

Indução de stress de dessecação em folhas de sombra e de sol de *Fragaria vesca* e análise das suas respostas fisiológicas

João Vidigal, Nuno Domingues, Nuno Gonçalves, Raquel Alves e Rui Palhinhas

Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Ed.C2, 1749-016 Lisboa, Portugal

Entregue a 22 de Janeiro de 2010

O efeito do stress abiótico já é conhecido em diversas plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*. Neste trabalho pretendeu-se estudar a resposta fisiológica de uma espécie não-modelo, *Fragaria vesca*, a um stress hídrico enquanto stress primário. Isto foi efectuado em plantas aclimatadas a diferentes níveis de radiação que exibem diferentes características fisiológicas e morfológicas, pretendendo-se analisar as diferentes respostas para as plantas de sol e de sombra, bem como submetê-las ao mencionado stress hídrico, induzindo-se a sua desidratação. Observou-se uma grande complexidade da resposta das plantas ao tipo de stress induzido, muitas vezes interligadas, que provocam danos celulares causados por stress secundário, como stress osmótico e oxidativo. Os sinais de stress inicial - efeito osmótico e iónico, mudanças e fluidez da membrana - desencadeiam o processo a jusante da sinalização e controle da transcrição. Estes activam mecanismos de resposta ao stress para restabelecer a homeostase de modo a proteger e reparar as proteínas e membranas danificadas. Uma resposta inadequada a um ou a vários passos na sinalização e activação dos genes podem resultar na alteração irreversível da homeostase celular e na destruição de proteínas funcionais e estruturais, levando à morte celular. Os resultados evidenciados neste estudo clarificam o modo como estas plantas reagem à perda de água, permitindo a elucidação dos mecanismos de adaptação envolvidos nesta resposta.

INTRODUÇÃO

O stress afecta todos os organismos vivos e pode ser definido como uma influência desvantajosa no organismo influenciando factores tão importantes como o crescimento e a sua própria sobrevivência. A capacidade de tolerar o stress depende, em parte, da sua capacidade evolutiva e genética para adaptação, e por outro lado da sua história de vida individual (Mühlenbock, 2006). As plantas, devido à sua constituição, estão impossibilitadas de escapar ao stress ambiental e estão por isso em constante risco de sucumbirem a um ou a vários factores de stress. Ao longo da sua vida, estão expostas a uma grande variedade de condições de stress, e sobreviverem, têm que se de adaptar modificando o seu metabolismo, anatomia e morfologia. Essa capacidade de adaptação aos inúmeros stresses, limita, no entanto, a capacidade de crescimento e habilidade de competir em ambientes favoráveis. (Wang *et al.*, 2001; Waring, 2004). Por esse mesmo motivo, as células das plantas no ambiente natural integram uma variedade de sinais de stress em concordância com os processos metabólicos, de forma a tornar mais eficiente e controlada a sua resposta de acordo com as condições existentes (Mühlenbock, 2006). Podem inclusivamente alterar a sua bioquímica para tolerar um stress particular que ocorre raramente, mas o custo metabólico é muito alto para uma mudança de ajuste temporário. O que acontece é que a frequente exposição a stresses particulares leva a mecanismos de defesa que podem permanentemente mudar a fisiologia, anatomia e morfologia de uma planta (Waring, 2004).

Um bom controlo da homeostasia celular é altamente necessária de maneira a prevenir uma sobrecarga de espécies reactivas de oxigénio (ROS), provocada por stresses ambientais. É também

crucial para a planta que a regulação inter e intracelular do metabolismo e das vias de sinalização estejam em sintonia e que as respostas específicas sejam rápidas e precisas. De maneira a fazer face a todos estes desafios, as defesas das plantas e respostas de aclimação dependem dos mecanismos de sinalização de hormonas, ROS e outras substâncias de sinalização específicas de plantas (Mühlenbock, 2006).

O stress abiótico é a primeira causa de perdas em colheitas a nível mundial, chegando a reduzir os rendimentos médios das maiores culturas em mais de 50% (Boyer, 1982; Bray *et al.*, 2000). Este leva a uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares que afectam negativamente o crescimento e produtividade das plantas (Wang *et al.*, 2001). Stress hídrico, excesso de salinidade, temperaturas extremas e stress oxidativo estão normalmente interligados e podem induzir danos celulares semelhantes. Por exemplo, o stress hídrico e o excesso de salinidade manifestam-se primariamente como stress osmótico, resultando numa disrupção da homeostasia e distribuição iónica no interior da célula (Zhu *et al.*, 1997; Serrano *et al.*, 1999). Também o stress oxidativo, que acompanha frequentemente os stress abióticos, causa perturbações via desnaturação de proteínas funcionais e estruturais (Smirnov, 1998). Como consequência, estes diversos tipos de stress ambiental geralmente activam vias de sinalização (Knight e Knight, 2001) ou respostas celulares, como a produção de proteínas de stress, regulação de anti-oxidantes e acumulação de solutos compatíveis. (Zhu *et al.*, 1997; Cushman e Bohnert, 2000).

O vulgo morangueiro-selvagem, *Fragaria vesca*, pertencente à família das Rosaceae, é uma planta herbácea, