema das plantas tratadas já era quatro vezes maior que na seiva das plantas controle, enquanto que nas raízes o aumento era de duas vezes. No final do experimento, cinco horas após a adição de PEG à solução, a concentração de ABA na seiva das plantas tratadas era 24 vezes maior que na seiva das plantas controle, enquanto que nas raízes esse aumento era de apenas 5 vezes, subindo de 29,86 para 704,93 pmol mL^{-1} , na seiva, e de 23,49 para 121,53 pmol g mf^{-1} , nas raízes.

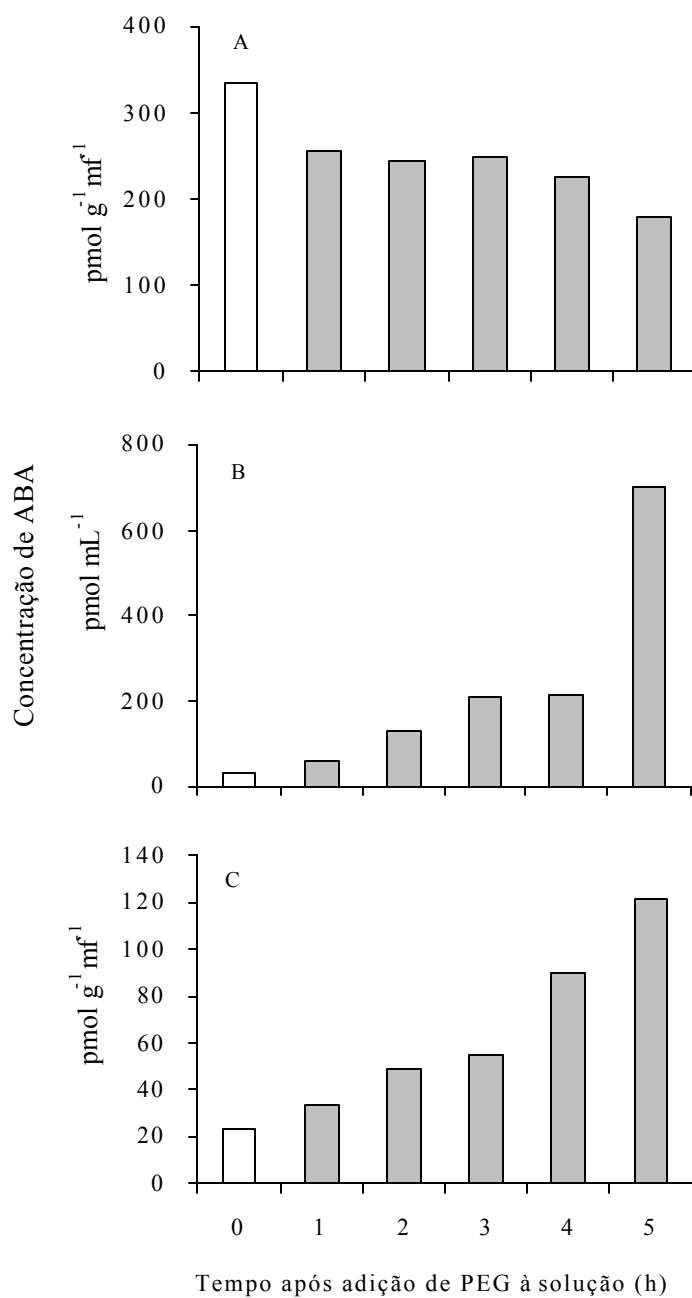


Figura 3. Concentração de ABA em folhas (A), seiva do xilema (B) e em raízes (C) de plantas de tomate, com 43 dias de idade, submetidas a estresse hídrico rápido, induzido pela aplicação de 7% de PEG 6000 à solução nutritiva.

Nas plantas submetidas ao estresse lento, 24 horas após a adição de 1% de PEG à solução de cultivo (dia 2 no gráfico), a concentração de ABA na seiva do

xilema das plantas estressadas era sete vezes maior que na seiva das plantas controle (Figura 4). No final do experimento, 24 horas após a adição de 7% de PEG à solução, a concentração de ABA na seiva xilemática das plantas tratadas havia aumentado 59 vezes; subiu de 2,39 pmol mL⁻¹ para 142 pmol mL⁻¹. Nessa ocasião, *E* nas plantas tratadas havia reduzido em 53%, de 3,9 mmol m² s⁻¹ para 1,83 mmol m² s⁻¹ (Figura 2A). A concentração de ABA não foi determinada nas folhas e raízes das plantas submetidas ao estresse lento.

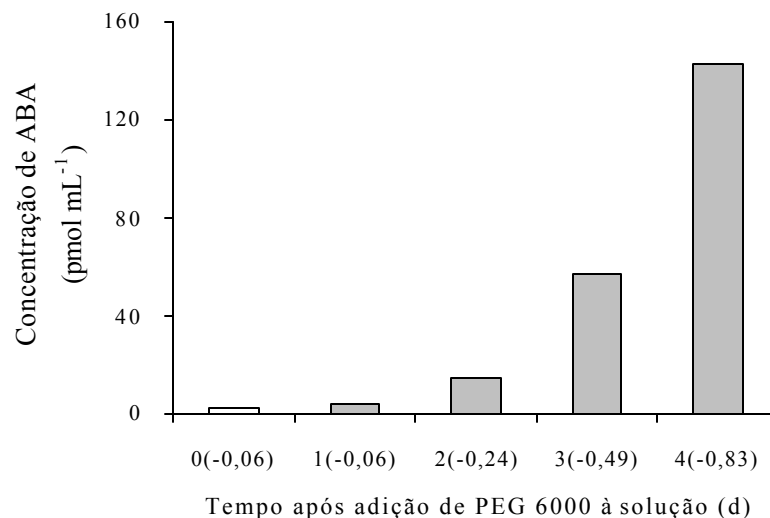


Figura 4. Concentração de ABA na seiva xilemática de plantas de tomate, com idade entre 41-45 dias, submetidas a estresse hídrico lento induzido pela adição gradativa, diária e crescente de PEG 6000 à solução nutritiva. Os números entre parênteses indicam o Ψ_s (MPa) da solução.

Os resultados confirmam a hipótese já conhecida de que raízes de plantas submetidas a déficit hídrico produzem um sinal químico, que é transportado para as folhas, via fluxo transpiratório, promovendo o fechamento estomático (mostrado no presente

experimento pela redução nas taxas transpiratórias) mesmo que não ocorra qualquer alteração no Ψ_f . Embora haja evidências de que outros componentes da seiva possam influenciar o comportamento estomático, o ABA exerce a maior influência (Zhang e Davies, 1989). O decréscimo na condutância estomática tem sido relacionado ao aumento na concentração apoplástica de ABA (Zhang e Davies, 1989; Zhang e Davies, 1990).

Tanto nas plantas submetidas ao estresse rápido (Figuras 3B) como nas plantas submetidas ao estresse lento (Figura 4), houve um significativo aumento na concentração de ABA na seiva do xilema, antes mesmo de ocorrer uma redução na taxa transpiratória (Figuras 1A e 2A), quando o Ψ_f ainda não havia sido alterado (Figuras 1B e 2B). Raízes desidratadas sintetizam ABA mais rapidamente que tecidos túrgidos (Zhang e Davies, 1989), o que resulta no aumento de sua concentração na seiva do xilema (Zhang e Davies, 1990). O aumento na concentração de ABA foi maior (59 vezes) na seiva das plantas submetidas ao estresse lento, do que nas plantas submetidas ao estresse rápido (24 vezes), provavelmente porque no primeiro caso o maior tempo de duração do estresse permitiu que uma maior quantidade de ABA fosse sintetizada nas raízes. Na seiva do xilema, o ABA, via fluxo transpiratório, é transportado para as folhas, acumulando no apoplasto circundante às células-guarda, onde promove o fechamento estomático, além de influenciar outros processos metabólicos na parte aérea, com ganho de carbono, iniciação e expansão foliares (Salah e Tardieu, 1997; Bacon *et al.*, 1998).

Embora haja uma boa correlação entre o declínio na condutância estomática e aumento na concentração de ABA na seiva do xilema, alguns trabalhos (Schurr *et al.*, 1992; Correia e Pereira, 1995) mostram que a

concentração de ABA na seiva não explica totalmente o fechamento estomático em resposta à seca, e que, principalmente em condições de campo essa relação pode não ocorrer. Para tais controvérsias são discutidas algumas proposições. As observações de que, em plantas individuais, o decréscimo na condutância estomática ocorre linearmente com o aumento na concentração de ABA no xilema sugerem uma variação na sensibilidade estomática para o ABA do xilema entre plantas de uma mesma espécie (Schurr *et al.*, 1992). Outra possibilidade envolve as alterações que ocorrem na concentração de ABA no percurso até o apoplasto circundante às células-guarda, seja devido a mudanças na sua distribuição, na sua degradação e/ou conjugação (Wilkinson e Davies, 1997; Hansen e Dörffling, 1999). A seiva do xilema contém uma quantidade considerável de ABA conjugado, e esta aumenta com o estresse (Hansen e Dörffling, 1999). Se o ABA conjugado libera ABA no apoplasto das células-guarda, isto pode constituir um mecanismo adicional que pode potencialmente aumentar sua concentração nesse compartimento (Hartung *et al.*, 1998). Seria interessante verificar se o estresse imposto promove alteração no nível de ABA conjugado na seiva do xilema de plantas de tomate.

Uma forma pela qual o estresse hídrico pode mudar as concentrações de ABA no apoplasto é através de alterações no pH desse compartimento. O pH da seiva xilemática das plantas submetidas ao estresse rápido, avaliado logo após as análises das taxas transpiratórias, aumentou em 0,7 unidades na seiva das plantas submetidas ao estresse rápido, duas horas após a adição de 7% de PEG à solução nutritiva (Figura 1C). Isso pode explicar o fato de que, nessa ocasião, a concentração de ABA da seiva do xilema tinha aumentado quatro vezes nas plantas tratadas com PEG, em relação

ao controle, enquanto que nas raízes o aumento era de apenas 2 vezes (Figuras 3B e 3C).

Aumento no pH da seiva do xilema de 6,3 para 7,2 foi observado em *Phaseolus vulgaris*, por Hartung e Radin (1989), de 6,1 para 6,7 em *Commelina communis*, por Wilkinson e Davies (1997), de 5,5 para 7,5 em *Lycopersicon esculentum* por Wilkinson *et al.* (1998) e de 6,0 para 7,0 em cevada, por Bacon *et al.* (1998), em todos os casos as plantas foram submetidas à deficiência hídrica induzida pela suspensão da irrigação.

Tem sido proposto que o aumento no pH apoplástico, mediante alterações na distribuição de ABA, pode funcionar como um sinal químico para as folhas, indicando a redução na disponibilidade de água no solo, (Wilkinson e Davies, 1997; Wilkinson *et al.*, 1998). Essa proposição confirma as observações de que os estômatos podem fechar, em resposta ao déficit hídrico, antes do aumento na síntese de ABA na raiz ou parte aérea (Thompson *et al.*, 1997). Essa hipótese é baseada no fato de ser o ABA um ácido fraco e seu acúmulo ocorrer em compartimentos mais alcalinos. Em pH apoplástico mais alcalino, tanto a capacidade das células do mesófilo quanto da epiderme para seqüestrarem ABA são reduzidas (Wilkinson e Davies, 1997), permitindo que uma maior quantidade de ABA seja mantido no apoplasto. Os últimos autores observaram em células epidérmicas de *Commelina* que, em pH externo 6,0 (o qual representa o pH apoplástico de uma planta não estressada), a absorção difusiva de ABA e a mediada por carreadores ajudam a manter a baixa concentração de ABA apoplástica, em condições não estressantes. Quando o pH externo foi aumentado para 7,0 (o qual corresponde ao pH do apoplasto de uma planta estressada), tanto o processo difusivo de

absorção com o mediado por carreadores foram perdidos, provavelmente, por ser esse um pH fora da faixa de atividade para tais processos. Além disso, o pH mais alcalino da seiva parece aumentar a responsividade estomática para o ABA do xilema (Correia e Pereira., 1995) e tanto o seu transporte via floema com sua taxa metabólica foliar são reduzidos (Zhang *et al.*, 1997; Wilkinson *et al.*, 1998) em plantas submetidas à deficiência hídrica. A somatória de todos esses fatores permite que uma maior quantidade de ABA alcance e se mantenha no apoplasto das células-guarda. Contudo, em centeio (Daeter e Hartung, 1993), a absorção de ABA mediada por carreadores ocorre apenas em pH apoplástico correspondente ao de plantas estressadas (7,25). Segundo os autores, isso pode funcionar para evitar o excesso de ABA no apoplasto de plantas estressadas e evitar o fechamento estomático a longo prazo. É possível que em diferentes espécies, ou mesmo dentro de uma mesma espécie, a regulação da atividade dessas proteínas carreadoras de ABA mude de acordo com o estágio de desenvolvimento e/ou época do ano e/ou hora do dia.

A maior sensibilidade estomática para o ABA em pH apoplástico mais alcalino pode explicar o fato de que nas plantas submetidas ao estresse rápido a redução da taxa transpiratória tenha ocorrido mesmo quando a concentração de ABA foliar foi reduzida (Figura 3A). Embora a concentração total de ABA na folha tenha reduzido, a concentração de ABA apoplástica pode ter aumentado em função do maior acúmulo de ABA nesse compartimento, resultante do pH mais alcalino. Além disso, a interação entre ABA e outros hormônios, com citocinina e auxina, não pode ser descartada (Shashidhar *et al.*, 1996). O balanço entre AIA/ABA pode modular o grau de abertura estomática (Irving *et*

al., 1992). É possível que o balanço obtido quando as plantas foram submetidas ao estresse tenha favorecido o ABA, em relação aos outros hormônios, havendo, assim, uma redução na abertura estomática.

No experimento em que as plantas foram submetidas ao estresse lento, não foi observada alteração no pH da seiva xilemática, mesmo após ter ocorrido redução na taxa transpiratória e no Ψ_f (Figura 2C). Logo, o aumento na concentração de ABA na seiva do xilem dessas plantas deve ter sido o resultado do aumento na síntese de ABA nas raízes. Isso concorda com os resultados de Bacon *et al.* (1998) e Jokhan *et al.* (1999), que não observaram qualquer alteração no pH da seiva do xilem em plantas submetidas à deficiência hídrica induzida pela suspensão da irrigação, embora tenha sido observado um aumento na concentração de ABA deste compartimento e fechamento estomático. Por outro lado, Schurr e Schulze (1996) e Correia *et al.* (1999) observaram que, em *Ricinus communis* e *Lupinus*, respectivamente, a seiva do xilem tornou-se mais ácida com a seca. Contudo, observações de que o pH da seiva do xilem pode variar da base do caule até o ápice, tornando-se mais alcalino à medida que distancia da base, e a mobilização de ABA entre mesófilo e epiderme depende mais do gradiente de pH nestes tecidos do que da seiva (Schill *et al.*, 1996), sugerem que o pH apoplástico nas folhas pode ser substancialmente diferente do observado na seiva do xilem coletada no caule, e o pH determinado no xilem do caule (seiva) pode não refletir o pH do xilem das folhas. Além disso, a sensibilidade do pH da seiva xilemática às variações no teor de água no solo pode variar (Bacon *et al.*, 1998). Dessa forma, a rapidez com que o pH aumenta pode variar com a espécie (Wilkinson, 1999), ou, no caso do presente

experimento, com o tipo do estresse (lento e rápido), que influenciou sua intensidade e duração. Em alguns casos, o pH pode afetar a abertura estomática antes do acúmulo de ABA na seiva, em outros, pode ocorrer o contrário. Nesse sentido, o tipo de estresse também pode influenciar as respostas. No presente experimento o estresse foi imposto pela adição de PEG 6000 à solução de cultivo, enquanto que nos demais experimentos, para os resultados já citados, a imposição do estresse se deu pela suspensão da rega. Essa forma de indução do estresse parece simular mais uma condição natural. Nas plantas submetidas ao estresse rápido, o tempo de duração do estresse foi de apenas cinco horas e nas plantas submetidas ao estresse lento, de cinco dias. As plantas responderam diferentemente no ajuste aos dois estresses.

O aumento na concentração de ABA na raiz e xilema das plantas submetidas ao estresse rápido (Figura 3B e 3C) ocorreu bem antes do início da redução na taxa transpiratória (Figuras 1A). Schill *et al.* (1996) sugerem e Jokhan *et al.* (1999) verificaram que isso pode ser consequência da perda de ABA no percurso transpiratório, resultante da difusão lateral. Com nesses trabalhos os autores não observaram alteração nos níveis de solutos em geral no xilema da base do caule até o apoplasto foliar, o mecanismo de perda de ABA foi atribuído à sua permeabilidade na membrana, relacionada às mudanças no pH apoplástico. No presente trabalho, o pH foi analisado em seiva coletada acima da primeira folha definitiva (5 cm acima do colo) e a taxa transpiratória foi avaliada na quinta folha, onde o pH da seiva coletada do pecíolo foi mais alcalino (Capítulo 1). Possíveis alterações no pH da seiva do xilema foliar podem ter ocorrido antes de alterações no pH do xilema da base do caule e ter alterado a distribuição de ABA no percurso até a epiderme da

folha. Isto pode justificar o início da redução na taxa transpiratória ocorrido bem antes do aumento na concentração de ABA na raiz e xilema.

Nas plantas controle, a concentração de ABA nas folhas foi 14 vezes maior que nas raízes (Figura 3). Na seiva do xilema, a concentração variou de 2,39 (controle das plantas submetidas a estresse lento – Figura 4) a 29,86 pmol mL⁻¹ (controle das plantas submetidas a estresse rápido – Figura 3B). Uma variação entre plantas individuais, de 3,2–58,2 pmol mL⁻¹, foi observada no xilema de plantas não estressadas de girassol e aumentou 40 vezes quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico (Schurr *et al.*, 1992). Os estresses rápido e lento foram conduzidos em épocas diferentes. Logo, essa variação pode estar relacionada à época de coleta das seivas. O aumento observado com o estresse, de 24 e 59 vezes está dentro da faixa de aumento observado para outras espécies.

Há algumas evidências (Hartung e Radin, 1989) e sugestões (Schurr *et al.*, 1992) de que o aumento no pH apoplástico de plantas submetidas à deficiência hídrica seja atribuído à redução na atividade da H⁺-ATPase da membrana plasmática. Nesse sentido, Patonnier *et al.* (1999) observaram que vanadato, um inibidor da H⁺-ATPase da membrana plasmática, inibe a abertura estomática em *Fraxinus excelsior*. Ao contrário de vanadato, fusicocina, um ativador da H⁺-ATPase, promove redução no pH apoplástico (Fromard *et al.*, 1995) e estimula a abertura estomática em *Commelina communis* (Assmann e Schwartz, 1992; Eun e Lee, 1997). Para avaliar a participação dessa enzima na alteração do pH apoplasto associada ao movimento estomático em tomateiro, folhas destacadas tiveram seus pecíolos imersos em seiva artificial de Wilkinson

et al. (1998) contendo fusicocina. Duas concentrações de fusicocina foram testadas (5 e 10 μ M), sendo que apenas 10 μ M promoveu alteração na resposta estomática (dados não apresentados). A adição de 10 μ M de fusicocina à seiva artificial promoveu um aumento de até 30% na taxa transpiratória, em relação ao controle sem fusicocina, uma hora após a imersão do pecíolo das folhas na solução (Figura 5). Além disso, a fusicocina inibiu a redução na taxa transpiratória promovida por ABA (Figura 6). Esses resultados indicam que, assim como em *Vicia faba* (Fricker e Willmer, 1990) e *Fraxinus excelsior* (Patonnier *et al.*, 1999), a H⁺-ATPase é um dos componentes importantes nos processos que envolvem a abertura estomática em tomateiro. Fromard *et al.* (1995) encontraram que células associadas aos vasos do xilema, as quais contêm altas concentrações de H⁺-ATPase, são capazes de controlar o pH da seiva do xilema.

No entanto, é importante ressaltar que apesar da possibilidade da fusicocina estimular a abertura estomática, via alteração no pH apoplástico, ela parece exercer ação direta na despolimerização dos filamentos de actina das células-guarda (Eun e Lee, 2000). Os filamentos de actina parecem modular a extensão e velocidade do movimento estomático. A despolimerização dos filamentos intensifica as mudanças na abertura estomática, enquanto que a polimerização estabiliza a abertura (Eun e Lee, 1997). Considerando que tanto o ABA como a fusicocina, promotores do fechamento e abertura estomáticos, respectivamente, promovem uma despolimerização nos filamentos de actina nas células-guarda (Eun e Lee, 2000), ao que parece, esses filamentos apenas modulam a extensão e velocidade do movimento. Sendo assim, esperar-se-ia que a fusicocina apenas acelerasse o

movimento estomático, independente da direção, isto é, estimulasse o efeito promovido pelo ABA sobre a taxa transpiratória. No entanto, a fusicocina inibiu a redução na taxa transpiratória promovida pelo ABA (Figura 6).

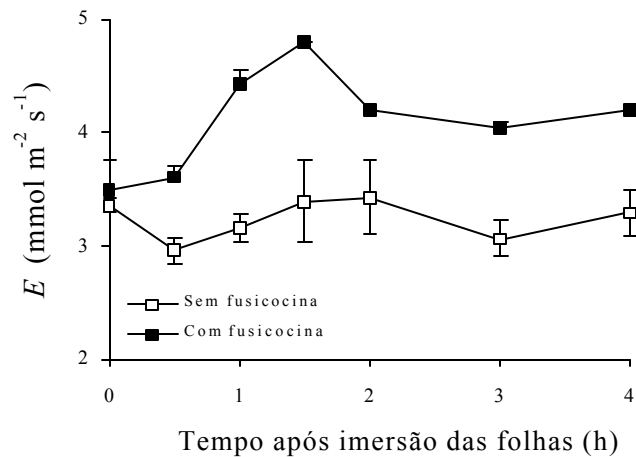


Figura 5. Efeito da fusicocina (10 μ M) sobre a taxa transpiratória (E) em folhas destacadas de tomateiro e imersas em seiva artificial de Wilkinson *et al.* (1998), pH 7,0.

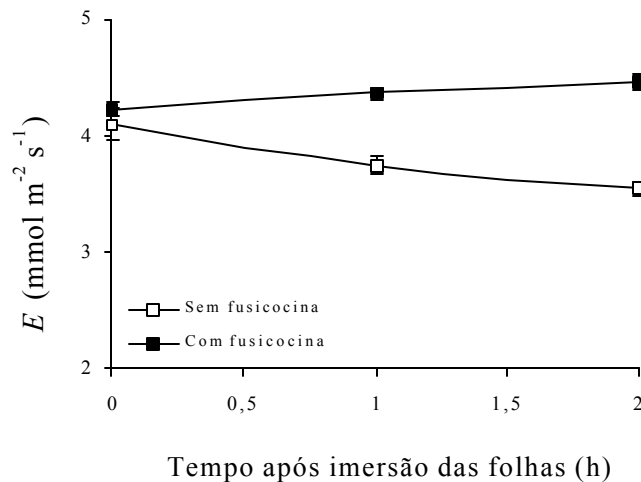


Figura 6. Efeito da fusicocina (10 μ M) sobre a redução na taxa transpiratória (E) promovida por ABA (2,5 μ M), em folhas destacadas de tomateiro e imersas em seiva artificial de Wilkinson *et al.* (1998), pH 7,0.

Um mecanismo proposto por Netting (2000) associa a inibição da atividade da H⁺-ATPase à abertura dos canais de cálcio mecânico-sensíveis da membrana plasmática, que são ativados devido à alteração na tensão da água apoplástica, quando as plantas são submetidas à deficiência hídrica. O aumento resultante na concentração de cálcio citossólico provocaria a fosforilação da H⁺-ATPase inativando-a. A atividade da H⁺-ATPase é realmente influenciada pelo seu estado de fosforilação e dependente de cálcio (Qiu e Su, 1998). Além disso, tem sido proposto que o íon Ca⁺² pode substituir o Mg⁺², do qual a enzima é dependente (Kinoshita *et al.*, 1995). O aumento no pH citossólico, devido à redução na atividade da enzima, após aumento nos níveis de cálcio desse compartimento já foi observado por alguns autores (Qiu e Su, 1998).

Para verificar a participação dos canais de cálcio no fechamento estomático induzido por ABA, folhas destacadas foram imersas em seiva artificial contendo dois inibidores de canais de cálcio, cloreto de lantânio e vermelho de rutênio. Os resultados mostram que a adição de ambos à seiva influenciou da mesma forma os efeitos do ABA sobre os estômatos. A presença de cloreto de lantânio inibiu os efeitos do ABA sobre a taxa transpiratória (Figura 7), enquanto que a inibição promovida pelo vermelho de rutênio foi parcial (Figura 8).

A primeira mudança detectada após exposição de células-guarda ao ABA é uma despolarização da membrana plasmática e ativação dos canais de cálcio (Hamilton *et al.*, 2000). O fechamento estomático promovido por ABA é precedido por um aumento na concentração de cálcio citossólico livre nas células-guarda (Mansh *et al.*, 1990; Cousson e Vavasseur, 1998). Esse aumento, resultante do influxo de cálcio extracelular

e liberação intracelular de cálcio, está diretamente relacionado com a concentração de cálcio externo, e ambos correlacionados com o grau de fechamento estomático (McAinsh *et al.*, 1995). Cloreto de lantânio é um inibidor dos canais de cálcio da membrana plasmática que são sensíveis ao ABA (Hamilton *et al.*, 2000). Sua presença inibe o aumento na concentração de cálcio livre citossólico, necessário para o fechamento estomático promovido por ABA.

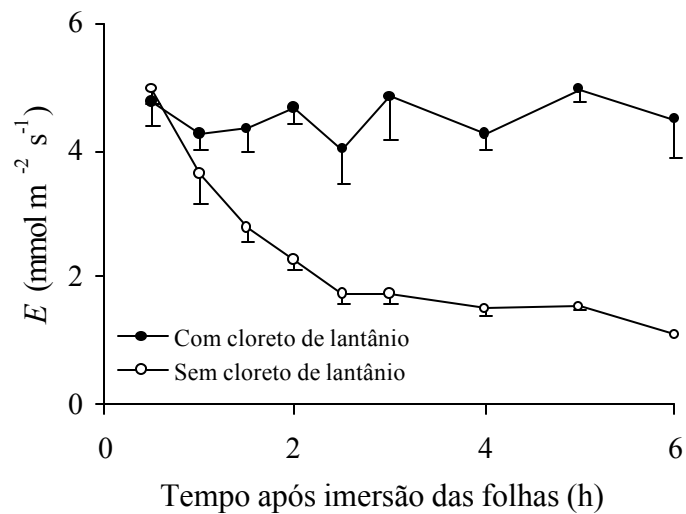


Figura 7. Efeito do cloreto de lantânio (10mM) sobre a taxa transpiratória (E) de folhas destacadas de tomateiro e imersas em seiva artificial de Wilkinson *et al.* (1998) contendo 3,0 mM de cálcio e 2,5 μ mol/L de ABA.

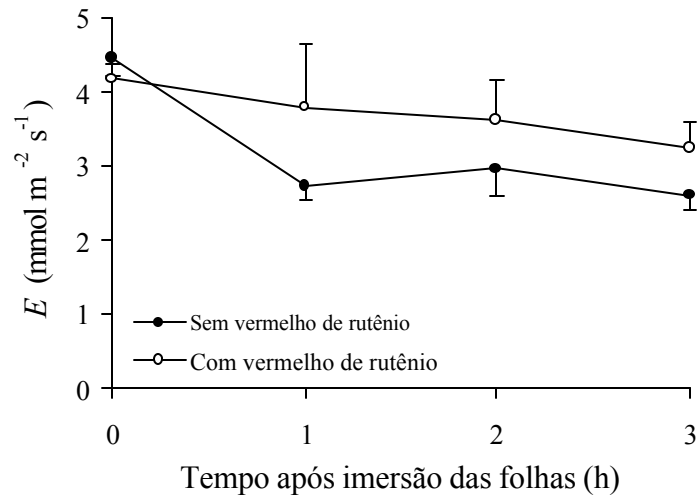


Figura 8. Efeito do vermelho de rutênio (100 μM) sobre a taxa transpiratória (E) de folhas destacadas de tomateiro e imersas em seiva artificial (Wilkinson *et al.*, 1998) contendo 3,0 mM de cálcio e 2,5 μmolar de ABA.

Isso pode justificar a manutenção da taxa transpiratória em folhas destacadas e imersas em solução contendo este composto, mesmo na presença de 2,5 μM de ABA e 3,0 mM de cálcio. Da mesma forma, vermelho de rutênio, um inibidor de canais de cálcio intracelulares (Knight *et al.*, 1997), pode ter inibido o aumento no cálcio livre citossólico, liberado das organelas, que ocorreria normalmente com a presença de ABA na solução, impedindo maiores reduções da taxa transpiratória (Figura 8). A menor inibição das reduções na taxa transpiratória promovida pelo vermelho de rutênio, em relação ao cloreto de lantânio, pode sugerir que, em tomateiro, o aumento na concentração de cálcio citossólico livre que precede o fechamento estomático promovido por ABA é resultante, principalmente, do influxo de cálcio extracelular. Vários estudos realizados para examinar a origem do cálcio necessário para o fechamento estomático em

protoplastos isolados de células-guarda são realizados com o uso de bloqueadores de canais de cálcio que inibem o influxo e/ou liberação de cálcio para o citossol (McAinsh *et al.*, 1995; Knight *et al.*, 1997).

Efeito do estresse hídrico sobre a concentração de nutrientes da seiva xilemática

A reduzida disponibilidade de água no solo é frequentemente acompanhada por uma limitação na disponibilidade de nutrientes. Sendo assim parece razoável considerar que plantas crescidas com um suprimento de nutrientes alterado diferissem também em suas respostas para a reduzida disponibilidade de água. A concentração de nutrientes nas seiva do xilema de plantas submetidas às duas formas de estresse é mostrada na Figura 9.

Como pode ser observado, tanto o estresse lento (Figuras 9A e 9B) como o rápido (Figuras 9C e 9D) promoveram um aumento na quantidade total de nutrientes na seiva. K^+ foi o cátion e NO_3^- o ânion encontrado em maior concentração na seiva. Nas plantas submetidas a estresse lento, exceto Ca^{+2} e SO_4^{-3} , a concentração dos demais íons na seiva aumentou com o desenvolvimento do estresse. Nessas plantas, a concentração de NH_4^+ , K^+ e NO_3^- aumentou de 1,3 para 3,12, de 11,7 para 15 e de 1,12 para 1,68 mM respectivamente.

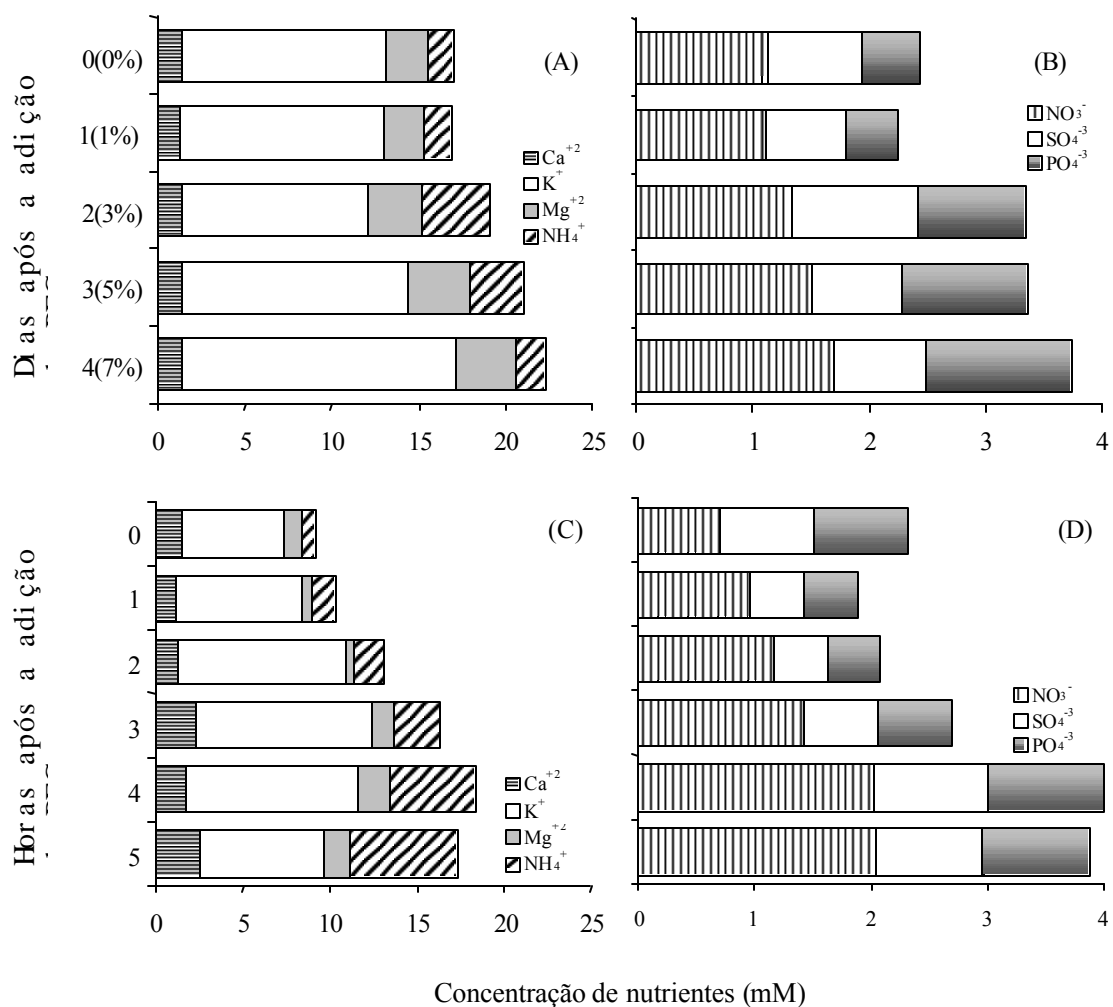


Figura 9. Concentração de cátions (A-C) e ânions (B-D) na seiva xilemática de plantas de tomate submetidas a estresse hídrico lento (dias após a adição de PEG) e rápido (horas após a adição de PEG), induzidos pela adição de 7% de PEG 6000 à solução de cultivo. Nos gráficos superiores os números entre parênteses indicam a % de PEG na solução.

Nas plantas submetidas ao estresse rápido, a concentração de todos os nutrientes analisados na seiva aumentou com o tempo de estresse (Figura 9C e 9D), e em maior magnitude que na seiva das plantas submetidas a estresse lento. Nos dois casos, os maiores aumentos foram observados nos teores de NH_4^+ , NO_3^- e K^+ ; de 0,7 para 6,1, de 0,7 para 2,0 e de 5,8 para 10 mM respectivamente. Ao contrário das plantas

submetidas ao estresse lento, cuja concentração de cálcio na seiva não foi alterada, na seiva das plantas submetidas ao estresse rápido a concentração desse íon aumentou de 1,5 para 2,5 mM

Alterações na composição de íons minerais da seiva do xilema de plantas submetidas a déficit hídrico foram observadas em várias espécies (Gollan *et al.*, 1992; Schurr e Schulze, 1995; 1996, Dannel *et al.*, 1995; Correia *et al.*, 1999). Em algumas delas tem sido observada uma correlação positiva entre a concentração de NO_3^- e pH da seiva. Mengel *et al.* (1994), trabalhando com plantas intactas, e Hoffmann e Kosegarten (1995), trabalhando com folhas destacadas de girassol, observaram que o aumento no suprimento de NO_3^- promoveu um aumento no pH do apoplasto foliar. Esses autores observaram que certos micro-sítios no apoplasto, principalmente ao redor dos estômatos, tornam-se mais alcalinos após a adição de NO_3^- do que o apoplasto da epiderme com um todo. O aumento no pH apoplástico induzido por aumento na concentração de NO_3^- pode ser o resultado de uma combinação de processos. O co-transporte de NO_3^-/H^+ para o simplasto diminui cargas positivas no apoplasto. Além disso, a redução de NO_3^- gera um excesso de OH^- , que pode ser excretado para o apoplasto (Davies, 1986). O aumento na concentração de NO_3^- na seiva correlaciona-se positivamente com a sensibilidade estomática e seu metabolismo pode influenciar a absorção de ABA pelas células do mesofilo via alteração no pH Radin *et al.* (1982) já haviam reportado que um alto suprimento de NO_3^- aumenta a concentração de ABA nas folhas. No presente experimento, a concentração de NO_3^- aumentou na seiva das plantas submetidas aos dois tipos de estresses (Figura 9A e 9B), mas o pH da seiva

xilemática aumentou apenas nas plantas submetidas a estresse rápido (Figura 1C).

Gollan *et al.* (1992) observaram na seiva do xilema de plantas de girassol um decréscimo nos teores de nitrato, fosfato e cálcio à medida que o déficit de água no solo progrediu. Nessa espécie, o aumento de 5,8 para 7,1 no pH da seiva, induzido pelo estresse, mostrou uma forte correlação negativa com a concentração de nitrato. Schurr *et al.* (1996) e Else *et al.* (1996) observaram que reduções na concentração de nitrato na seiva de plantas de girassol submetidas à deficiência hídrica e de tomate, submetidas à anoxia, estavam associadas a um aumento de pH da seiva. A explicação dada por Schurr *et al.* (1992) é que a redução na concentração de nitrato (ânion) pode ter aumentado a diferença de força iônica da seiva (Stewart, 1983), o que levaria a uma produção extra de espécies de cargas negativas, aumentando o pH. Para Gollan *et al.* (1992), o excesso de cátions sobre ânions na seiva do xilema da espécie em questão foi responsável pelo aumento no pH da seiva. Nos dois tipos de estresse aplicados no presente experimento o maior aumento ocorrido nas concentrações de NH_4^+ e K^+ resultou num maior aumento nos teores de cátions totais e, conseqüentemente, um aumento na relação cátions/ânions à medida que os estresses progrediram. O aumento na concentração de cátions, em relação à de ânions, na seiva das plantas tratadas com PEG, pode ter contribuído para a alcalinização da seiva do xilema das plantas submetidas ao estresse rápido. Além de possíveis alterações no pH da seiva, o que levaria a uma alteração na distribuição de ABA, a redução no suprimento de NO_3^- pode alterar o comportamento estomático por aumentar a sensibilidade dos estômatos para o ABA (Gollan *et al.*, 1992). No entanto, não se

sabe se as mudanças induzidas por NO_3^- no pH da seiva são a base das alterações na abertura estomática ou na sua sensibilidade para o ABA.

Ao contrário do observado por Gollan *et al.* (1992) na seiva do xilema de plantas de girassol submetidas à seca, o aumento nos níveis de Ca^{+2} na seiva do xilema das plantas submetidas ao estresse rápido no presente experimento concorda com os resultados observado por Ruiz *et al.* (1993) e Correia *et al.* (1999). No entanto, o aumento observado na concentração de Ca^{+2} por Correia *et al.* (1999), de 0,4 mM (plantas controle) para 1,4 mM (plantas estressadas), ocorreu apenas ao meio dia, quando houve o maior declínio na condutância estomática e a sensibilidade estomática para o ABA foi maior. Tem sido sugerido que enquanto NO_3^- tem efeitos indiretos sobre os estômatos, por influenciar o balanço de prótons (Raven e Smith, 1976), Ca^{+2} parece está envolvido diretamente no fechamento estomático (Schurr e Gollan, 1990). De fato, o suprimento de Ca^{+2} aumenta a sensibilidade estomática para ABA, tanto em epidermes isoladas (De Silva *et al.*, 1985) como em folhas (Ridolf *et al.*, 1994) e plantas intactas (Schurr *et al.*, 1992). A concentração apoplástica de Ca^{+2} torna-se importante ao considerar que o fechamento estomático promovido por ABA é precedido por um aumento na concentração de Ca^{+2} livre no citossol das células-guarda (McAins *et al.*, 1990) e este está diretamente relacionado com a concentração de Ca^{+2} externo (McAins *et al.*, 1995).

As trocas de pH da seiva resultantes de déficit hídrico têm sido atribuídas também às variações na redução do NO_3^- (Gollan *et al.*, 1992), por se tratar de um processo com grande impacto no balanço de pH em plantas (Raven e Smith, 1976) e o sítio de redução

variar entre espécies (Cairo *et al.*, 1991). De acordo com Haynes (1986), três extensos grupos de plantas podem ser identificados em relação ao sítio predominante de redução do NO_3^- : as que reduzem nas raízes; nas folhas; e as que o fazem em ambas as partes em proporções variáveis. Segundo Pilbeam e Kirkby (1990), em tomateiro, a redução do NO_3^- ocorre preferencialmente nas folhas, e segundo Dannel *et al.* (1995), plantas que reduzem nitrato nas folhas tendem a apresentar o pH da seiva do xilema mais alcalina. Se o estresse promove alteração no sítio de redução do NO_3^- , isso deve promover uma troca no pH da seiva do xilema.

Na Figura 10 é mostrada a atividade “in vivo” da redutase do nitrato nas folhas e raízes de plantas submetidas às duas formas de estresses. Os resultados mostram que na cultivar de tomateiro usada a maior parte do nitrato absorvido é reduzido na folha, confirmando os resultados de Pilbeam e Kirkby (1990). Quando as plantas foram submetidas ao tratamento com PEG 6000, houve uma pequena alteração na proporção do NO_3^- reduzido nas folhas e raízes. Nas plantas submetidas ao estresse lento a maior redução na atividade da enzima ocorreu nas folhas; aproximadamente 50%, enquanto que nas raízes a redução foi de aproximadamente 30% (Figura 10A). Nas plantas submetidas ao estresse rápido a redução na atividade da enzima foi maior nas raízes, 33%, em relação às folhas, 25% (Figura 10B). A redução na atividade da redutase do NO_3^- nas raízes pode ter contribuído para o aumento na concentração do NO_3^- na seiva do xilema das plantas submetidas aos estresses (Figura 9). No entanto, um aumento correspondente na atividade foliar da enzima nas plantas tratadas não foi observado.

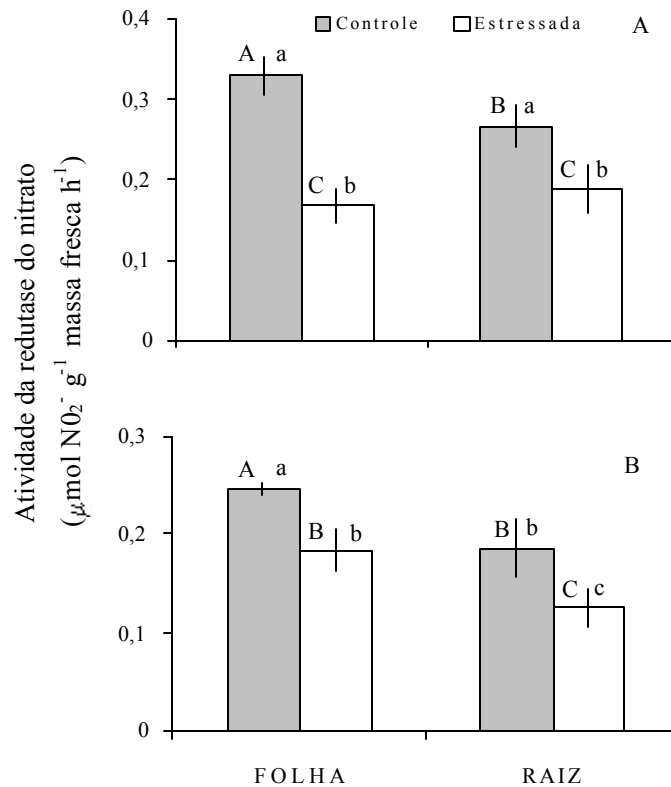


Figura 10. Atividade “in vivo” da redutase do nitrato em folhas e raízes de plantas de tomate submetidas a estresse hídrico lento (A) e rápido (B). Médias seguidas da mesma letra minúscula indicam não diferença estatística entre tratamentos a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas referem às partes das plantas.

Alterações nos níveis de nutrientes e, conseqüentemente, no pH da seiva, alterando a distribuição de ABA entre os vários compartimentos e/ou a sensibilidade estomática para este fitormônio, pode ser a maneira como os nutrientes modulam o comportamento estomático. Mesmo que muitas alterações na composição da seiva não sejam significativas e específicas o bastante para funcionar como um sinal entre a raiz e a parte aérea da reduzida disponibilidade de água, é possível que conseqüências moduladoras na comunicação raiz-parte aérea possam ocorrer (Gollan *et al.*, 1992).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSMANN, S. M.; SCHWARTZ, A. Synergistic effect of light and fusicoccin on stomatal opening. **Plant Physiology**, v.98, p.1340-1355, 1992.
- BACON, M.A.; WILKINSON, S.; DAVIES, W.J. pH-regulated leaf cell expansion in droughted plants is abscisic acid dependent. **Plant Physiology**, v.118, p.1507-1515, 1998.
- CAIRO, P.A.R.; OLIVEIRA, L.E.M.; DAVIDE, A.C.; ALVARENGA, A.A. Avaliação da capacidade de assimilação do nitrato de raiz, caule e lâmina foliar de algumas espécies florestais. **Consciência: Revista Cultural, Técnica e Científica**, v.1, n.2, p.273-281, 1991.
- CATALDO, D.A.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Soil Science and Plant Analysis Communication**, Monticello, v.6, p.71-80, 1975.
- CORREIA, M.J.; PEREIRA, J.S. The control of leaf conductance of white lupin by xylem ABA concentration decreases with the severity of water deficits. **Journal of Experimental Botany**, v.46, n.282, p.101-110, 1995.
- CORREIA, M.J.; RODRIGUES, M.L.; OSÓRIO, M.L.; CHAVES, M.M. Effects of growth temperature on response of lupin stomata to drought and abscisic acid. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.26, p.549-555, 1999.
- COUSSON, A.; VAVASSEUR, A. Two potential Ca^{+2} -dependent transduction pathways in stomatal closing in response to abscisic acid. **Plant Physiology Biochemistry**, v.36, n.3, p.257-262, 1998.
- DAETER, W.; HARTUNG, W. The permeability of the epidermal plasma membrane of barley leaves to abscisic acid. **Planta**, v.191, p.41-47, 1993.
- DANNEL, F.; PFEFFER, H.; MARSCHNER, H. Isolation of apoplasmic fluid from sunflower leaves and its use for studies on influence of nitrogen supply on apoplasmic pH. **Journal of Plant Physiology**, v.146, p.273-278, 1995.
- DAVIES, D.D. The fine control of cytosolic pH. **Physiologia Plantarum**, v.67, p.702-706, 1986.
- De SILVA, D.L.R.; HETHERINGTON, A.M.; MANSFIELD, T.A. Synergism between calcium ions and abscisic acid preventing stomatal aperture. **New Phytologist**, v.100, p.473-482, 1985.
- ELSE, M.A.; TIEKSTRA, A.E.; CROKER, S.J.; DAVIES, W.J.; JACKSON, M.B. Stomatal closure in flooded tomato

- plants involves abscisic acid and a chemically unidentified anti-transpirant in xylem sap. **Plant Physiology**, v.112, p.239-247, 1996.
- EUN, S. O; LEE, Y. Actin filaments of guard cells are reorganized in response to light and abscisic acid. **Plant Physiology**, v.115, p.1491-1498, 1997.
- EUN, S-O; LEE, Y. Stomatal opening by fusicoccin is accompanied by depolymerization of actin filaments in guard cells. **Planta**, v.210, p.1014-1017, 2000.
- FRICKER, M.D.; WLLMER, C.M Some properties of proton pumping ATPases at the plasma membrane and tonoplast of guard cells. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, v.186, p.301-308, 1990.
- FROMARD, L.; BABIN, V.; FLEURAT-LESSARD, P.; FROMONT, J.C.; SERRANO, R.; BONNEMAIN, J.L. Control of vascular sap pH by the vessels-associated cells in woody species. **Plant Physiology**, v.108, p.913-918, 1995.
- GOLLAN, T.; SCHURR, U.; SCHULTZE, E. D. Stomatal responses to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. I. The concentration of cations, anions, amino acids in and pH of the xylem sap. **Plant, Cell and Environment**, v.15, p.551-559, 1992.
- HAMILTON, D.W.A; HILLS, A; KOHLER, B.; BLATT, M Ca^{+2} channel at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. **Proceedings Natl. Academic Science**, v.27, n.9, p.4967-4972, 2000.
- HANSEN, H; DÖRFFLING, K Changes of free and conjugated abscisic acid and phaseic acid in xylem sap of drought-stressed sunflower plants. **Journal of Experimental Botany**, v.50, n.339, p.1599-1605, 1999.
- HARTUNG, W; RADIN, J.W Abscisic acid in the mesophyll apoplast and in the root xylem sap of water stressed plants. The significance of pH gradients. **Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology**, v.8, p.110-124, 1989.
- HARTUNG, W; WILKINSON, S.; DAVIES, W.J. Factors that regulate abscisic acid concentrations at the primary site of action at the guard cell. **Journal of Experimental of Botany**, v.49, p.361-367, 1998.
- HAYNES, R.J. Uptake and assimilation of mineral nitrogen by plants. In: HAYNES, R.J. **Mineral nitrogen in the plant-soil system** Orland, Academic Press, 1986. p.308-378.
- HECKENBERGER, U.; SCHURR, U.; SCHULZE, E. D. Stomatal response to abscisic acid fed into the xylem of intact *Helianthus annuus* (L.) plants. **Journal of Experimental Botany**, v.47, n.302, p.1405-1412, 1996.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, v.347, p.3-31, 1950.

- HOFFMANN, B.; KOSEGARTEN, H. FITC-dextran for measuring apoplast pH and apoplast pH gradients between various cell types in sunflower leaves. **Physiologia Plantarum**, v. 95, p. 327-335, 1995.
- IRVING, H. R.; GEHRING, C. A.; PARI SH, R. W. Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. **Proceedings National Academic Science**, v. 89, p. 1790-1794, 1992.
- JENSSEN, A. B.; BUSK, P. K.; FIGUERAS, M.; ALBÀ, M. M.; PERACCHIA, G.; MESSEGUER, R.; GODAY, A.; PAGÈS, M. Drought signal transduction in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 20, p. 105-111, 1996.
- JOKHAN, A. D.; HARI NK, R. J.; JACKSON, M. B. Concentration and delivery of abscisic acid in xylem sap are greater at the shoot than at a target leaf nearer to the shoot apex. **Plant Biology**, v. 1, p. 253-260, 1999.
- KINOSHITA, T.; NISHIMURA, M.; SHIMAZAKI, K. Cytosolic concentration of Ca^{+2} regulates the plasma membrane H-ATPase in guard cells of fava bean. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1333-1342, 1995.
- KNIGHT, H.; TREWAVAS, A. J.; KNIGHT, M. R. Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. **The Plant Journal**, v. 12, n. 5, p. 1067-1078, 1997.
- LINDEMAN, W. Observations on the behaviour of phosphate compounds in *Clorella* at transition from dark to light. In: **UNITED NATIONS INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE PEACEFUL USES OF ATOMIC ENERGY**, 2, 1958, Geneva. Proceedings... Geneva:[s.n.], 1958. Vol. 24, pt.1, p.8-15: Isotopes in Biochemistry and Physiology.
- MACCULOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta**, v. 17, p. 297-304, 1967.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; E OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas. Principios e aplicações**. Associação Brasileira para Pesquisa da Potássio e do Fósforo. Piracicaba, SP, 1989, 201p.
- MCAINSH, M. R.; BROWNLEE, C.; HETHERINGTON, A. M. Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca^{+2} precedes stomatal closure. **Nature**, v. 342, p. 186-188, 1990.
- MCAINSH, M. R.; WEBB, A. A. R.; TAYLOR, J. E.; HETHERINGTON, A. M. Stimulus-induced oscillations in guard cell cytosolic free calcium. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1207-1219, 1995.
- MENGEL, K.; PLANKER, R.; HOFFMANN, B. Relationship between leaf apoplast pH and iron chlorose of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Journal of Plant Nutrition**, v. 17, p. 1053-1065, 1994.
- NETTING, A. G. pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions: cellular responses to stress and their

- implication for plant water relations. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 147-158, 2000.
- PATONNIER, M.P.; PELTIER, J.P.; MARI GO, G. Drought-induced increase in xylem malate and mannitol concentrations and closure of *Fraxinus excelsior* L. stomata. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 336, p. 1223-1229, Jul. 1999.
- PERES, L. E. P.; MERCIER, H.; KERBAUY, G. B.; ZAFFARI, G. R. Níveis endógenos de AIA, citocininas e ABA em uma orquídea acaule e uma bromélia sem raiz, determinado por HPLC e ELISA. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 9, n. 3, p. 169-176, 1997.
- QU, Q.; SU, X. The influence of extracellular-side Ca^{+2} on the activity of the plasma membrane H-ATPase from wheat roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 25, p. 923-928, 1998.
- RADIN, J. W.; PARKER, L. L.; GUINN, G. Water relations of cotton plants under nitrogen deficiency. V. Environmental control of abscisic acid accumulation and stomatal sensitivity to abscisic acid. **Plant Physiology**, v. 70, p. 1066-1070, 1982.
- RAVEN, J. A.; SMITH, F. A. Nitrogen assimilation and transport in vascular plants in relation to intracellular pH regulation. **New Phytologist**, v. 76, p. 415-431, 1976.
- RIDOLF, M.; GARREC, J. P.; LOUGUET, P.; LAFRAY, D. Effects of potassium and calcium deficiencies on stomatal functioning in intact leaves of *Vicia faba*. **Canadian Journal of Botany**, v. 72, p. 1835-1842, 1994.
- RUIZ, L. P.; ATKINSON, C. J.; MANSFIELD, T. A. Calcium in the xylem and its influence on the behaviour of stomata. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v. 341, p. 67-74, 1993.
- SALAH, H. B. H.; TARDIEU, F. Control of leaf expansion rate of drought maize plants under fluctuating evaporative demand. **Plant Physiology**, v. 114, p. 893-900, 1997.
- SCHILL, V.; HARTUNG, W.; ORTHEN, B.; WEI SENSEEL, M. H. The xylem sap of maple (*Ace platanoides*) trees-sap obtained by a novel method shows changes with season and height. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, p. 123-133, 1996.
- SCHURR, U.; GOLLAN, T. Composition of xylem sap of plants experiencing root water stress - a descriptive study. **British Society for Plant Growth Regulation**, Monograph 21, p. 201-214, 1990.
- SCHURR, U.; GOLLAN, T.; SCHULTZE, E. D. Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. **Plant, Cell and Environment**, v. 15, p. 561-567, 1992.

- SCHURR, U.; SCHULTZE, E. D. The concentration of xylem sap constituents in root exudate, and in sap from intact, transpiring castor bean plants (*Ricinus communis* L.). **Plant, Cell and Environment**, v.18, p.409-420, 1995.
- SCHURR, U.; SCHULZE, E. D. Effects of drought on nutrient and ABA transport in *Ricinus communis*. **Plant, Cell and Environment**, v.19, p.665-674, 1996.
- SHASHIDHAR, V. R.; PRASAD, T. G.; SUDHARSHAN, L. Hormone signals from roots to shoots of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Moderate soil drying increase delivery of abscisic acid and depresses delivery of cytokinins in xylem sap. **Annals of Botany**, v.78, p.151-155, 1996.
- STEWART, P. A. Modern quantitative acid-base chemistry. **Canadian Journal Physiology Pharmacological**, v.61, p.1444-1461, 1983.
- THOMPSON, D. D.; WILKINSON, S.; BACON, M. A.; DAVIES, W. J. Multiple signals and mechanisms that regulate leaf growth and stomatal behavior during water deficit. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.303-313, 1997.
- VILLELA, F. A. ET AL... **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, n.11/12, p.1957-1968, 1991.
- WILKINSON, S. pH as a stress signal. **Plant Growth Regulation**, v.29:87-99, 1999.
- WILKINSON, S.; CORLETT, J. E.; OGER, L.; DAVIES, W. J. Effects of xylem pH on transpiration from wild-type and *flacca* tomato leaves. **Plant Physiology**, v.117, p.703-709, 1998.
- WILKINSON, S.; DAVIES, W. J. Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. **Plant Physiology**, v.113, p.559-573, 1997.
- WOLF, O.; JESCHKE, W. D.; HARTUNG, W. Long distance transport of abscisic acid in NaCl-treated intact plants of *Lupinus albus*. **Journal of Experimental Botany**, v.41, n.226, p.593-600, 1990.
- ZHANG, J.; DAVIES, W. J. Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. **Plant Cell and Environment**, v.12, p.73-81, 1989.
- ZHANG, J.; DAVIES, W. J. Changes in the concentration of ABA in the xylem sap as a function of changing soil water status will account for changes in the leaf conductance. **Plant Cell and Environment**, v.13, p.277-285, 1990.
- ZHANG, J.; JIA, W.; ZHANG, D. P. Effect of leaf water status and xylem pH on metabolism of xylem-transported abscisic acid. **Plant Growth Regulation**, v.21, p.51-58, 1997.

CAPÍTULO 3

SENSIBILIDADE ESTOMÁTICA AO ABA EM FUNÇÃO DOS NÍVEIS DE ALGUNS NUTRIENTES NO FLUXO TRANSPIRATÓRIO

ABSTRACT - To evaluate the stomata sensibility to abscisic acid (ABA) from xylem sap, plants of *Lycopersicon esculentum* Mill. var. Santa Clara were submitted to water stress induced by PEG 6000 added to the nutritive solution. The transpiratory rate and the contents of Ca^{+2} , NO_3^- , PO_4^{-3} and ABA were evaluated. On detached leaves was also evaluated the effect of the levels of calcium, nitrate and phosphate on the transpiratory rate and on the stomata sensibility to exogenous ABA. The treatment with PEG 6000 prompted an increase in the content of ABA, Ca^{+2} , NO_3^- , PO_4^{-3} in the sap and reduction in the transpiratory rate. The increase in the contents of the ions increased the stomata sensibility for the ABA contained in the xylem of the intact plants. In detached leaves, the concentration of necessary ABA to promote reduction in the transpiratory rate was $2,5 \mu\text{M}$. The presence of Ca^{+2} in the xylem sap stimulated the inhibitory effect of ABA on transpiration. The increase in the contents of NO_3^- and Ca^{+2} in the immersion solution intensified the stomata closing induced by ABA.

Additional index terms: xylem sap, artificial sap, root-to-shoot communication, nitrate, phosphate, calcium, pH

RESUMO - Para avaliar a sensibilidade estomática ao ABA contido no xilema, plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill. var. Santa Clara foram submetidas a estresse hídrico induzido por PEG 6000 adicionado à solução nutritiva. Avaliou-se a taxa transpiratória (E) e na seiva xilemática o pH e teores de cálcio, nitrato, fosfato e ácido abscísico (ABA). Utilizando-se folhas destacadas avaliou-se o efeito dos níveis de cálcio, nitrato e fosfato da solução de imersão sobre a taxa

transpiratória e sobre a sensibilidade estomática para ABA exógeno. O tratamento com PEG 6000 promoveu um aumento nos teores de ABA, cálcio, nitrato e fosfato na seiva e redução na taxa transpiratória. O aumento nos teores dos íons aumentou a sensibilidade estomática para o ABA contido no xilema nas plantas intactas. Em folhas destacadas, a concentração de ABA necessária para promover redução na taxa transpiratória foi 2,5 μM . A presença de cálcio no fluxo transpiratório estimulou o efeito inibitório sobre a taxa transpiratória, promovido por ABA. O aumento nos teores de nitrato e cálcio na solução de imersão intensificou o fechamento estomático induzido por ABA.

Termos adicionais para indexação: seiva do xilema, seiva artificial, comunicação raiz-parte aérea, nitrato, cálcio, fosfato, pH

INTRODUÇÃO

Em condições de laboratório, há frequentemente uma boa correlação entre resposta estomática e aumento na concentração de ácido abscísico (ABA) na seiva do xilema, em plantas submetidas a déficit hídrico (Tardieu e Davies, 1993; Thompson *et al.*, 1997; Wilkinson *et al.*, 1998). No entanto, a literatura descreve que essa correlação pode ser facilmente quebrada e que, principalmente em condições de campo, pode ocorrer uma grande variação na abertura estomática para um mesmo nível de ABA (Schurr *et al.*, 1992; Correia e Pereira, 1995).

Schurr *et al.* (1992) observaram que plantas de girassol submetidas à deficiência hídrica exibiram uma redução na taxa transpiratória durante a manhã, quando a concentração de ABA na seiva do xilema foi similar à concentração na seiva das plantas irrigadas. Em plantas de milho crescidas no campo, a redução na condutância estomática durante o dia ocorreu mesmo quando as concentrações de ABA na seiva do xilema decresceu (Tardieu e Davies, 1992). Mesmo em casos em que a concentração de ABA aumentou durante o dia, nenhuma alteração foi observada na condutância

estomática (Correia e Pereira, 1995). A resposta estomática para ABA no xilema parece depender da hora do dia, a condutância sendo mais baixa à tarde do que pela manhã, para uma mesma concentração de ABA (Correia *et al.*, 1995; 1997). Tardieu e Davies (1992; 1993) propuseram que as respostas estomáticas para ABA são diretamente afetadas pelo estado hídrico da folha, alterando a sensibilidade das células-guarda. Reduções muito pequenas no potencial hídrico foliar (< -0.06 MPa, Thompson *et al.*, 1997), valor abaixo do normalmente experimentado pela planta em seu ambiente de crescimento, são suficientes para potencializar a resposta para ABA. Entretanto, uma variação na sensibilidade da condutância estomática para uma dada concentração de ABA no xilema, em potenciais hídricos foliares inalterados, pode ocorrer.

A disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo influencia as respostas estomáticas para ABA (Thompson *et al.*, 1997). De estudos sobre mudanças na composição de nutrientes e ABA na seiva do xilema de plantas de girassol submetidas a déficit hídrico concluiu-se que o pH e as concentrações de nitrato, fosfato e ABA da seiva do xilema podem contribuir na comunicação raiz-parte aérea durante o déficit hídrico (Gollan *et al.*, 1992; Schurr *et al.*, 1992). Há alguma evidência na literatura de que a redução no suprimento de nitrato aumenta a sensibilidade estomática para o ABA (Radin *et al.*, 1982). Deficiência de fósforo promove aumento na concentração de ABA no xilema e redução na condutância estomática (Jeschke *et al.*, 1997).

Outros estudos mostram que a concentração de cálcio na seiva do xilema também pode ser alterada em plantas submetidas à deficiência hídrica (Schurr e Gollan, 1990; Ruiz *et al.*, 1993; Correia *et al.*,

1999). Em *Lupinus* a redução na condutância estomática, ao meio dia, foi associada ao aumento na concentração de cálcio na seiva xilemática no mesmo horário (Correia *et al.*, 1999). O cálcio pode estar envolvido na regulação estomática como mensageiro secundário. Em *Commelina communis* o fechamento estomático promovido por ABA é precedido por um aumento na concentração de cálcio citossólico livre nas células-guarda (Mansh *et al.*, 1990).

Se ocorre variabilidade na condutância estomática para um mesmo nível de ABA, pode-se dizer que o ABA contribui, em parte, para as variações no comportamento estomático e que variações em outros constituintes do fluxo transpiratório, para um mesmo nível de ABA, devem ser analisados para explicar a base dessa variabilidade. Esse estudo foi desenvolvido com os seguintes objetivos: 1) avaliar a sensibilidade estomática ao ABA presente na seiva do xilema, em função de alterações do pH e concentrações de cálcio, nitrato e fosfato da seiva do xilema em plantas submetidas a estresse hídrico; 2) avaliar o efeito dos níveis de nitrato, cálcio e fosfato do fluxo xilemático sobre a resposta estomática ao ABA exógeno, em folhas destacadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições de cultivo

O experimento foi conduzido no Departamento de Biologia – Unidade de Crescimento de Plantas – da Universidade Federal de Viçosa. Plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L. var. Santa Clara) foram cultivadas em casa-de-vegetação, em vasos contendo 2,5 L de solução nutritiva de Hoagland e Aron (1950), 1/2 força, pH 6,5. Cada vaso continha duas plantas. A solução era trocada a cada dois dias e o volume de água perdida repostado diariamente com água destilada. As plantas, com idade entre 40-45 dias, contados a partir da data de semeadura, foram transferidas para sala-de-crescimento com fotoperíodo de 14 horas (com início às 8:00 horas) e densidade de fluxo fotossintético (DFF), ao nível das plantas, de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura entre 20-23 °C e umidade relativa do ar entre 60-63%, onde todas as avaliações foram realizadas. Para filtrar a radiação calorífica das lâmpadas e evitar o aquecimento das folhas, foi colocada uma camada de água corrente entre a fonte de luz e as plantas.

Sensibilidade estomática para ABA contido no xilema de plantas inteiras

As avaliações de taxa transpiratória, concentrações de ABA e nutrientes, e pH da seiva do xilema de plantas submetidas a estresses hídrico lento e rápido estão descritas no Capítulo II. A sensibilidade estomática ao ABA contido na seiva do xilema foi calculada de acordo com Schurr *et al.* (1992), dividindo-se a taxa transpiratória (avaliada na 5^o folha) pela concentração de ABA encontrada na seiva do xilema do caule, a 5 cm acima do colo da mesma planta. As alterações na sensibilidade estomática ao ABA foram observadas em função das variações de pH e dos níveis de NO_3^- , Ca^{+2} e PO_4^{-3} na seiva do xilema, decorrentes do estresse.

Efeito do nitrato, fosfato e cálcio sobre a sensibilidade estomática ao ABA exógeno em folhas destacadas

Para avaliar o efeito da concentração de NO_3^- , PO_4^- e Ca^{+2} sobre a taxa transpiratória de folhas destacadas utilizou-se a seiva artificial de Wilkinson *et al.* (1998), em dois pHs (6,0 e 7,0). Os tratamentos compunham de seiva artificial completa, constituída de 1,0 mM de PO_4^{3-} , 1,0 mM de Ca^{+2} e 3,0 mM NO_3^- , seiva artificial com metade da concentração de fosfato (0,5 mM PO_4^{3-}) e nitrato (1,5

mM NO₃⁻) e seiva artificial com o triplo da concentração de cálcio (3,0 mM Ca⁺²).

Para analisar a resposta estomática para ABA exógeno em função dos níveis de PO₄³⁻, Ca⁺² e NO₃⁻ no fluxo xilemático, às mesmas soluções acima foi adicionado 2,5 µM de (±)-cis-trans-ABA sintético (Sigma).

Avaliação da taxa transpiratória

Em todos os tratamentos foi utilizada a quinta folha das plantas mantidas em sala-de-crescimento. Após destacadas, imersas em águas destilada e selecionadas para a mesma taxa transpiratória inicial, as folhas foram imediatamente imersas nas respectivas soluções, e a taxa transpiratória avaliada 0, 0,5, 1,5, 2,5, 3,5 e 4,5 horas após. As avaliações, realizadas na superfície abaxial das folhas, por ser mais responsiva ao ABA (Correia e Pereira, 1995; Correia *et al.*, 1999), foram iniciadas entre 8:00 e 9:00 horas e realizadas com um analisador de gases ao infravermelho portátil (modelo LCA-2, ADC, UK). A DFF durante as medições foi de 600 µmol m⁻² s⁻¹.

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Cada valor representa a média de quatro repetições, exceto para as análises de ABA em que foram utilizadas amostras compostas, resultantes de quatro amostras simples. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, a nível de 5% de probabilidade, sendo a DMS calculada pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sensibilidade estomática ao ABA contido na seiva xilemática de plantas estressadas

Na Figura 1 é mostrada a relação entre a taxa transpiratória e a concentração de ABA na seiva do xilema de plantas submetidas a estresse lento e rápido. Como era esperado, à medida que a concentração de ABA na seiva do xilema aumentou, houve uma redução na taxa transpiratória. Nas plantas submetidas a estresse rápido, essa redução foi abrupta quando os níveis de ABA na seiva estava em torno de 200 pmol mL⁻¹ (Figura 1B), o que corresponde a 4 horas após adição de PEG 6000 à solução de cultivo (Figura 2B - Capítulo 2).

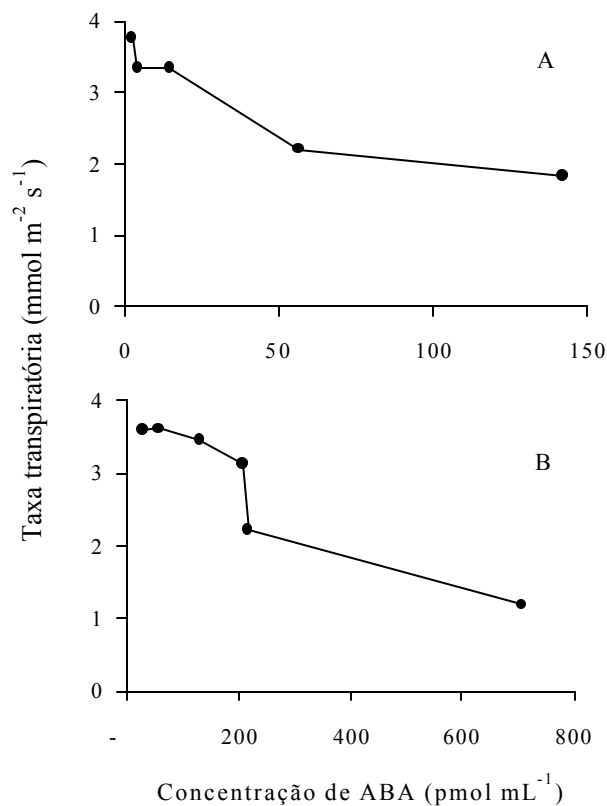


Figura 1. Relação entre a taxa transpiratória e a concentração de ABA da seiva do xilema de plantas de tomate, com 41 dias de idade, submetidas a estresse hídrico lento (A) e rápido (B).

Nas plantas submetidas a estresse lento, a redução na taxa transpiratória ocorreu gradativamente com o aumento na concentração de ABA na seiva do xilema (Figura 1A). Reduções na taxa transpiratória com o aumento na concentração de ABA no fluxo xilemático foram observadas em várias espécies (Gollan *et al.*, 1992; Wilkinson e Davies, 1997; Wilkinson *et al.*, 1998).

Na Figura 2 é mostrada a relação entre a sensibilidade estomática para o ABA contido no xilema de plantas submetidas a estresse rápido e lento e os teores de NO_3^- , PO_4^{3-} e Ca^{+2} encontrados na seiva das mesmas plantas. A sensibilidade estomática ao ABA foi calculada pela razão entre a taxa transpiratória (E) avaliada na 5ª folha e o teor de ABA determinado na seiva coletada na base do caule (5 cm acima do colo) da mesma planta. Uma queda na razão E/ABA indica aumento na sensibilidade estomática ao ABA. Como pode ser observado, o aumento nos teores de NO_3^- e PO_4^{3-} na seiva do xilema promoveu um aumento na sensibilidade da taxa transpiratória para o ABA contido no xilema (Figura 2). Nas plantas submetidas a estresse rápido, o aumento na sensibilidade estomática foi gradativo à medida que as concentrações de NO_3^- e PO_4^{3-} aumentaram na seiva.

Nas plantas submetidas a estresse lento, a queda na razão E/ABA foi mais rápida, indicando que nessa condição, pequenos aumentos na concentração destes íons na seiva do xilema, principalmente de NO_3^- , podem alterar a resposta estomática ao ABA presente na seiva. Em baixas concentrações de Ca^{+2} na seiva, a sensibilidade estomática foi reduzida, mas quando a concentração deste íon aumentou na seiva do xilema das plantas submetidas a estresse rápido, a sensibilidade ao ABA foi aumentada. Na seiva das plantas submetidas

a estresse lento, a concentração de cálcio não foi alterada. A queda na razão E/ABA , nesse caso, indica um aumento na sensibilidade estomática, não relacionada à concentração de Ca^{+2} na seiva, à medida que o estresse progrediu.

Ao contrário dos nutrientes, o aumento no pH da seiva do xilema, observado nas plantas submetidas a estresse rápido, não apresentou qualquer relação com a sensibilidade estomática ao ABA presente na seiva (Figura 3), embora em pH menos ácido da seiva artificial, a taxa transpiratória de folhas destacadas foi reduzida (Figura 2, Capítulo 4; Wilkinson e Davies, 1997; Wilkinson *et al.*, 1998). Por outro lado, resultados de Schurr *et al.* (1992) mostraram uma redução na sensibilidade estomática ao ABA do xilema à medida que o pH da seiva tornou-se mais alcalino.

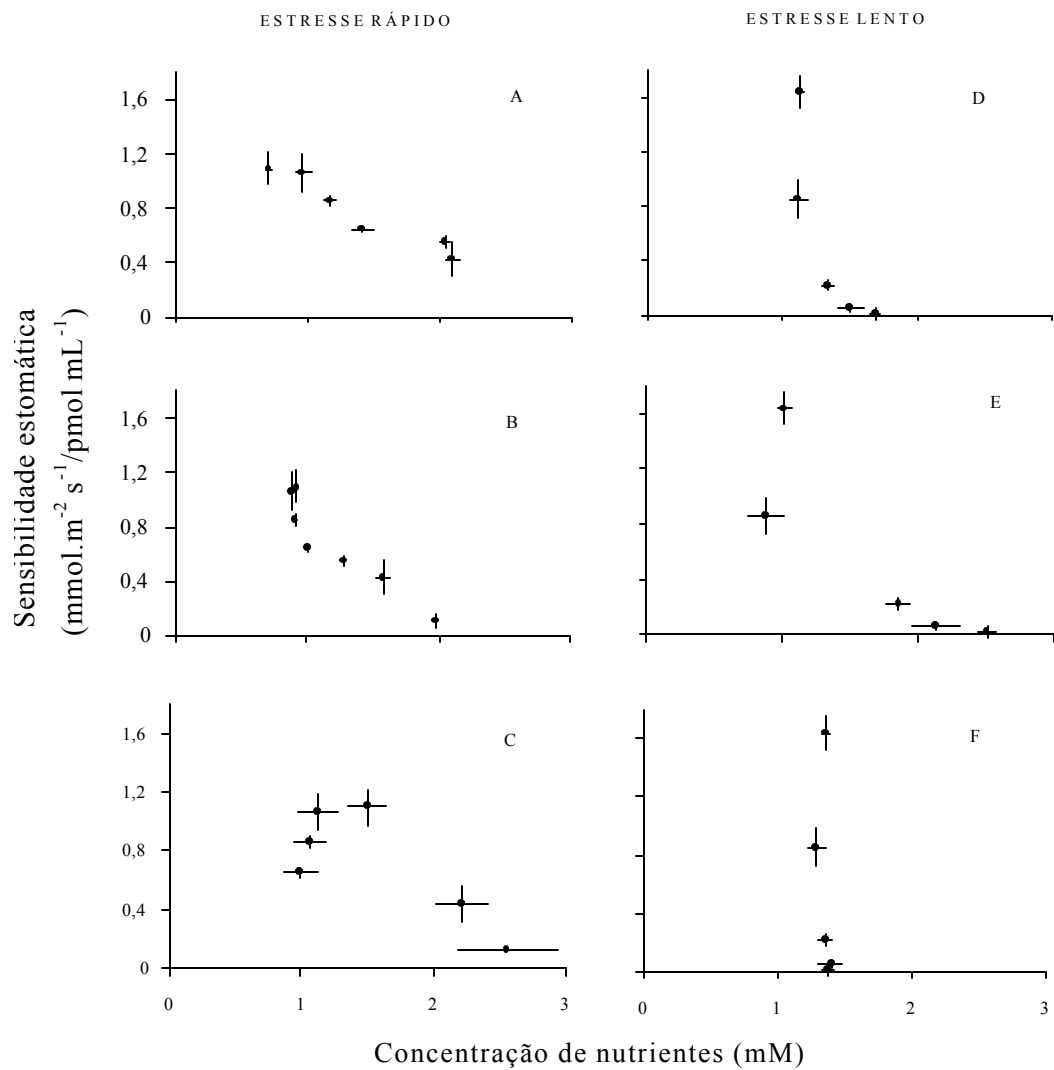


Figura 2. Relação entre a sensibilidade da taxa transpiratória para o ABA da seiva do xilema de plantas submetidas a estresse rápido e lento, em relação às concentrações de NO₃⁻ (A,D), PO₄⁻³ (B,E) e Ca⁺² (C,F) da seiva do xilema. As concentrações observadas no eixo das abscissas representam os teores dos nutrientes nos vários níveis de estresses. As barras horizontais representam o desvio padrão da concentração de nutrientes e as verticais, o desvio padrão da sensibilidade estomática.

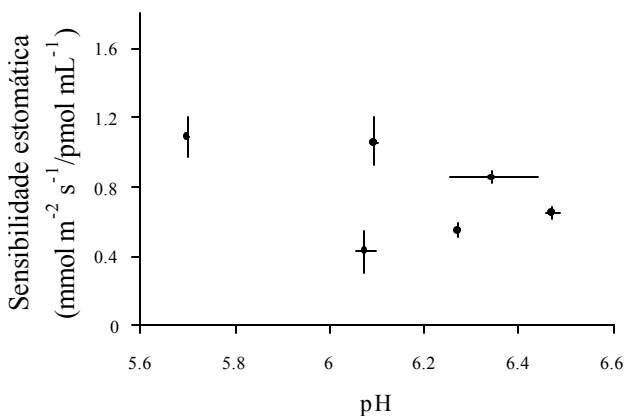


Figura 3. Relação entre a sensibilidade da taxa transpiratória ao ABA da seiva do xilema de plantas de tomate submetidas a estresse rápido, em relação ao pH da seiva do xilema. As barras horizontais representam o desvio padrão do pH e as verticais o desvio padrão da sensibilidade estomática.

Os efeitos das alterações de pH e composição de nutrientes na seiva do xilema de plantas submetidas à deficiência hídrica sobre os estômatos são contraditórios. Schurr *et al.*, (1992) observaram um aumento na sensibilidade estomática ao ABA da seiva do xilema à medida que aumentaram as concentrações de cálcio e nitrato na seiva de plantas estressadas. Schurr *et al.* (1992) observaram que a concentração de nitrato e cálcio na seiva do xilema de plantas de girassol submetidas à deficiência correlacionou positivamente com a sensibilidade para o ABA contido no xilema. Correia *et al.* (1999) atribuíram o declínio na condutância estomática, ao meio dia, ao aumento observado na concentração de Ca^{+2} da seiva xilemática, quando houve uma maior sensibilidade estomática para o ABA. Por outro lado, Radin *et al.*, (1982) apresentam evidências de que a redução no suprimento de nitrato aumenta a sensibilidade estomática para o ABA, embora não se saiba se esse efeito é mediado pelo pH.

Para Gollan *et al.*, (1992) e Schurr *et al.*, (1992) a redução na absorção de nitrato pelas raízes em plantas sob déficit hídrico pode contribuir para o aumento observado no pH apoplástico, nessas condições. A maior quantidade de ABA acumulada no apoplasto em pH mais alcalino (Wilkinson *et al.*, 1998) poderia justificar a maior sensibilidade da taxa

transpiratória ao ABA em baixas concentrações de nitrato na seiva do xilema. Plantas deficientes em nitrato e fosfato (Radin *et al.*, 1982) e crescidas em soluções com baixos níveis de nutrientes (Thompson *et al.*, 1997) apresentaram maior sensibilidade estomática para ABA exógeno. Deficiência de fósforo promoveu aumento na concentração de ABA no xilema (Jeschke *et al.*, 1997), redução na condutância estomática, maior síntese de ABA na raiz, além do seu maior fluxo para a parte aérea (Jeschke *et al.*, 1997).

Resposta estomática para ABA exógeno

Na Figura 4 é mostrado o efeito da concentração de ABA exógeno, adicionado à seiva artificial de Wilkinson *et al.* (1998), pH 6,0, sobre a taxa transpiratória de folhas destacadas. A presença de ABA promoveu redução na taxa transpiratória, duas horas após a imersão das folhas, apenas quando sua concentração na solução foi de 2,5 μM . Concentrações de 0,01 e 0,1 μM não alteraram a taxa transpiratória, mesmo após três horas de imersão.

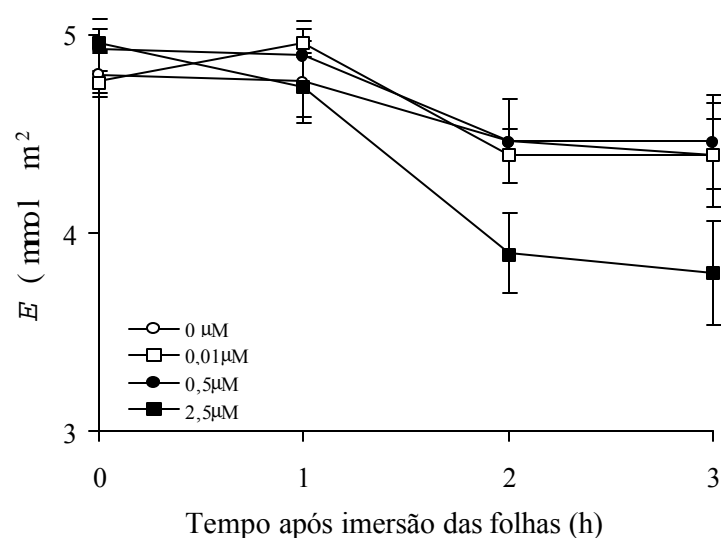


Figura 4. Taxa transpiratória (E) de folhas destacadas de plantas de tomate não estressadas e imersas em seiva artificial pH 6,0, contendo diferentes doses de ABA.

Heckenberger *et al.* (1996) e Correia *et al.* (1999) utilizaram 2,5 e 2,0 μM de ABA para que fossem observadas reduções na taxa transpiratória de folhas destacadas de *Lupinus* e *Helianthus annuus*, respectivamente. Apesar disso, essas concentrações estão muito acima da concentração necessária para promover a redução na taxa transpiratória em plantas inteiras das referidas espécies.

A concentração de ABA determinada na seiva do xilema de plantas não estressadas de tomate está na faixa de nanomolar, e alcançou um valor máximo de 0,7 μM na seiva das plantas submetidas a estresse rápido, cinco horas após a adição de PEG 6000 à solução de cultivo (Figura 3B, Capítulo 2). Nestas plantas, a taxa transpiratória foi reduzida quando a concentração de ABA na seiva era de 0,12 μM . Em plantas intactas de girassol, concentrações na faixa de 0,1-1,0 μM promoveram reduções na condutância estomática (Schurr *et al.*, 1992), os efeitos das concentrações variando entre plantas individuais. Essa mesma concentração reduz a condutância estomática também em plantas intactas de *Lupinus albus* (Correia *et al.*, 1999).

Correia e Pereira (1995) trataram folhas destacadas de plantas não estressadas com a mesma concentração de ABA observada na seiva do xilema de plantas da mesma espécie e observaram que a redução na condutância foi muito maior nas plantas intactas.

Essas observações indicam que a sensibilidade estomática para ABA é maior em plantas intactas, quando comparada a folhas destacadas (Correia *et al.*, 1999) e que plantas intactas devem necessitar de um menor nível de ABA para promover o fechamento estomático. No entanto, considerando que a concentração de ABA conjugado na seiva do xilema pode aumentar com o estresse hídrico (Hansen e Dörffling, 1999) e que a metodologia empregada para a determinação do ABA no presente experimento analisa apenas o ABA livre, é possível que os valores reais desse fitormônio na seiva do xilema em plantas intactas sejam bem maiores que os analisados, e muito mais ABA seja liberado no apoplasto das células-guarda. Se este for o caso, as grandes diferenças entre as concentrações de ABA observadas nas seivas de plantas intactas e as necessárias para promover o fechamento estomático nos experimentos em que são utilizadas folhas destacadas não devem ser tão grandes como normalmente observadas. Segundo Correia *et al.* (1999), em determinadas horas do dia, uma dada concentração de ABA no fluxo transpiratório pode ter o mesmo efeito inibitório sobre os estômatos de plantas intactas e de folhas destacadas. Eles consideram que o aumento na resposta estomática em plantas intactas durante o dia está associado a um aumento na sensibilidade estomática para o ABA carregado no xilema, situação que não pode ser reproduzida quando ABA exógeno é fornecido a folhas destacadas. Portanto, a concentração de ABA encontrada na seiva de plantas intactas e usada para comparar respostas estomáticas com folhas destacadas depende de que fatores estão afetando a sensibilidade estomática para o ABA, no momento em que a seiva analisada para dados comparativos é coletada. Além disso, a concentração de ABA foi determinada em amostras do xilema coletadas na

base do caule, mas os estômatos respondem para o ABA que chega ao seu sítio de ação nas células-guarda. Aumento na aparente responsividade estomática ao ABA conduzido no xilema em plantas intactas pode ser esperado se na rota através do caule e do apoplasto foliar a seiva é enriquecida com ABA. Considerando que o apoplasto torna-se mais alcalino à medida que se distancia da base para o ápice (Schill *et al.*, 1996), a liberação de ABA para o apoplasto e sua reduzida absorção para o simplasto são esperadas e pode aumentar a quantidade de ABA que alcança os estômatos.

Para Heckenberger *et al.* (1996) as respostas contraditórias nos estudos com plantas intactas e folhas destacadas são baseadas no fato de que não a concentração, mas o fluxo de ABA é que regula as respostas estomáticas. Os autores observaram uma redução de 35% na condutância estomática de girassol quando 2,5 μM de ABA foi introduzido para as folhas, via nervura, condição essa que não alterava o fluxo. Essa redução, equivalente à observada por Schurr *et al.* (1992) na mesma espécie submetida à deficiência hídrica, com a mesma concentração de ABA na seiva, foi atribuída à manutenção do fluxo, na metodologia usada para o fornecimento de ABA.

Por outro lado, concentrações entre 0,1-1,0 μM e 0,5-1,0 μM reduziram a condutância estomática em folhas destacadas de *Lupinus albus* (Correia *et al.*, 1999) e *Prunus persica* (Correia *et al.*, 1997), respectivamente. No primeiro caso, o pH da solução de imersão foi 6,5, portanto, 0,5 unidades maior que o do presente experimento, e a concentração de cálcio igual à da seiva artificial de Wilkinson *et al.* (1998). Aumento na concentração de cálcio e pH do fluxo xilemático aumentam a sensibilidade estomática para

ABA em *Lycopersicon esculentum* e *Lupinus albus* (Wilkinson e Davies, 1997; Correia *et al.*, 1999).

Efeito do nitrato, fosfato e cálcio sobre a taxa transpiratória de folhas destacadas

Na Figura 5 é mostrada a taxa transpiratória de folhas destacadas e imersas em seiva artificial (Wilkinson *et al.*, 1998), pH 6,0 e 7,0, contendo 2,5 μ M de ABA e diferentes concentrações de NO₃⁻, PO₄⁻³ e Ca⁺². Independente da concentração de nutrientes na seiva xilemática, as maiores reduções na taxa transpiratória ocorreram em folhas imersas em solução contendo ABA. Os efeitos dos íons NO₃⁻ e PO₄⁻³ sobre a taxa transpiratória foram independentes do pH. Alterações nos teores de fosfato (0,5 e 1,0 mM) não influenciaram a resposta estomática para ABA em folhas destacadas (Figuras 5B e 5E). As reduções nas taxas transpiratórias promovida pelo ABA foram maiores em folhas imersas em seiva contendo 3,0 mM de NO₃⁻, quando comparada à seiva contendo 1,0 mM (Figura 5A e 5D). Nesse caso, a magnitude de redução foi independente do pH. Embora em pH 7,0 e 3,0 mM de NO₃⁻, a redução da taxa transpiratória tenha ocorrido mesmo na ausência de ABA, cinco horas após a imersão.

Da mesma forma que para o NO₃⁻, o aumento na concentração de Ca⁺² na seiva artificial pH 7,0 causou maiores reduções na taxa transpiratória promovidas pelo ABA (Figura 5F). Nesse pH, independente da presença de ABA, o aumento na concentração de Ca⁺² promoveu uma redução na taxa transpiratória 3,5 horas após a imersão das folhas. Em pH 6,0, uma redução na taxa transpiratória de folhas imersas em seiva contendo ABA ocorreu independente da concentração de Ca⁺² na seiva (Figura 5C).

Aumentos e reduções nas concentrações de NO_3^- , PO_4^{3-} e Ca^{+2} na seiva xilemática podem atuar na modulação do pH apoplástico e na sensibilidade estomática ao ABA.

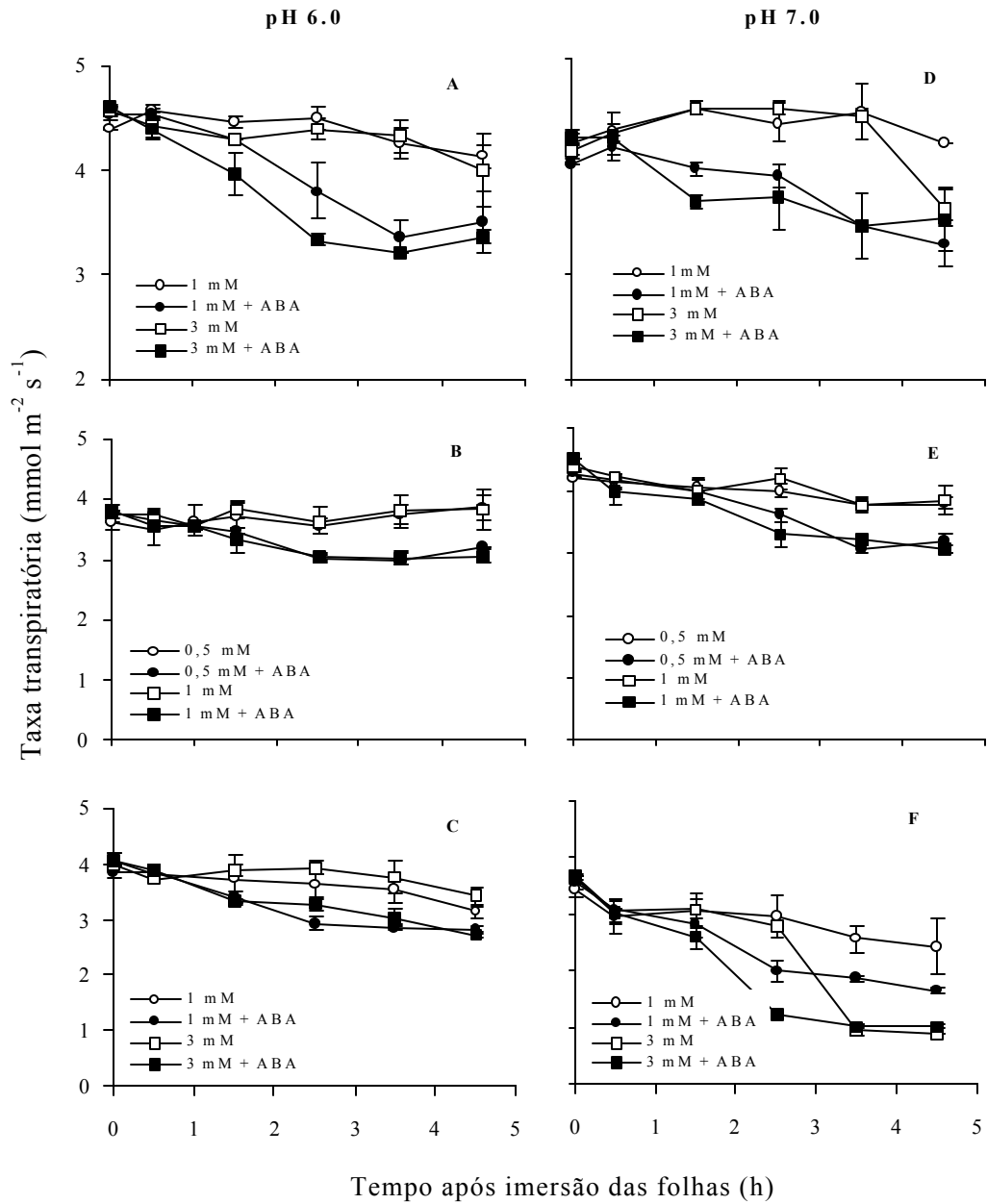


Figura 5. Efeito dos níveis de NO_3^- (A,D), PO_4^{3-} (B,E) e Ca^{+2} (C,F) do fluxo transpiratório sobre a redução da taxa transpiratória promovida por ABA (2,5 μM), em folhas destacadas de tomateiro e imersas em seiva artificial pH 6,0 e 7,0.

Observações de que aumento no suprimento de NO_3^- para plantas intactas e com folhas destacadas promovem um aumento no pH do apoplasto foliar (Mengel *et al.*, 1994; Hoffmann e Kosegarten, 1995) podem explicar as maiores reduções na taxa transpiratória em folhas imersas em solução contendo 3,0 mM de NO_3^- , em relação às imersas em solução com 1,0 mM, independente do pH da solução.

O cálcio é um mensageiro secundário envolvido na regulação estomática, sendo que o fechamento estomático promovido por ABA é precedido por um aumento de sua concentração nas células-guarda (Mäi nsh *et al.*, 1990). O aumento citossólico nos seus níveis está diretamente relacionado com a sua concentração externa, e ambos correlacionados com o grau de fechamento estomático (Mäi nsh *et al.*, 1995). A inibição na atividade da H^+ -ATPase promovida pelo aumento no cálcio intracelular (Qiu e Su, 1998) promove um aumento no pH apoplástico (Fromard *et al.*, 1995; Patonnier *et al.*, 1999). (Mäi nsh *et al.*, 1990) já havia observado, em plantas sob déficit hídrico, um aumento no pH apoplástico associado a um aumento na concentração de cálcio citossólico. Além de inibir a atividade da H^+ -ATPase, o aumento no cálcio livre citossólico inativa os canais de influxo de potássio e ativa canais de efluxo de cloro da membrana plasmática, provocando o fechamento estomático (Blatt e Grabov, 1997). Sendo assim, o aumento na sensibilidade estomática observada em plantas intactas (Schurr *et al.*, 1992) e em folhas destacadas (Figura 5, Ridolfi *et al.*, 1994) com aumento nos níveis de cálcio do fluxo transpiratório pode ser devido ao aumento no pH apoplástico. Com o pH mais alcalino representa o pH de seiva de plantas estressadas, essa pode ser a forma com o aumento no nível de cálcio na seiva xilemática de plantas submetidas ao estresse hídrico modula o comportamento estomático.

De Silva *et al.* (1985) observaram em epidermes isoladas que, na ausência de cálcio na solução, os estômatos foram menos sensíveis ao ABA. Quando folhas destacadas de tomate foram tratadas com seiva artificial contendo 2,5 μM de ABA, as maiores reduções na taxa transpiratória ocorreram na presença de cálcio na seiva (Figura 6), quando comparada à seiva sem cálcio. O mesmo tratamento com potássio não causou qualquer alteração no fechamento estomático (dados não apresentados), contrariando as observações de Thompson *et al.* (1997) de que potássio pode anular o efeito inibitório promovido por ABA. ABA e cálcio parecem agir sinergisticamente sobre o fechamento estomático, observação esta proposta também por Wilmer e Fricker (1996).

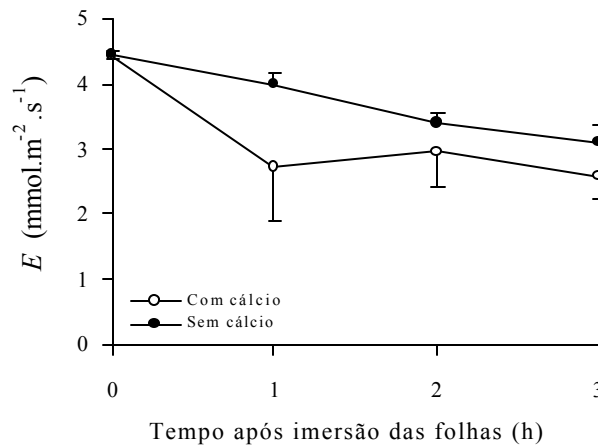


Figura 6. Efeito da presença (1,0 mM) e ausência de cálcio na seiva artificial sobre a inibição da taxa transpiratória (E), promovida por ABA (2,5 μM).

Apesar dos estudos de Gollan *et al.* (1992) e Schurr *et al.* (1992) mostrando que, juntamente com nitrato, pH e ABA da seiva do xilema, o fosfato pode contribuir na comunicação raiz-parte aérea em plantas

durante o déficit hídrico, sua concentração na seiva artificial não influenciou as respostas ao ABA em folhas destacadas de tomateiro, no presente experimento.

Uma vez que algumas deficiências associadas ao déficit hídrico, principalmente de nitrato, alteram o pH da seiva xilemática, esta pode ser uma maneira na qual os nutrientes podem influenciar o comportamento estomático em resposta ao ABA (Gollan *et al.*, 1992).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLATT, M.R.; GRABOV, A. Signalling gates in abscisic acid-mediated control of guard cell ion channels. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.481-490, 1997.
- CORREIA, M.J.; PEREIRA, J.S. The control of leaf conductance of white lupin by xylem ABA concentration decreases with the severity of water deficits. **Journal of Experimental Botany**, v.46, n.282, p.101-110, 1995.
- CORREIA, M.J.; PEREIRA, J.S.; CHAVES, M.M.; RODRIGUES, M.L.; PACHECO, C.A. ABA xylem concentration determine maximum daily leaf conductance of field-grown *Vitis vinifera* L. plants. **Plant, Cell and Environment**, v.18, p.511-521, 1995.
- CORREIA, M.J.; RODRIGUES, M.L.; FERREIRA, M.I.; PEREIRA, J.S. Diurnal change in the relationship between stomatal conductance and abscisic acid in the xylem sap of field-grown peach trees. **Journal of Experimental Botany**, v.48, n.314, p.1727-1736, 1997.
- CORREIA, M.J.; RODRIGUES, M.L.; OSÓRIO, M.L.; CHAVES, M.M. Effects of growth temperature on response of lupin stomata to drought and abscisic acid. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.26, p.549-555, 1999.
- De SILVA, D.L.R.; HETHERINGTON, A.M.; MANSFIELD, T.A. Synergism between calcium ions and abscisic acid

- preventing stomatal aperture. **New Phytologist**, v. 100, p. 473-482, 1985.
- FROMARD, L.; BABIN, V.; FLEURAT-LESSARD, P.; FROMONT, J. C.; SERRANO, R.; BONNEMAIN, J. L. Control of vascular sap pH by the vessel-associated cells in woody species. **Plant Physiology**, v. 108, p. 913-918, 1995.
- GOLLAN, T.; SCHURR, U.; SCHULTZE, E. D. Stomatal responses to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. I. The concentration of cations, anions, amino acids in and pH of the xylem sap. **Plant, Cell and Environment**, v. 15, p. 551-559, 1992.
- HECKENBERGER, U.; SCHURR, U.; SCHULZE, E. D. Stomatal response to abscisic acid fed into the xylem of intact *Helianthus annuus* (L.) plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 302, p. 1405-1412, 1996.
- HANSEN, H.; DÖRFFLING, K. Changes of free and conjugated abscisic acid and phaseic acid in xylem sap of drought-stressed sunflower plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 339, p. 1599-1605, 1999.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, v. 347, p. 3-31, 1950.
- HOFFMANN, B.; KOSEGARTEN, H. FITC-dextran for measuring apoplast pH and apoplast pH gradients between various cell types in sunflower leaves. **Physiologia Plantarum**, v. 95, p. 327-335, 1995.
- JESCHKE, W. D.; PEUKE, A. D.; PATE, J. S.; HARTUNG, W. Transport, synthesis and catabolism of abscisic acid (ABA) in plants of castor bean (*Ricinus communis* L.) under phosphate deficiency and moderate salinity. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 314, p. 1727-1736, Sep. 1997.
- McAINSH, M. R.; BROWNLEE, C.; HETHERINGTON, A. M. Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca^{+2} precedes stomatal closure. **Nature**, v. 342, p. 186-188, 1990.
- McAINSH, M. R.; WEBB, A. A. R.; TAYLOR, J. E.; HETHERINGTON, A. M. Stimulus-induced oscillations in guard cell cytosolic free calcium. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1207-1219, 1995.
- MENGEL, K.; PLANKER, R.; HOFFMANN, B. Relationship between leaf apoplast pH and iron chlorosis of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Journal of Plant Nutrition**, v. 17, p. 1053-1065, 1994.
- PATONNIER, M. P.; PELTIER, J. P.; MARI GO, G. Drought-induced increase in xylem malate and mannitol concentrations and closure of *Fraxinus excelsior* L. stomata. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 336, p. 1223-1229, 1999.
- QIU, Q.; SU, X. The influence of extracellular-side Ca^{+2} on the activity of the plasma membrane H-ATPase from

- wheat roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 25, p. 923-928, 1998.
- RADIN, J. W.; PARKER, L. L.; GUINN, G. Water relations of cotton plants under nitrogen deficiency. V. Environmental control of abscisic acid accumulation and stomatal sensitivity to abscisic acid. **Plant Physiology**, v. 70, p. 1066-1070, 1982.
- RIDOLF, M.; GARREC, J. P.; LOUGUET, P.; LAFRAY, D. Effects of potassium and calcium deficiencies on stomatal functioning in intact leaves of *Vicia faba*. **Canadian Journal of Botany**, v. 72, p. 1835-1842, 1994.
- RUIZ, L. P.; ATKINSON, C. J.; MANSFIELD, T. A. Calcium in the xylem and its influence on the behaviour of stomata. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v. 341, p. 67-74, 1993.
- SCHILL, V.; HARTUNG, W.; ORTHEN, B.; WEI SENSEEL, M. H. The xylem sap of maple (*Acer platanoides*) trees-sap obtained by a novel method shows changes with season and height. **Journal Experimental of Botany**, v. 47, p. 123-133, 1996.
- SCHURR, U.; GOLLAN, T. Composition of xylem sap of plants experiencing root water stress - a descriptive study. **British Society for Plant Growth Regulation**, Monograph 21, p. 201-214, 1990.
- SCHURR, U.; GOLLAN, T.; SCHULTZE, E. D. Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. **Plant, Cell and Environment**, v. 15, p. 561-567, 1992.
- TARDIEU, F.; DAVIES W. J. Stomatal response to ABA is a function of current plant water status. **Plant Physiology**, v. 98, p. 540-545, 1992.
- TARDIEU, F.; DAVIES, W. J. Integration of hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and water status of droughted plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 16, p. 341-349, 1993.
- THOMPSON, D. D.; WILKINSON, S.; BACON, M. A.; DAVIES, W. J. Multiple signals and mechanisms that regulate leaf growth and stomatal behavior during water deficit. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 303-313, 1997.
- WILKINSON, S.; CORLETT, J. E.; OGER, L.; DAVIES, W. J. Effects of xylem pH on transpiration from wild-type and *flacca* tomato leaves. **Plant Physiology**, v. 117, p. 703-709, Jun. 1998.
- WILKINSON, S.; DAVIES, W. J. Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. **Plant Physiology**, v. 113, p. 559-573, 1997.

WILMER, C.; FRICKER, M. **Stomata**. 2 ed., London: Chapman & Hall, 1996.
375p.

CAPÍTULO 4

REGULAÇÃO DA TRANSPIRAÇÃO MEDIANTE A ALTERAÇÃO DO pH E CONSTITUINTES ORGÂNICOS DO FLUXO XILEMÁTICO

ABSTRACT - Using detached tomato (*Lycopersicon
esculentum* Mill.) leaves, it was evaluated the effects
of different pH (5,5, 6,5 and 7,5), immersion

solutions (nutrient solution 1/2 force, natural sap and artificial sap), concentrations of the organic acids malic, maleic and citric, the amino acids proline, asparagine, glutamine, aspartic acid and glutamic acid, the sugar-alcohols mannitol and sorbitol and the polyamine putrescine on transpiration. It was also evaluated the effects of the addition of those products to the natural sap pH 6,0 and 7,0 on the transpiratory rate. Under growth chamber it was observed reduction on stomatal conductance while transpiration remained constant. The transpiratory rate decreased as the pH became more alkaline, independent of the immersion solution or the addition of any composed to the solution. The acids maleic and citric just prompted small reductions in the transpiratory rate when added to the artificial sap. When added to the natural sap pH 6,0 which not corresponds to the pH of the sap of stressed plants, none of the acids prompted any alteration in the transpiratory rate. In pH 7,0 that it corresponds to the pH of the sap of stressed plants, the addition of the malic and citric acids to the sap delayed the reductions in the transpiratory rate.

Additional index terms: transpiration fluxe, xylem sap, organics acids, aminoacids, polyamine, sugar-alchoois.

RESUMO - Utilizando folhas destacadas avaliou-se o efeito de diferentes pH (5,5, 6,5 e 7,5), soluções de imersão (solução nutritiva 1/2 força, seiva natural e seiva artificial) e concentrações dos ácidos orgânicos málico, maleico e cítrico, dos aminoácidos prolina, asparagina, glutamina, ácido aspártico e ácido glutâmico, dos açúcares-álcoois manitol e sorbitol e da poliamina putrescina sobre a transpiração de *Lycopersicon esculentum* Mill. Foi avaliado também o efeito da adição desses compostos à seiva natural pHs 6,0 e 7,0 sobre a taxa transpiratória. A evolução diurna das trocas gasosas em plantas crescidas em sala-de-crescimento mostrou uma redução na condutância estomática, enquanto a taxa transpiratória manteve-se constante. A taxa transpiratória diminuiu à medida que o pH tornou-se mais alcalino, independente da solução de imersão usada e da adição de qualquer composto à solução. Os ácidos maleico e cítrico promoveram apenas pequenas reduções na taxa transpiratória quando adicionados à seiva artificial. Quando adicionados à seiva natural pH 6,0, que corresponde ao pH da seiva de plantas não estressadas, nenhum dos ácidos promoveu qualquer alteração na taxa transpiratória. Em pH 7,0, que corresponde ao pH da seiva de plantas estressadas, a adição dos ácidos málico e cítrico à seiva retardaram as reduções na taxa transpiratória.

Termos adicionais para indexação: fluxo transpiratório, ácidos orgânicos, aminoácidos, poliamina, açúcares-álcoois.

INTRODUÇÃO

A redução na disponibilidade de água do solo está frequentemente associada a alterações na composição de nutrientes, pH, aminoácidos, ácidos orgânicos, ABA, além de outros compostos da seiva xilemática (Gollan *et al.*, 1992, Schurr *et al.*, 1992; Schurr e Schulze, 1995; Bacon *et al.*, 1998; Wilkinson *et al.*, 1998; Correia *et al.*, 1999; Patonnier *et al.*, 1999; Wilkinson, 1999).

Na seiva do xilema de tomateiro, dentre outros, os ácidos málico, maleico e cítrico e os aminoácidos glutamina, asparagina, ácido aspártico e glutâmico são os encontrados em maiores concentrações (Bialczyk e Lechowski, 1995). Além de ácidos orgânicos e aminoácidos, compostos como manitol, sorbitol (Patonnier *et al.*, 1999), poliaminas (Friedman *et al.*, 1986; Antognoni *et al.*, 1998) também estão presentes na seiva do xilema. A concentração de compostos como o malato e o manitol aumenta na seiva do xilema de algumas espécies sob déficit hídrico (Guicherd *et al.*, 1997; Patonnier *et al.*, 1999) e influenciam o comportamento estomático. Quando aplicado em concentrações encontradas na seiva do xilema, malato inibiu a abertura dos estômatos de *Fraxinus excelsior* (Patonnier *et al.*, 1999) e em *Vicia faba* manitol promoveu redução na taxa transpiratória (Ewert *et al.*, 2000). Em 1987, Loescher já havia mostrado que manitol atua como regulador endógeno em plantas. Outras espécies aniônicas como citrato (Schill *et al.*, 1996) e aspartato (Gollan *et al.*, 1992), encontradas em seiva de xilema, também mostram em diferentes amplitudes, efeitos inibitórios sobre a condutância estomática. Dentre os aminoácidos, a prolina acumula durante o estresse hídrico em muitas espécies e em

Vicia faba promoveu um decréscimo na condutância estomática (Rajagopal, 1981; Raghavendra e Reddy, 1987), enquanto que em *Fraxinus excelsior* não apresentou qualquer efeito sobre os estômatos (Patonnier *et al.*, 1999). Efeitos de prolina e glutamina sobre os estômatos foram também observados por Plunbe e Willmer (1986). Embora os efeitos das poliaminas sobre os estômatos não sejam conhecidos, a aplicação de putrescina, via foliar, promove redução na taxa transpiratória (Todorov *et al.*, 1998).

Mudanças significativas na concentração desses compostos podem ocorrer no fluxo transpiratório de plantas estressadas, podendo afetar processos regulatórios dos estômatos. Poucos são os trabalhos encontrados na literatura sobre a natureza de substâncias químicas translocadas no xilema e que são potencialmente capazes de fornecer informações quanto à disponibilidade de água no solo. Com base nisso, esse trabalho teve como objetivo geral investigar o efeito de alguns compostos encontrados em seiva do xilema sobre o fechamento estomático. Para isso, avaliou-se o efeito de diferentes pH e soluções de imersão, concentrações de ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares-alcóois e poliamina, sobre a taxa transpiratória de folhas destacadas e imersas em seiva artificial. Além disso, avaliou-se também o efeito desses compostos sobre a taxa transpiratória, quando adicionados à seiva natural.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições de cultivo

O experimento foi conduzido no Departamento de Biologia – Unidade de Crescimento de Plantas – da Universidade Federal de Viçosa. Sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* L. var. Santa Clara) foram germinadas em areia e após 18-20 dias as plântulas foram transferidas para vasos contendo 2,5 L de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), 1/2 força, pH 6,5, com sistema de aeração, e mantidas em casa-de-vegetação. Cada vaso continha duas plantas. A solução era trocada a cada dois dias e o volume de água perdido repostado diariamente com água destilada.

Uma semana antes das avaliações, plantas com aproximadamente 40 dias de idade, contados a partir da semeadura, foram transferidas para sala de crescimento com fotoperíodo de 14 horas (com início às 8:00 horas), densidade de fluxo fotossintético (DFF), ao nível das plantas, de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura entre 20-23°C e umidade relativa do ar entre 60-63%. Durante as avaliações, a DFF foi de $600 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a nível das folhas avaliadas. Para filtrar a radiação calorífica das lâmpadas e evitar o aquecimento das folhas, foi colocada uma camada de água corrente entre a fonte de luz e as plantas.

Efeito do pH e de soluções de imersão sobre a taxa transpiratória

Foram utilizadas três soluções de imersão: solução nutritiva de Hoagland ½ força, seiva artificial de Wilkinson *et al.* (1998) e seiva natural. A solução nutritiva de Hoagland, ½ força, constituiu-se de: 3,0 mM de KNO₃, 2,0 mM de CaNO₃, 1,0 mM de MgSO₄ e 0,5 mM de NH₄H₂PO₄. A seiva artificial de Wilkinson *et al.* (1998) constituiu-se de 3,0 mM de KNO₃, 1,0 mM de CaCl₂, 1,0 mM de KH₂PO₄, 1,0 mM de K₂HPO₄, 0,1 mM de MgSO₄ e 0,1 mM de MnSO₄. A composição da seiva natural exsudada do caule a 5cm do colo da planta e analisada às 9:00 horas continha 1,6 mM de NO₃⁻, 15 mM de K⁺, 3,0 mM de Ca⁺², 1,1 mM de Mg⁺², 0,32 mM de SO₄⁻, 1,27 mM de NH₄⁺ e 0,78 mM de PO₄⁻. O pH das soluções foram ajustados para 5,5, 6,5 e 7,5 com NaOH ou HCl. A composição de nutriente das três soluções é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1- Composição de nutrientes (mM), relação cátions/ânions (C/A) e força iônica (FI) das três soluções de imersão usadas.

	Ca ⁺²	K ⁺	Mg ⁺²	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	PO ₄ ⁻³	SO ₄ ⁻	C/A	FI*
Seiva natural	3,0	15	1,1	1,27	1,6	0,78	0,32	7,54	22,3
Sol. Nutritiva	2,0	3,0	1,0	0,50	5,0	0,50	0,50	1,0	12,75
Seiva artificial	1,0	6,0	0,1	—	3,0	2,0	0,2	1,12	15,8

*FI= somatória da concentração dos íons multiplicada por suas cargas ao quadrado

Efeito da concentração de compostos orgânicos sobre a taxa transpiratória

Avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de alguns compostos orgânicos presentes em seiva do xilema, sobre a taxa transpiratória. Para isso, à seiva artificial (Wilkinson *et al.*, 1998), pH 6,0, foram adicionados os compostos nas concentrações especificadas na tabela seguinte.

Tabela 2. Compostos orgânicos adicionados à seiva artificial de Wilkinson *et al.* (1998) pH 6,0.

Compostos	Concentrações
Ácidos: (mM)	

Málico	0,5, 1,0, 2,0
Maleico	0,5, 1,0, 2,0
Cítrico	0,5, 1,0, 2,0
<hr/>	
Aminoácidos :	
Prolina (mM)	5,0, 10, 20
Asparagina (μM)	200, 250, 300
Ácido glutâmico (μM)	200, 250, 300
Glutamina (μM)	250, 300, 350
Ácido aspártico (μM)	100, 150, 200
<hr/>	
Açúcares-álcoois:	
Manitol (mM)	5,0, 10
Sorbitol (mM)	5,0, 10
<hr/>	
Poliamina:	
Putrescina (μM)	10
<hr/>	

Exceto para manitol, sorbitol e putrescina, as demais concentrações foram baseadas no estudo de Bialczyk e Lechowski (1995), sobre a composição da seiva xilemática de tomateiro cultivado em solução nutritiva. O pH da solução de imersão correspondeu à faixa do observado na seiva xilemática das plantas, na ocasião em que foi desenvolvido o experimento.

Efeito da adição de compostos orgânicos à seiva natural sobre a taxa transpiratória

À seiva natural adicionou-se os ácidos málico, maleico, cítrico, aspártico e glutâmico, asparagina e glutamina. Os dados apresentados referem às maiores concentrações para cada composto, dentre as listadas na tabela 2. Os pHs foram ajustados para 6,0 e 7,0 com NaOH ou HCl. O último correspondendo ao pH da seiva do xilema de plantas de tomate submetidas à deficiência hídrica (Wilkinson *et al.*, 1998).

Condições de avaliação

Os experimentos foram realizados em plantas com idade entre 40-45 dias (após a semeadura), ou folhas destacadas dessas plantas. As folhas (quinta folha)

foram destacadas no início da manhã e seus pecíolos imediatamente imersos em água destilada. Após selecionadas para uma mesma taxa transpiratória inicial, as folhas foram transferidas para as soluções de imersão. Tempos após a imersão das folhas foram realizadas as avaliações da taxa transpiratória (E) na superfície abaxial da folha, com um analisador de gases ao infravermelho portátil modelo LCA-2 (ADC, UK). Os experimentos iniciavam-se uma hora após início do fotoperíodo. Cada dado representa a média de quatro repetições, e em alguns casos, o experimento foi repetido, com resultados similares. Para cada repetição foram utilizados 20 mL de seiva natural e 25 mL de seiva artificial ou de solução nutritiva. Apenas um composto foi analisado por dia. A DFF durante as medições foi de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O potencial osmótico das soluções de imersão foi avaliado logo após a adição de cada composto, com um osmômetro (OSMETTE, modelo 2007).

Coleta e análise da seiva do xilema

Para a coleta da seiva foi feita uma excisão no caule acima da primeira folha definitiva, a 5cm acima do colo, lavando-se o corte com água destilada, para evitar possíveis contaminações da seiva com substâncias contidas no suco das células rompidas durante a excisão. A seiva exsudada foi coletada durante duas horas, sempre pela manhã, e imediatamente armazenada a -20°C até a utilização. As concentrações de Ca^{+2} , Mg^{+2} e K^{+} da seiva foram analisadas por espectrofotometria de absorção atômica e de chama. As concentrações de NO_3^{-} , PO_4^{-3} , NH_4^{+} e SO_4^{-} foram determinadas espectrofotometricamente, conforme as metodologias de Cataldo *et al.* (1975), Lindeman (1958), MacCulough (1967) e Malavolta *et al.* (1989), respectivamente.

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Todos os tratamentos compunham de pelo menos quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, a nível de 5% de probabilidade, sendo calculada a diferença mínima significativa pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Variações diurnas da transpiração e condutância estomática

Na Figura 1 são apresentadas as variações diurnas da transpiração e condutância estomática de plantas intactas mantidas em sala-de-crescimento, uma semana antes da avaliação. A condutância estomática mostrou um padrão típico, com os maiores valores no início da manhã, que correspondia às primeiras horas de iluminação, diminuindo a partir daí. Por outro lado, a taxa transpiratória manteve-se constante durante o período. A condutância estomática e transpiração são fortemente influenciadas por fatores do ambiente como a radiação e o déficit de pressão de vapor entre a atmosfera e a folha (DPV) (Cascardo *et al.*, 1993). Apesar de apresentar uma forte dependência desses fatores, a condutância

estomática está sujeita também à regulação endógena (Correia *et al.*, 1997; Kaiser e Kappen, 1997), o que pode ser visto pela redução nos seus valores, observada durante o período (de 9:00 às 17:00 horas), apesar da avaliação ter sido conduzida em sala-de-crescimento, com condições ambientais constantes. A taxa transpiratória, por ser mais influenciada pelo DPV, permaneceu constante durante todo o período de avaliação. Por esse motivo, o movimento estomático em resposta aos vários estímulos (tratamentos), neste e nos demais capítulos, foi avaliado pelas alterações observadas nas taxas transpiratórias. Além disso, em relação à condutância estomática, a taxa transpiratória apresentou menores coeficientes de variação. A correlação entre as duas variáveis foi linear com um $R^2 = 0,83$ (Figura 2).

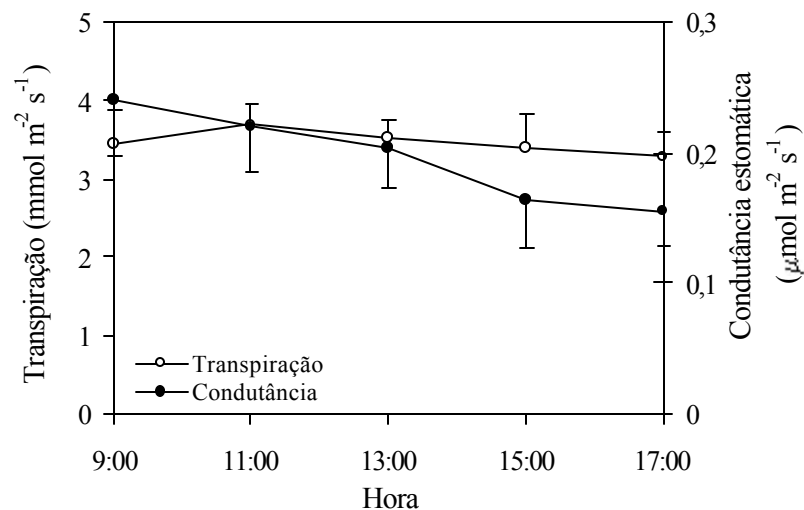
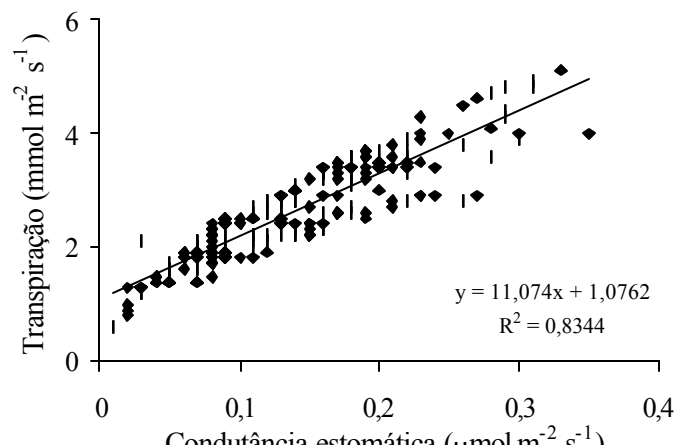


Figura 1. Evolução diurna da taxa transpiratória e da condutância estomática de plantas intactas de tomateiro, com 43 dias de idade, mantidas por uma semana em sala-de-crescimento (DFF $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura entre $20\text{-}23 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar entre $60\text{-}63\%$). A DFF a nível



das folhas avaliadas foi de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O início do experimento corresponde a uma hora após iluminação das plantas.

Figura 2. Correlação entre a condutância estomática e a transpiração de plantas intactas de tomateiro, com idade entre 42-45 dias, avaliadas em todos os experimentos do presente capítulo. A DFF a nível das folhas avaliadas foi de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Efeito do pH e das soluções de imersão sobre a taxa transpiratória (E)

Nesse experimento comparou-se o efeito de três pHs (5,5, 6,5 e 7,5) e de três soluções de imersão (solução nutritiva, seiva artificial e seiva natural) sobre a taxa transpiratória de folhas destacadas de tomate. Os resultados da Figura 3A mostram que não houve diferenças significativas entre a taxa transpiratória de plantas intactas e a de folhas destacadas e imersas em solução nutritiva pH 6,0 (Figura 3A). Esses resultados mostram que as soluções por si não causaram efeito inibitório sobre os estômatos no período em que duraram as avaliações (7 horas). O mesmo pode ser afirmado para o fato de utilizar folhas destacadas. Nesse caso, os resultados são contrários aos de outros autores (Patonnier *et al.*, 1999) que observaram reduções de até 30% na abertura estomática de folhas destacadas, quando comparadas a folhas de plantas intactas.

Até uma hora após a imersão das folhas não havia qualquer efeito dos pHs da soluções de imersão sobre *E*. Nas folhas imersas em solução nutritiva esse tempo foi mais prolongado (2,5 horas). Por esse motivo, os valores são apresentados nos gráficos a partir de uma hora de imersão. Como pode ser observado, as folhas imersas em soluções com pH 7,5 apresentaram as maiores reduções em *E*, independente da solução de imersão usada. No entanto, a amplitude e o tempo de redução de *E* variaram entre as soluções. Em pH 7,5, três horas após a imersão, a redução em *E* foi maior e mais rápida nas folhas imersas nas seivas natural e artificial; em torno de 40% e 54%, respectivamente, em

relação ao valor inicial (Figuras 3B, 3D). Nas folhas imersas em solução nutritiva, a redução foi de apenas 20% do valor inicial e somente após 5 horas de imersão (Figura 3C).

Nas três soluções não houve diferença estatística, ao nível de 5% de probabilidade, entre as taxas transpiratórias das folhas imersas em soluções de pH 5,5 e 6,5, embora tenha havido uma tendência de queda nas folhas imersas em seiva natural nesses pHs, no final do período de avaliação. As folhas imersas em pH 7,5 mostraram-se levemente flácidas no final do experimento. Na imersão em seiva artificial esse comportamento foi mais acentuado e as folhas apresentaram-se totalmente murchas, após quatro horas de avaliação, impedindo avaliações posteriores. O teor relativo de água avaliado nessas folhas foi de 61%, contra 97% das folhas imersas nas soluções de pHs 5,5 e 6,5.

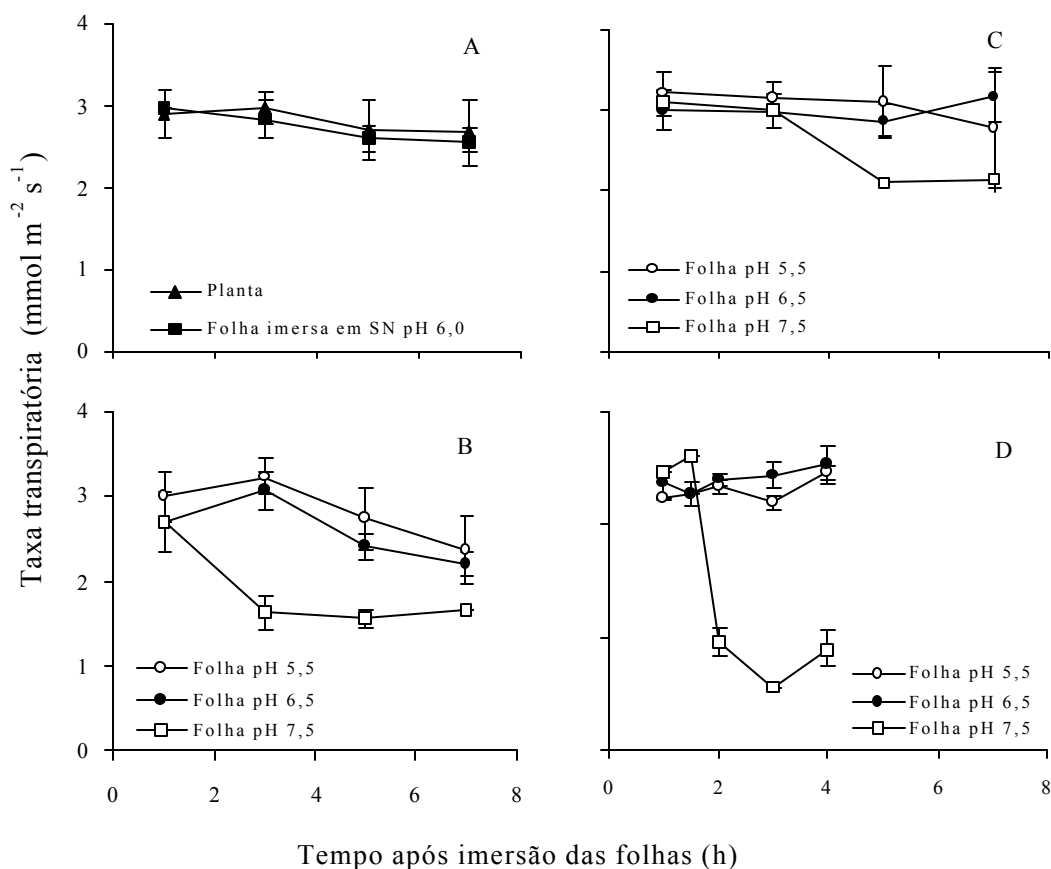


Figura 3. Efeito do pH das três soluções de imersão sobre a taxa transpiratória de folhas destacadas de plantas intactas de tomateiro com 42 dias de

idade. As mesmas avaliações realizadas em folhas destacadas foram acompanhadas em folhas de plantas intactas (A). SN = Solução nutritiva.

Para eliminar os efeitos do pH das soluções sobre a perda de turgescência e, conseqüentemente, sobre o fechamento estomático, foi realizado um experimento preliminar com folhas imersas em seiva natural e artificial em pHs variando de 5,5 (mínimo encontrado na seiva do xilema dessa espécie durante um ano de avaliação – Capítulo 1) a 7,5 (observado na seiva do xilema de algumas espécies submetidas à deficiência hídrica). Em valores de pH menores que 7,0, não foi observada redução no teor relativo de água, em relação a plantas intactas (dados não apresentados). Por isso, esse valor de pH foi estabelecido como o máximo para ser usado nos experimentos posteriores.

Wilkinson e Davies (1997) mostraram que a imersão de folhas destacadas em seiva artificial pH 7,0, comparado ao pH 6,0, promoveu uma redução na taxa transpiratória de até 50% em *Commelina communis*. Reduções de *E* em pH alcalino foram observadas também em *Lycopersicon esculentum* (Thompson *et al.*, 1997) e *Lupinus* (Correia *et al.*, 1999). Em todos os casos, essas reduções ocorreram em concentrações de ABA equivalentes às encontradas na seiva do xilema de plantas não estressadas, que normalmente não afetam *E* (0,01 mmol m⁻³ em *C. communis* e *L. esculentum*). Esse comportamento confirma as observações de outros autores de que os estômatos podem fechar antes do início da síntese de ABA na raiz ou parte aérea, ou mesmo antes do aumento de sua concentração na seiva do xilema (Thompson *et al.*, 1997).

ABA não foi adicionado às soluções de imersão usadas. O pH da seiva natural, coletada do xilema de plantas não estressadas, estava em torno de 6,2, e a concentração de ABA analisada na mesma seiva, em torno de 0,05 mmol m⁻³ (Capítulo 2). Como a seiva xilemática reflete, em parte, o meio apoplástico, o pH menos ácido das soluções de imersão do presente trabalho foi usado para simular o aumento no pH apoplástico (analisado na seiva xilemática) que normalmente ocorre quando plantas são submetidas à deficiência hídrica

(Hartung e Radin, 1989); Wilkinson e Davies, 1997; Correia *et al.*, 1999). O acúmulo de ABA ocorre em compartimentos mais alcalinos (Wilkinson *et al.*, 1998), e seu papel na regulação estomática é importante mesmo em plantas cultivadas em condições hídricas normais (Thompson *et al.*, 1998). Considerando esses fatos, a redução na taxa transpiratória à medida que o pH das soluções de imersão tornaram-se mais alcalinos justifica-se, possivelmente, pelo impedimento da absorção do ABA já presente na seiva natural e no apoplasto das folhas (no caso da imersão em seiva natural), ou apenas no apoplasto das folhas (no caso da imersão em seiva artificial e solução nutritiva) para o simplasto das células do mesofilo e da epiderme. O pH mais alcalino da seiva pode ter promovido, portanto, a manutenção e/ou acúmulo de ABA no apoplasto. Isso pode ter permitido que concentrações de ABA suficientes para promover o fechamento estomático tenham chegado ao apoplasto das células-guarda, via fluxo transpiratório. Em epidermes isoladas, concentrações de ABA na faixa de nM são suficientes para promover o fechamento estomático (Cousson e Vavasseur, 1998; Cousson, 1999). Esse comportamento é possível, ao considerar que, em pH na faixa de valores encontrados no apoplasto de plantas estressadas, tanto a difusão quanto a absorção de ABA, mediada por proteínas carreadoras, para o simplasto das células da epiderme e do mesofilo são reduzidas (Wilkinson e Davies, 1997). Além disso, segundo os mesmos autores, o conteúdo de ABA nas folhas é maior em folhas destacadas transpirando em pH 7,0, em relação ao pH 6,0, o que pode indicar uma redução no seu metabolismo ou no seu transporte via floema (Zhang *et al.*, 1997). Alternativamente, o pH por si pode causar mudanças no estado hídrico da folha, alterando o comportamento estomático. É possível que pHs muito alcalinos possam agir também como um sinal hidráulico para o fechamento estomático (Wilkinson *et al.*, 1998). A redução no teor de água da folha observado em pH 7,5 pode ter reduzido a turgescência das células-guarda ou aumentado a sensibilidade das células-guarda para o ABA já presente (Tardieu e Davies, 1993). A redução no turgor pode também ter estimulado a síntese de ABA na folha (Hartung *et al.*, 1998), promovendo maiores reduções de *E* nos pHs mais alcalinos. Dessa forma, existe a possibilidade que nas folhas destacadas e imersas nas soluções com pH 7,5, este tenha agido duplamente

como um sinalizador: um mediado pelas relações hídricas da folha e outro pela alteração na distribuição do ABA. Acredita-se que em plantas intactas apenas o ABA seja importante como sinalizador (Wilkinson e Davies, 1997).

A perda de turgescência pareceu estar associada ao pH alcalino e não ao fato de utilizar seiva natural como solução de imersão, uma vez que a murcha ocorreu apenas em folhas imersas nas soluções de pH 7,5 e foi maior nas folhas imersas em seiva artificial. Esse fato nos leva a inferir que outros componentes que constituíam as soluções de imersão, além do pH, devem ter influenciado o estado hídrico da folha, contrariando a colocação de Munns e King (1988), para os quais a coleta de seiva e seu fornecimento de volta para a folha, via imersão do pecíolo, resulta em bloqueio do xilema, estimulando o fechamento estomático devido a perda de turgescência das células-guarda (Zhang e Davies, 1991).

Além das alterações no estado hídrico foliar, observadas no pH mais alcalino, as diferenças temporais e na amplitude de redução de E , observadas entre as soluções de imersão usadas, podem estar associadas a alterações na sensibilidade estomática para o ABA apoplástico em função das alterações na composição do fluxo transpiratório, isto é, nas diferenças de composição de nutrientes da solução nutritiva, da seiva natural e da seiva artificial. Alterações na sensibilidade estomática para o ABA transportado no xilema já foram observadas em função, por exemplo, dos níveis de nitrato (Gollan *et al.*, 1992), fosfato (Jeschke *et al.*, 1997), e cálcio (Ruiz *et al.*, 1993; Correia *et al.*, 1999) da seiva xilemática e de seivas artificiais. A concentração de K^+ analisada na seiva natural foi 2,5 e 5 vezes maior que a da seiva artificial e solução nutritiva, respectivamente, o que contribuiu para uma razão entre a soma de cátions e de ânions aproximadamente sete vezes maior nessa seiva, resultando na alteração da força iônica das soluções (Tabela 1). Muitas enzimas e sistemas biológicos apresentam atividade ótima sob algumas condições fisiológicas que incluem uma constância relativa de pH e força iônica (Beynon e Easterby, 1996).

Embora a concentração individual de íons tenha sido diferente, a proporção cátions/ânions foi quase a mesma na seiva artificial e na solução nutritiva $\frac{1}{2}$ força. As diferenças nas concentrações de Ca^{+2} , NO_3^- e PO_4^{-3} , nutrientes citados na literatura como capazes de influenciar as respostas

estomáticas para o ABA (Gollan *et al.*, 1992; Ruiz *et al.*, 1993; Jeschke *et al.*, 1997; Correia *et al.*, 1999), podem ter influenciado as respostas estomáticas. Além disso, a alteração no pH em função de variação na concentração de nutrientes pode ser a forma como os nutrientes afetam o comportamento estomático. Esse efeito não pode ser inferido no presente experimento, uma vez que os pHs foram ajustados.

Efeito dos ácidos orgânicos sobre a taxa transpiratória

Num primeiro experimento buscou-se avaliar os efeitos da concentração dos ácidos málico, maleico e cítrico sobre a taxa transpiratória. As concentrações usadas foram baseadas na composição da seiva xilemática de tomateiro, segundo Bialczyk e Lechowski (1995). Para isso, utilizou-se como solução de imersão a seiva artificial de Wilkinson *et al.* (1998). Os resultados apresentados na Figura 4 mostram que, quando adicionado à seiva artificial, o ácido málico não afetou a taxa transpiratória, enquanto os ácidos maleico e cítrico promoveram apenas pequenas reduções, quando comparados ao controle (sem a adição de ácido).

Na seiva do xilema de tomate os ácidos málico, maleico e cítrico são os que se encontram em maiores concentrações (Bialczyk e Lechowski, 1995). A concentração de malato pode aumentar na seiva do xilema de algumas espécies quando submetidas à deficiência hídrica (Patonnier *et al.*, 1999), e alterar o comportamento estomático. Simulando o efeito da deficiência hídrica sobre a concentração de compostos orgânicos na seiva do xilema, os ácidos málico, maleico e cítrico foram adicionados à seiva natural para uma concentração final de 2,0 mM. As seivas foram coletadas de plantas não estressadas e os pHs ajustados para 6,0 e 7,0 (Figura 5). Em pH 6,0, que corresponde ao pH da seiva de plantas não estressadas, nenhum dos ácidos promoveu qualquer alteração em *E*. Por outro lado, em pH 7,0, usado para simular o aumento do pH da seiva de algumas espécies quando são submetidas à deficiência hídrica, a adição do ácido málico à seiva retardou as reduções de *E*. No tratamento controle (sem ácido), *E* reduziu 2,5 horas após a imersão das folhas nas soluções,

enquanto que na presença de ácido málico essa redução ocorreu apenas quatro horas após a imersão, atingindo os mesmos valores do controle no final do período de avaliação. Nesse mesmo pH, na presença de ácido cítrico, *E* manteve-se constante durante todo o período, enquanto que na sua ausência *E* reduziu a partir de 2,5 horas de imersão das folhas.

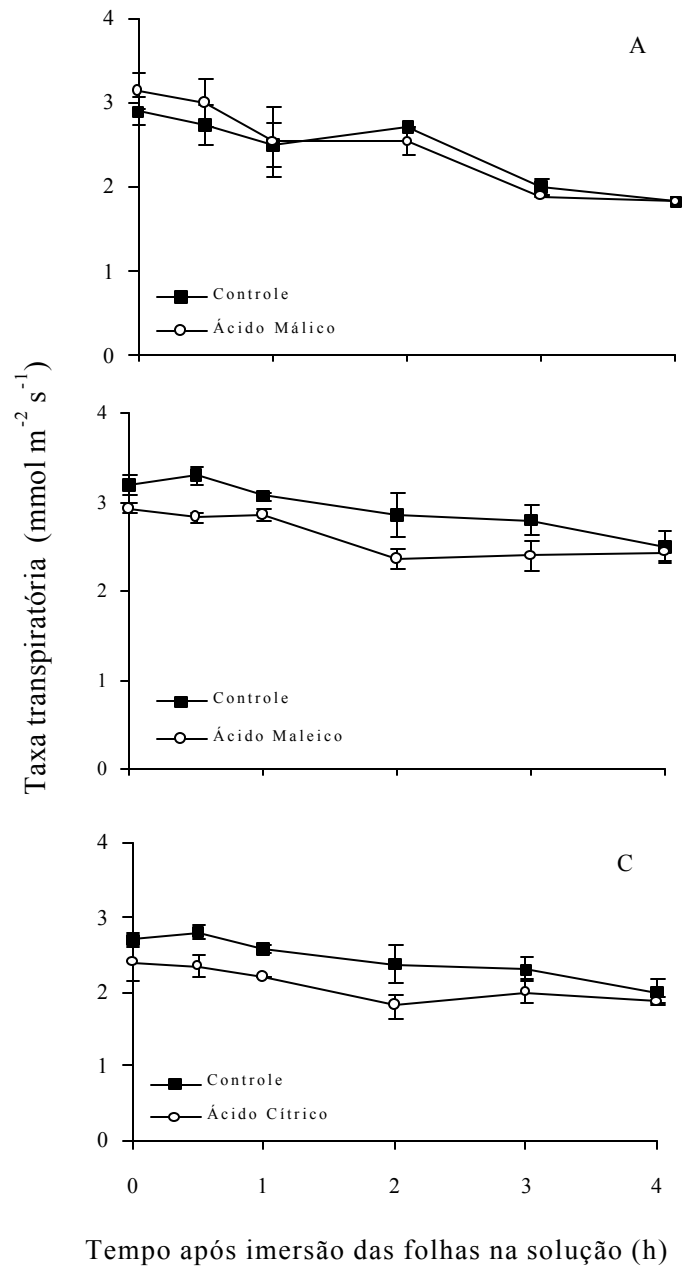


Figura 4. Efeito dos ácidos orgânicos málico (2,0 mM), maleico (2,0 mM) e cítrico (2,0 mM), adicionados à seiva artificial pH 6,0, sobre a taxa transpiratória de folhas destacadas de tomate.

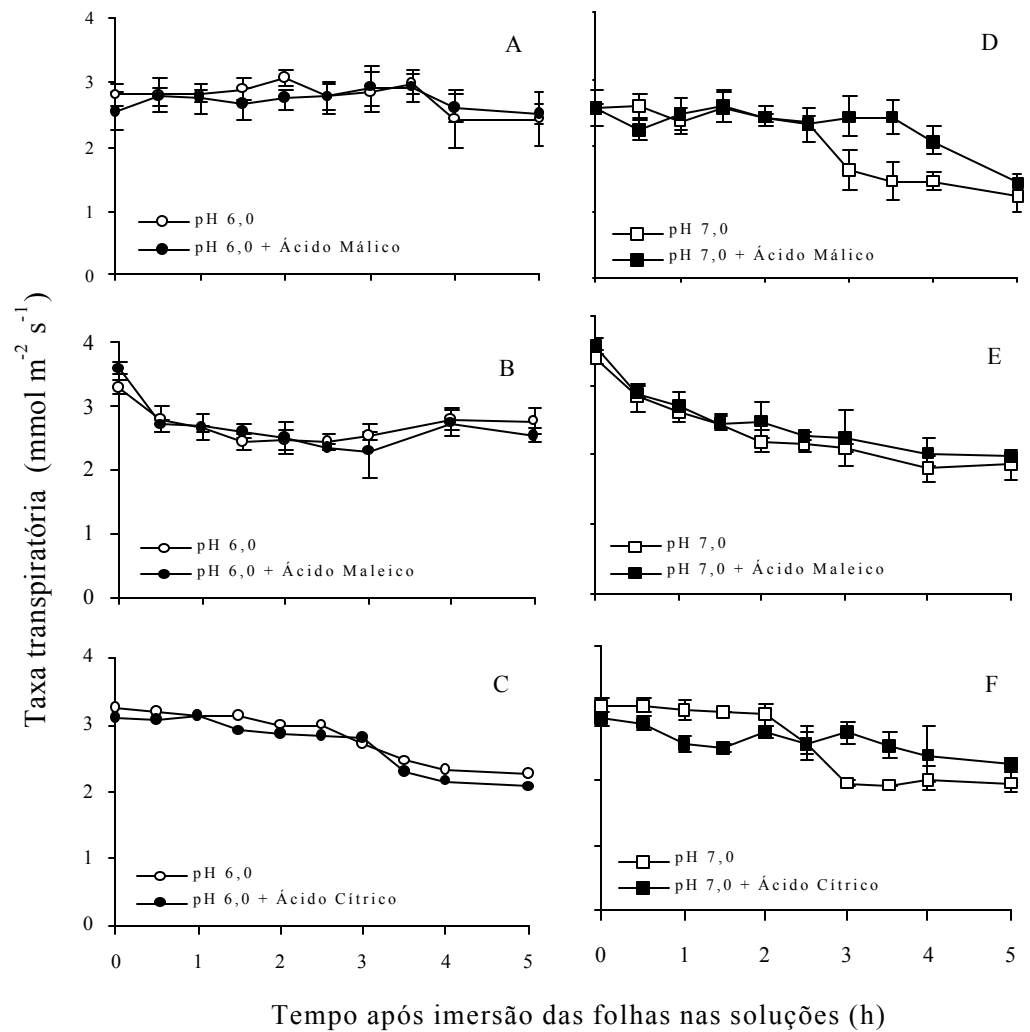


Figura 5. Efeito dos ácidos málico (2,0 mM), maleico (2,0 mM) e cítrico (2,0 mM), adicionados à seiva natural pH 6,0 (A,B,C) e 7,0 (D,E,F), sobre a taxa transpiratória em folhas destacadas de tomate.

As maiores reduções em *E* em pH 7,0, usado para simular o aumento no pH de seiva de plantas estressadas, já era esperada e as causas incluem algumas proposições já citadas, como a alteração na distribuição de ABA entre os vários compartimentos celulares, permitindo que uma maior quantidade desse hormônio alcance o apoplasto das células-guarda (Wilkinson *et al.*, 1997). A inibição na redução da taxa transpiratória promovida pelos ácidos málico e cítrico é um comportamento contrário ao observado por Patonnier *et al.* (1999). Trabalhando com *Fraxinus excelsior*, uma espécie considerada tolerante ao déficit hídrico, esses autores observaram que a resposta estomática para diferentes concentrações de malato e citrato exógenos, adicionados ao fluxo transpiratório, mostraram, em diferentes amplitudes, um efeito inibitório sobre a condutância estomática, sendo ainda mais efetivos como sais, principalmente o de potássio, em relação ao de sódio. Os ácidos foram adicionados à seiva natural que já continha, além de outros constituintes, uma grande quantidade de potássio (Tabela 1). Em sendo esses ácidos carboxílicos, e com pKa entre 3,8-4,74 (cítrico), 3,4-5,1 (málico) e 1,8-6,7 (maleico), no pH 7,0 usado, encontravam-se presentes, provavelmente, na forma de sais (Martinoia e Rentsch, 1994), associados aos íons presentes na seiva, ou como ésteres, com suas cargas negativas livres. A presença predominante de uma forma ou outra depende do balanço de nutrientes. A concentração predominante de K^+ na seiva natural (Tabela 1) pode ter favorecido a presença dos ácidos na forma de sais de K^+ .

A solução de imersão de Patonnier constituía apenas de água destilada contendo o composto referido, com pH ajustado para 6,25, portanto, uma composição mais próxima da seiva artificial usada no presente experimento, que, além dos ácidos, continha outros íons minerais

(Tabela 1). A seiva natural, por sua vez, contém, além de ABA, inúmeros constituintes desconhecidos e as interações com os compostos adicionados podem ser as mais variadas, interferindo na sensibilidade estomática para esse fitormônio. Isso torna-se mais provável quando se observa que, mesmo em pH 6,0, os ácidos não afetaram a taxa transpiratória, quando foram adicionados à seiva natural (Figura 5- lado esquerdo da figura).

Em folhas destacadas de *Fraxinus Excelsior*, 0,5-3,0 mM de malato adicionados ao fluxo transpiratório, concentração correspondente a encontrada na seiva do xilema de plantas estressadas, inibiu a abertura estomática (Patonnier *et al.*, 1999). Outras espécies aniônicas como citrato e aspartato, também encontradas em seiva do xilema de outras espécies (Gollan *et al.* 1992; Schill *et al.*, 1996), mostraram, em diferentes amplitudes, efeito inibitório sobre a condutância estomática. O mesmo efeito para o ácido aspártico não foi observado no presente trabalho.

Segundo Hedrich e Märten (1993) e Hedrich *et al.* (1994) o aumento nos níveis de malato no apoplasto circundante às células-guarda pode afetar processos regulatórios do movimento estomático, seja por meio do aumento na pressão osmótica, ou via processos mais específicos. Malato altera as propriedades de canais aniônicos dependentes de voltagem, presentes nas células-guarda, aumentando a liberação de ânions endógenos, o que, em *Vicia faba*, resulta no fechamento estomático (Hedrich *et al.*, 1994).

As observações de que malato apoplástico regula canais aniônicos nas células-guarda aumentam o questionamento se os níveis deste composto no apoplasto estão sujeitos à modulação. O efeito inibitório de espécies orgânicas aniônicas sobre a condutância estomática parece ser dependente da carga da molécula (Patonnier *et al.*, 1999). Como sugerido por esses autores, a presença de cargas negativas no apoplasto que circunda as células-guarda pode inativar parcialmente alguns componentes importantes na

membrana plasmática. Uma possibilidade, nesse caso, seria a inativação dos canais de entrada de potássio que operam em potenciais mais negativos que -100 mV. Além disso, a despolarização da membrana plasmática pode estabelecer um gradiente, permitindo o efluxo de potássio (Schroeder *et al.*, 1987). Alternativamente, os ácidos orgânicos podem alterar o comportamento estomático via a alteração do pH apoplástico (Schill *et al.*, 1996), o que resultaria em alteração na distribuição de ABA e de outros componentes da seiva do xilema. Segundo Prima-Putra e Botton (1998), a presença dos ácidos orgânicos no xilema pode exercer uma importante função em manter baixo o pH, necessário para manter os aminoácidos como compostos neutros e assim aumentar a velocidade de transporte.

Efeito de aminoácidos sobre a taxa transpiratória

Os efeitos das concentrações dos ácidos glutâmico e aspártico, da prolina, da asparagina e da glutamina, adicionados à seiva artificial, sobre *E* são mostrados na Figura 6. Dentre esses aminoácidos, apenas o ácido glutâmico promoveu uma redução crescente em *E* (Figura 6A).

O comportamento em relação à prolina foi contrário ao observado por Rajagopal (1981), onde prolina, aplicada em concentrações entre 5-10 mM em folhas destacadas de *V. faba*, aumentou a resistência estomática. Comportamento semelhante, mas numa magnitude bem menor, foi observado por Plumbe e Willmer (1986), em epidermes isoladas de *C. communis*. Para os últimos autores, a baixa concentração usada (0,1mM)

pode ter sido a causa do resultado. Patonnier *et al.* (1999) não observaram efeito da prolina sobre os estômatos.

Apesar das observações de que prolina e glutamina acumulam em grandes quantidades em tecidos de plantas estressadas e participam do ajustamento osmótico, esses aminoácidos podem não afetar diretamente processos nas células-guarda, relacionados ao fechamento estomático. No entanto, Klein e Itai (1989), estudando o papel da prolina na regulação do movimento estomático, mostraram que ela parece estar envolvida na recuperação da abertura estomática após o estresse.

Quando adicionados à seiva natural, pH 6,0, nenhum dos aminoácidos influenciou a taxa transpiratória (Figura 7). Em seiva pH 7,0, apenas o ácido glutâmico promoveu uma redução em *E*, o mesmo efeito sendo observado quando da sua adição em seiva artificial pH 6,0 (Figura 6). Os resultados em relação ao ácido aspártico contrariam os de Patonnier *et al.* (1999), cuja adição no fluxo transpiratório promoveu uma redução na condutância estomática em *F. excelsior*.

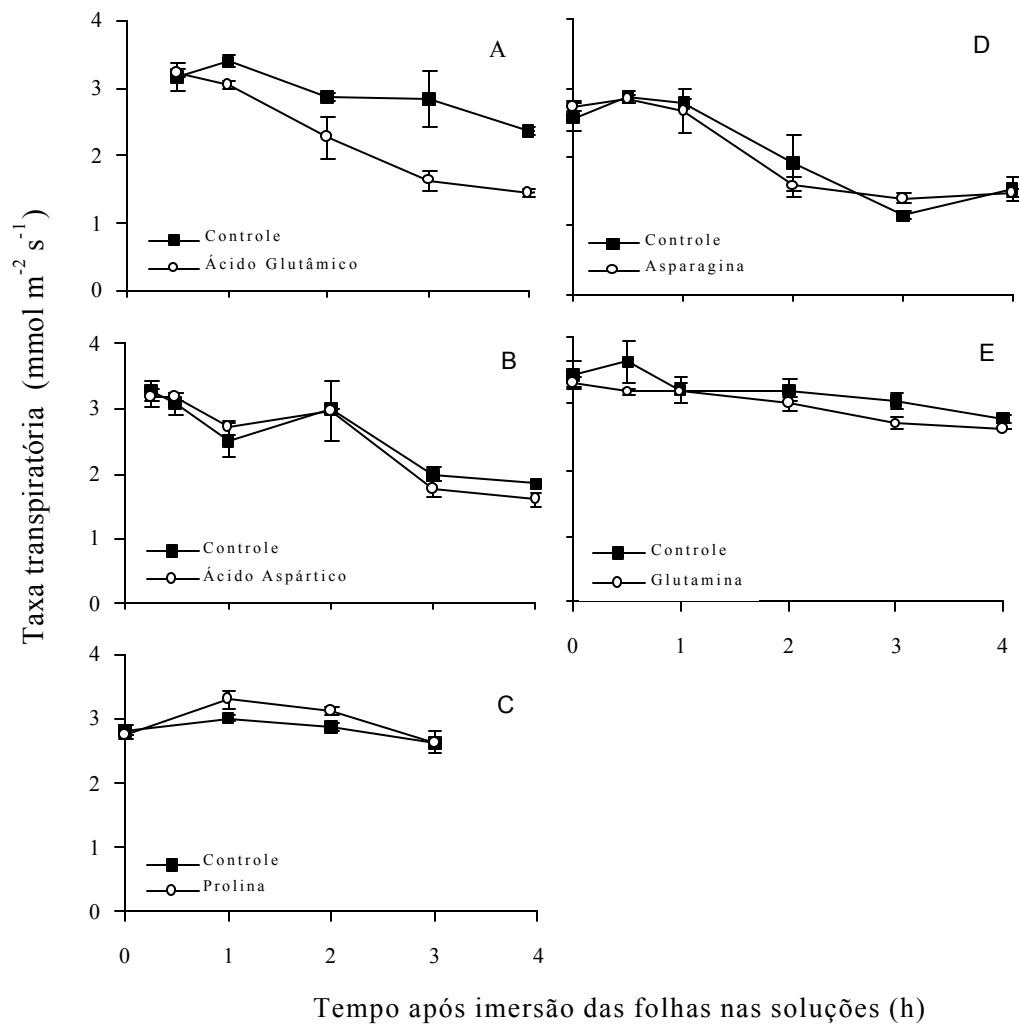


Figura 6. Efeito dos ácidos glutâmico (300 μM) e aspártico (200 μM), prolina (20 mM), asparagina (300 μM) e glutamina (350 μM), adicionados à seiva artificial pH 6,0, sobre a taxa transpiratória em folhas destacadas de tomate.

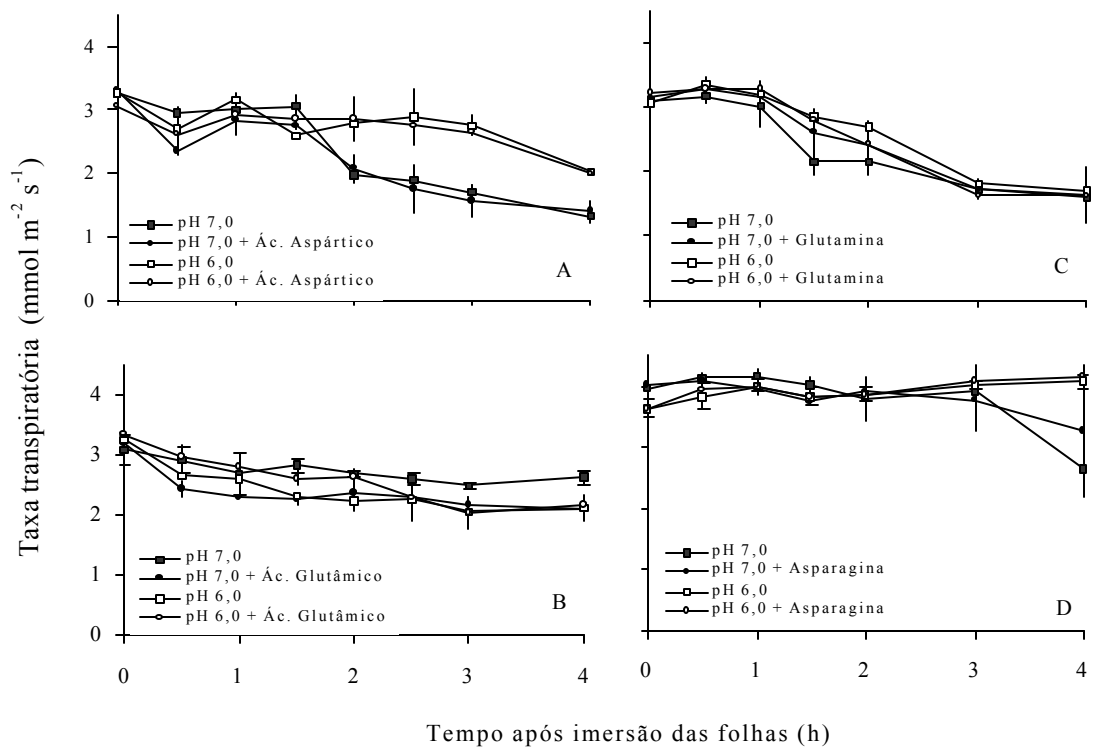


Figura 7. Efeito dos ácidos aspártico (200 μM), glutâmico (300 μM), da glutamina (350 μM) e da asparagina (300 μM) adicionados à seiva natural, pH 6,0 e 7,0, sobre a taxa transpiratória em folhas destacadas de tomate.

Efeito de açúcares-álcoois sobre a taxa transpiratória

Embora não haja na literatura menção da presença de manitol e sorbitol em seiva de xilema de tomateiro, a utilização foi atribuída ao fato da concentração de manitol aumentar na seiva do xilema de plantas de *F. excelsior* quando submetidas à deficiência hídrica (Patonnier *et al.*, 1999) e alterar a taxa transpiratória em *Vicia faba* (Ewert *et al.*, 2000). Quando adicionados à seiva artificial, manitol e sorbitol não apresentaram efeitos significativos sobre a transpiração de folhas destacadas de tomate (Figura 8). Por outro lado, quando adicionados à seiva

natural, para uma concentração final de 10 mM manitol promoveu uma redução na taxa transpiratória em pH 6,0 e 7,0 (Figura 9). Na mesma seiva, sorbitol não influenciou a taxa transpiratória em pH 6,0, mas, ao contrário de manitol, impediu a redução de E , quando as folhas foram imersas em pH 7,0.

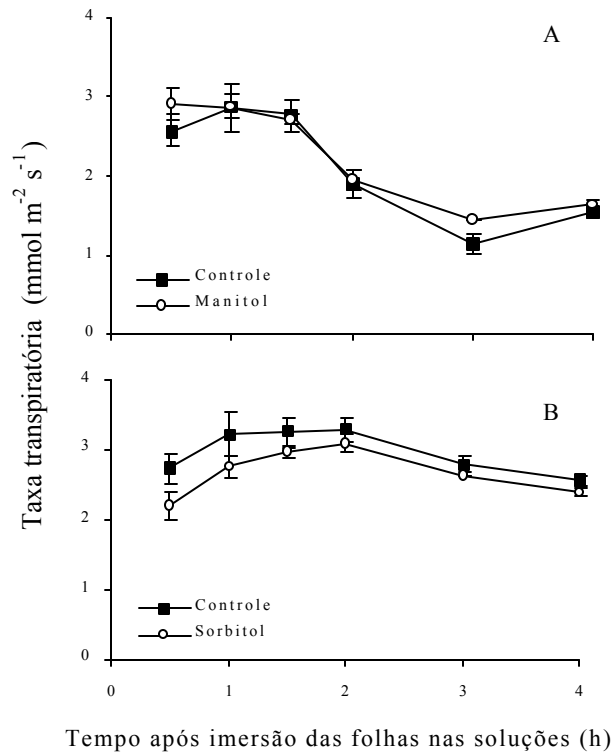


Figura 8. Efeito dos açúcares-alcóois manitol (10 mM) e sorbitol (10 mM), adicionados à seiva artificial, pH 6,0, sobre a taxa transpiratória, em folhas destacadas de tomate.

Tem sido mostrado que manitol atua como regulador endógeno em plantas (Loescher, 1987), participa do ajustamento osmótico em plantas sob déficit hídrico (Karakas *et al.*, 1997) e atua como osmoprotetor (Shen *et al.*, 1999) devido à sua habilidade em dissipar espécies reativas de oxigênio em plantas sob estresses (Pharr *et al.*, 1999). É encontrado em seiva de xilema e sua concentração neste compartimento aumenta em plantas sob déficit hídrico (Patonnier *et al.*, 1999). Dentro da faixa de concentração encontrada na seiva do

xilema, manitol não afetou a condutância estomática em *Fraxinus excelsior* (Patonnier *et al.*, 1999), quando aplicado no fluxo transpiratório de folhas destacadas. Contrário ao observado em *F. excelsior*, em folhas destacadas de *Vicia faba*, a adição de 5 mM de manitol no fluxo transpiratório promoveu uma redução na transpiração (Ewert *et al.*, 2000). Foi mostrado que manitol move através do apoplasto de folhas transpirando e acumula na parede celular das células-guarda, numa concentração osmoticamente significativa. Essas observações são consistentes com a hipótese de Lu *et al.* (1997) de que flutuações na concentração de solutos endógenos na parede celular das células-guarda são importantes na regulação da abertura estomática em folhas intactas.

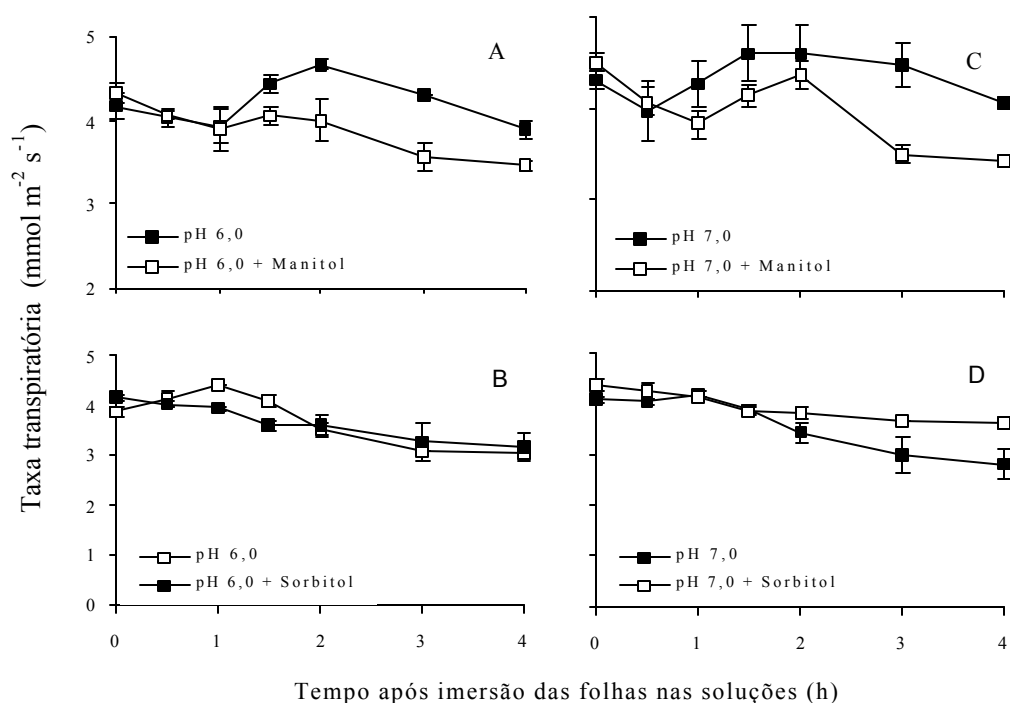


Figura 9. Efeito dos açúcares-alcóois manitol (10 mM) e sorbitol (10 mM) adicionados à seiva natural, pH 6,0 e 7,0, sobre a taxa transpiratória, em folhas destacadas de tomate.

O acréscimo na concentração de manitol à seiva do xilema pode induzir um decréscimo no potencial osmótico. Ao determinar o valor mínimo do

potencial osmótico necessário para inibir a abertura estomática, Patonnier *et al.* (1999) observaram que o aumento na concentração osmótica, promovida por manitol, na faixa de 10-150 mM não foi suficiente para o fechamento estomático. No presente trabalho, o potencial osmótico da solução de imersão, medido logo após a adição dos compostos, não foi alterado com a adição de 10 mM de manitol.

Efeito de putrescina sobre a taxa transpiratória

Quando adicionado à seiva artificial pH 6,0, 10 μ M de putrescina não influenciou *E*, mas quando adicionada à seiva natural, promoveu uma leve redução em *E* (Figura 10).

As poliaminas estão presentes em seiva do xilema (Friedman *et al.*, 1986; Antognoni *et al.*, 1998), sendo que na seiva do xilema de girassol, putrescina foi encontrada numa concentração de 1,4 μ M (Friedman *et al.*, 1986). Todorov *et al.*, (1998) mostraram que, enquanto a aplicação exógena de ABA aumenta a resistência estomática e decresce a taxa transpiratória, putrescina, aplicada via foliar, em concentrações de 10^{-3} - 10^{-5} M tem efeito oposto. Nas plantas submetidas a estresse osmótico, sua concentração aumentou.

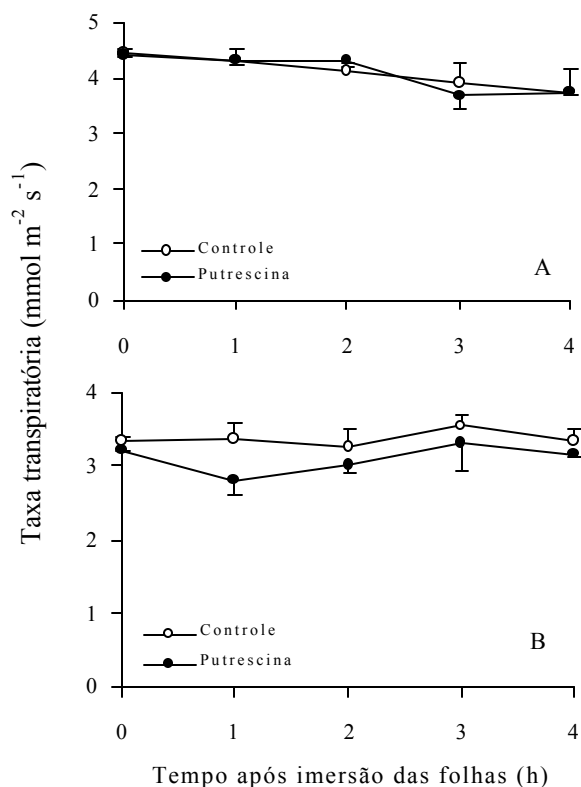


Figura 10. Efeito da putrescina ($10 \mu\text{M}$) adicionada à seiva artificial (A) e natural (B), pH 6,0, sobre a taxa transpiratória em folhas destacadas de tomate.

Em protoplastos isolados, as poliaminas promovem aumento na concentração de cálcio citossólico (Majewska-Sawka *et al.*, 1997). Com o fechamento estomático promovido por ABA é precedido por um aumento na concentração de cálcio citossólico (Mansh *et al.*, 1990), essa pode ser uma possível maneira com putrescina influencia o comportamento estomático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTOGNONI, F.; FORNALE, S.; GRIMMER, C.; KOMDR, E.; BAGNI, N. Long-distance translocation of polyamine in phloem and xylem of *Ricinus communis* L. plants. **Planta**, v. 204, n. 4, p. 520-527, 1998.
- BACON, M A.; WILKINSON, S.; DAVIES, WJ. pH-regulated leaf cell expansion in droughted plants is abscisic acid dependent. **Plant Physiology**, v. 118, p. 1507-1515, 1998.
- BEYNON, R. J.; EASTERBY, J. S. **Buffer solutions the basics**. Oxford: Oxford University Press, 1996. 84p.
- BIALCZYK, J.; LECHOWSKI, Z. Chemical composition of xylem sap of tomato grown on bicarbonate containing medium **Journal of Plant Nutrition**, v. 18, n. 10, p. 2005-2021, 1995.
- CASCARDO, J. C. M.; OLIVEIRA, L. E. M.; SOARES, A. M. Disponibilidade de água e doses de gesso agrícola nas relações hídricas da seringueira. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, n. 1, p. 31-34, 1993.
- CATALDO, D. A.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Soil Science and Plant Analysis Communication**, v. 6, p. 71-80, 1975.
- CORREIA, M. J.; RODRIGUES, M. L.; FERREIRA, M. I.; PEREIRA, J. S. Diurnal changes in the relation between stomatal conductance and abscisic acid in the xylem sap of field-grown peach trees. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 1727-1736, 1997.
- CORREIA, M. J.; RODRIGUES, M. L.; OSÓRIO, M. L.; CHAVES, M. M. Effects of growth temperature on response of lupin stomata to drought and abscisic acid. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 26, p. 549-555, 1999.
- COUSSON, A.; VAVASSEUR, A. Two potential Ca^{2+} -dependent transduction pathways in stomatal closing in response to abscisic acid. **Plant Journal of Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 257-262, 1998.
- EWERT, M. S.; OUTLAW Jr., W. H.; ZHANG, S.; AGHORAM, K.; RIDDLE, K. A. Accumulation of an apoplastic solute in the guard-cell wall is sufficient to exert a significant effect on transpiration in *Vicia faba*

- leaflets. **Plant Cell and Environment**, v. 23, p.195-203, 2000.
- FRIEDMAN, R.; LEVIN, N.; ALTMAN, A. Presence and identification of polyamines in xylem and phloem exudates of plants. **Plant Physiology**, v.82, p.1154-1157, 1986.
- GOLLAN, T.; SCHURR, U.; SCHULTZE, E. D. Stomatal responses to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. I. The concentration of cations, anions, amino acids in and pH of the xylem sap. **Plant, Cell and Environment**, v.15, p.551-559, 1992.
- GUICHERD, P.; PELTIER, J.P.; GOUT, E.; BLIGNY, R.; MARI GO, G. Osmotic adjustment in *Fraxinus excelsior* L.: malate and manitol accumulation in leaves under drought conditions. **Trees**, v.11, p.155-161, 1997.
- HARTUNG, W.; RADIN, J.W. Abscisic acid in the mesophyll apoplast and in the root xylem sap of water stressed plants. The significance of pH gradients. **Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology**, v.8, p.110-124, 1989.
- HEDRICH, R.; MARTEN, I. Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion channel could provide a CO₂ sensor to guard cells. **EMBO Journal**, v.12, p.897-901, 1993.
- HEDRICH, R.; MARTEN, I.; LOHSE, I.; DIETRICH, P.; WINTER, H.; LOHAUS, G.; HELDT, H.W. Malate-sensitive anion channels enable guard cells to sense changes in the ambient CO₂ concentration. **Plant Journal**, v.6, p.741-748, 1994.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, v.347, p.3-31, 1950.
- JESCHKE, W.D.; PEUKE, A.D.; PATE, J.S.; HARTUNG, W. Transport, synthesis and catabolism of abscisic acid (ABA) in plants of castor bean (*Ricinus communis* L.) under phosphate deficiency and moderate salinity. **Journal of Experimental Botany**, v.48, n.314, p.1727-1736, 1997.
- KAISER, H.; KAPPEN, L. In situ observations of stomatal movements in different light-dark regimes: the influence of endogenous rhythmicity and long-term adjustments. **Journal of Experimental Botany**, v.48, 1583-1589, 1997.
- KLEIN, A.; ITAI, C. Is proline involved in stomata regulation of *Commelina communis* L. plants recovering from salinity stress? **Physiologia Plantarum**, v75, p.324-331, 1989.
- KARAKAS, B.; OZIAS-AKINS, P.; STUSHNOFF, C.; SUEFFERHELD, M.; RIEGER, M. Salinity and drought

- tolerance of manitol-accumulating transgenic tobacco. **Plant, Cell and Environment**, v. 20, p. 609-616, 1997.
- LINDEMAN, W. Observations on the behaviour of phosphate compounds in *Clorella* at transition from dark to light. In: **UNITED NATIONS INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE PEACEFUL USES OF ATOMIC ENERGY**, 2, 1958, Geneva. Proceedings... Geneva:[s.n.], 1958. Vol. 24, pt.1, p.8-15: Isotopes in Biochemistry and Physiology.
- LOESCHER, W.H. Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 70, p. 553-557, 1987.
- MAINSH, M.R.; BROWLEE, C.; HETHERINGTON, A.M. Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca^{+2} precedes stomatal closure. **Nature**, v. 342, p. 186-188, 1990.
- MACCULOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta**, v. 17, p. 297-304, 1967.
- MAJEWSKA-SAWKA, A.; BUTOW, R.; NIKLAS, A. Do polyamines release membrane-bound calcium in sugar beet protoplasts? **Journal of Plant Physiology**, v. 153, p. 247-250, 1998.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; E OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas. Principios e aplicações**. Associação Brasileira para Pesquisa do Potássio e do Fósforo. Piracicaba, SP, 1989, 201p.
- MARTINOIA, E.; RENTSCH, D. Malate compartmentation - responses to a complex metabolism **Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology**, v. 45, p. 447-467, 1994.
- MUNNS, R.; KING, R.W. Abscisic acid is not the only stomatal inhibitor in the transpiration stream of wheat plants. **Plant Physiology**, v. 88, p. 703-708, 1988.
- PATONNIER, M.P.; PELTIER, J.P.; MARI GO, G. Drought-induced increase in xylem malate and mannitol concentrations and closure of *Fraxinus excelsior* L. stomata. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 336, p. 1223-1229, Jul. 1999.
- PHARR, D.M.; PRATA, R.T.N.; JENNINGS, D.B.; WILLIAMSON, J.D.; ZAMSKI, E. Regulation of mannitol dehydrogenase: relationship to plant growth and stress tolerance. **Hortscience**, v. 34, p. 1027-1031, 1999.
- PLUMBE, A.M.; WILLMER, C.M. Phytoalexins, water-stress, fatty acids and some other compounds on stomatal. **New Phytologist**, v. 103, p. 17-22, 1986.
- PRI MA-PUTRA, D.; BOTTON, B. Organic and inorganic compounds of xylem exudates from five woody plants at the stage of bud breaking. **Journal Plant Physiology**, v. 153, p. 670-676, 1998.

- RAGHAVENDRA, A. S.; REDDY, K. B. Action of proline on stomata differs from that of abscisic acid, G-substances, or methyl jasmonate. **Plant Physiology**, v. 83, p. 732-734, 1987.
- RAJAGOPAL, V. The influence of exogene proline on stomatal resistance in *Vicia faba*. **Physiologia Plantarum**, v. 53, p. 292-296, 1981.
- RUIZ, L. P.; ATKINSON, C. J.; MANSFIELD, T. A. Calcium in the xylem and its influence on the behaviour of stomata. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v. 341, p. 67-74, 1993.
- SCHILL, V.; HARTUNG, W.; ORTHEN, B.; WEI SENSEEL, M. H. The xylem sap of maple (*Ace platanoides*) trees-sap obtained by a novel method shows changes with season and height. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, p. 123-133, 1996.
- SCHROEDER, J. I.; RASCHKE, K.; NEHER, E. Voltage dependence of K⁺ channel in guard-cell protoplasts. **Proceeding of the National Academy of Sciences, USA**, v. 84, p. 4108-4112, 1987.
- SCHURR, U.; GOLLAN, T.; SCHULTZE, E. D. Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. **Plant, Cell and Environment**, v. 15, p. 561-567, 1992.
- SHEN, B.; HOHAMANN, S.; JENSEN, R. G.; BOHNERT, H. J. Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in Yast. **Plant Physiology**, v. 121, p. 45-52, 1999.
- TARDIEU, F.; DAVIES, W. J. Integration of hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and water status of droughted plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 16, p. 341-349, 1993.
- THOMPSON, D. D.; WILKINSON, S.; BACON, M. A.; DAVIES, W. J. Multiple signals and mechanisms that regulate leaf growth and stomatal behavior during water deficit. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 303-313, 1997.
- TODOROV, D.; ALEXIEVA, V.; KARANOV, E. Effect of putrescine, 4-PU-30, and abscisic acid on maize plants grown under normal, drought, and rewatering conditions. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 17, p. 197-203, 1998.
- WILKINSON, S. PH as a stress signal. **Plant Growth Regulation**, v. 29: 87-99, 1999.
- WILKINSON, S.; CORLETT, J. E.; OGER, L.; DAVIES, W. J. Effects of xylem ph on transpiration from wild-type and *flacca* tomato leaves. **Plant Physiology**, v. 117, p. 703-709, 1998.

- WILKINSON, S.; DAVIES, WJ. Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. **Plant Physiology**, v.113, p.559-573, 1997.
- ZHANG, J.; DAVIES, WJ. Anti-transpirant activity in the xylem sap of maize plants. **Journal of Experimental Botany**, v.42, p.317-321. 1991.
- ZHANG, J.; JIA, W; ZHANG, D.P. Effect of leaf water status and xylem pH on metabolism of xylem transported abscisic acid. **Plant Growth Regulation**, v.21, p.51-58, 1997.

DISCUSSÃO GERAL

As plantas podem perceber a deficiência de água no solo e promover alterações na parte aérea, mediante transferência de sinais químicos da raiz para as folhas (Jenssen *et al.*, 1996). Esses sinais são supostamente sintetizados nas raízes, após a exposição da planta ao estresse, e transferidos para a parte aérea, via fluxo transpiratório, onde promovem o fechamento estomático. Além do aumento na síntese de

algumas substâncias, como o ABA, em raízes de plantas submetidas à deficiência hídrica, alterações na composição de nutrientes minerais (Gollan *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1998), ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares-álcoois (Patonnier *et al.*, 1999) e pH da seiva do xilema (Wilkinson *et al.*, 1998) podem interferir nas respostas estomáticas ao ABA

A nível de plantas inteiras, o déficit hídrico promoveu um aumento no pH e nas concentrações de ABA e de nutrientes minerais da seiva do xilema. Um aumento na proporção cátions/ânions na seiva (Gollan *et al.*, 1992) e/ou alteração no sítio de redução do nitrato (Dannel *et al.*, 1995) podem também promover um aumento no pH apoplástico/xilema de plantas submetidas à deficiência hídrica.

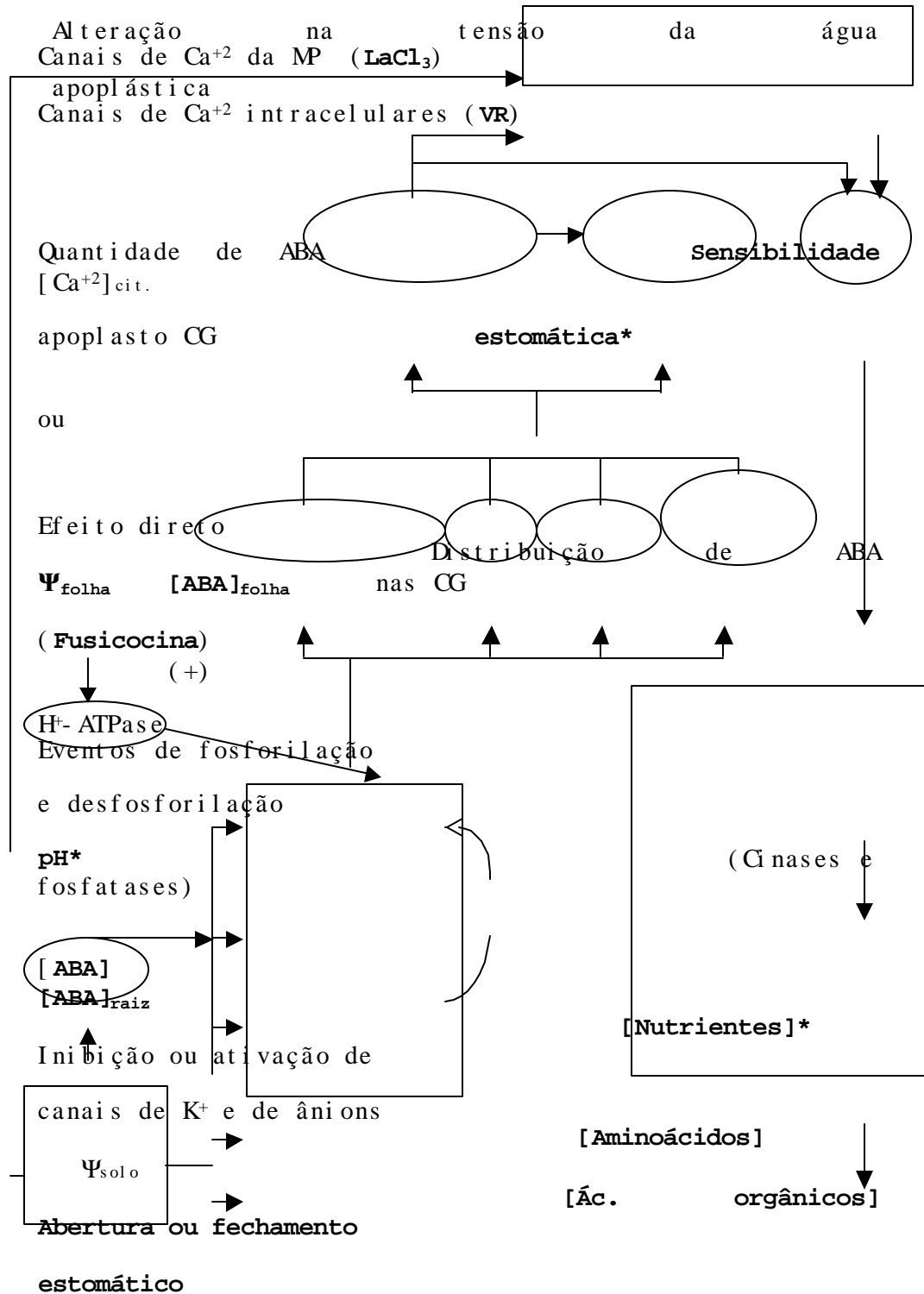
A nível de folhas destacadas e imersas em soluções, fusiocina, uma substância ativadora da H⁺-ATPase, promoveu aumento na taxa transpiratória. Além da fusiocina, cloreto de lantânio e vermelho de rutênio (inibidores de canais de cálcio da membrana plasmática e intracelulares, respectivamente), promoveram inibição nas respostas estomáticas ao ABA exógeno. A adição de ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares-álcoois e putrescina à solução de imersão alteraram o comportamento estomático e os efeitos podem ser mediados por alterações no pH da seiva do xilema ou por efeitos osmóticos (Patonnier *et al.*, 1999).

O aumento do pH do apoplasto/xilema altera a distribuição de ABA entre os vários compartimentos celulares, mantendo-o no compartimento mais alcalino, permitindo que uma maior concentração de ABA alcance, ou seja mantido, no apoplasto circundante às células-guarda. O pH mais alcalino, por si, pode alterar o

estado hídrico foliar (Wilkinson *et al.*, 1998). Além disso, alterações nos níveis de nutriente, principalmente nitrato, cálcio e fosfato e pH da seiva, aumenta a sensibilidade estomática ao ABA do xilema. A H⁺-ATPase da membrana plasmática pode estar envolvida na rota de transdução, através da alteração do pH apoplástico. Alterações gerais na composição da seiva xilemática podem apresentar efeitos diretos sobre as células-guarda.

As alterações nas respostas estomáticas na presença de cloreto de lantânio e vermelho de rutênio podem indicar que, em tomateiro submetido a déficit hídrico induzido por PEG 6000, o fechamento estomático promovido por ABA pode ser precedido por um aumento na concentração de cálcio citossólico, comportamento observado em algumas espécies (Mansh *et al.*, 1990). Após o aumento na concentração do cálcio citossólico, eventos de fosforilação e desfosforilação, mediados por proteínas cinases e fosfatases, respectivamente, promovem a ativação e/ou inibição dos canais de potássio e aniônicos das células-guarda, culminando com o fechamento estomático (Cousson e Vavasseur, 1998). Alteração na tensão da água apoplástica, resultante do estresse, também é sugerida alterar atividades dos canais de cálcio e aumentar a concentração de cálcio citossólico (Netting, 2000), promovendo o fechamento estomático.

As supostas interações entre as alterações de constituintes da seiva xilemática, decorrentes do déficit hídrico, ou manipuladas, e as respostas estomáticas estão esquematizadas no Diagrama 1.



SOLO
PARTE AÉREA

XILEMA

Diagrama 1. Interação entre alterações no potencial hídrico do solo, constituintes da seiva do xilema e respostas estomáticas. As palavras em **negrito** indicam os possíveis pontos na rota sinalizadora que foram analisados e/ou manipulados nos experimentos. CG = células-guarda; MP= membrana plasmática; LaCl₃= cloreto de lantânio; VR= vermelho de rutênio; **[Ca⁺²]_{cit}**= concentração de cálcio livre citossólico.

CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições em que foram desenvolvidos os experimentos, pode-se concluir que o pH da seiva do xilema de tomateiro varia com a época do ano, e que as alterações no pH, nutrientes minerais, ácidos orgânicos, aminoácidos e açúcares-álcoois da seiva do xilema influenciam as respostas estomáticas.

As alterações dos componentes xilemáticos de plantas submetidas a déficit hídrico, induzido pela adição de PEG 6000 à solução de cultivo, dependem da intensidade e duração do estresse, uma vez que em plantas submetidas a estresse induzido de forma rápida (horas após a PEG 6000 à solução de cultivo) ocorreu aumento na concentração de ABA, nutrientes minerais e no pH da seiva xilemática. Por outro lado, em plantas submetidas a estresse lento (dias após a adição de PEG 6000 à solução de cultivo), o pH da seiva não foi alterado e a magnitude de aumento na concentração de ABA foi menor. A sensibilidade estomática ao ABA do xilema, em plantas inteiras e em folhas destacadas, aumenta com o aumento nos níveis de nitrato e fosfato no fluxo transpiratório.

Tomando juntos esses resultados, com os obtidos utilizando inibidores de canais de cálcio, pode-se inferir que, em tomateiro submetido a déficit hídrico induzido por PEG 6000, as respostas estomáticas ao ABA podem ser mediadas por uma rota de transdução de sinais dependente de cálcio. A inibição da taxa transpiratória na presença de cloreto de lantânio e vermelho de rutênio pode indicar que o fechamento estomático é precedido por um aumento na concentração de cálcio citossólico. A fonte

de cálcio parece ser, principalmente, extracelular, uma vez que a magnitude do efeito do cloreto de lantânio (inibidor de canais de cálcio da membrana plasmática) foi maior, em relação ao vermelho de rutênio (inibidor de canais intracelulares).

Além disso, a alteração no pH apoplástico pode funcionar como um sinal para a folha da redução na disponibilidade hídrica na raiz, influenciando a distribuição de ABA entre os vários compartimentos celulares e, conseqüentemente, a quantidade de ABA que alcança o apoplasto das células-guarda. Considerando que a fusiococina inibiu os efeitos do ABA sobre a transpiração, a H^+ -ATPase da membrana plasmática pode está envolvida na rota de transdução, através da alteração do pH apoplástico. Além da H^+ -ATPase, as alterações de constituintes minerais e orgânicos da seiva xilemática, decorrentes do estresse, podem influenciar o pH apoplástico. Tanto o pH como os nutrientes minerais podem também alterar a sensibilidade estomática das células-guarda ao ABA presente no apoplasto.

É possível que nessa espécie, tanto o cálcio como a H^+ -ATPase estejam envolvidos na rota de sinalização que leva ao fechamento estomático.

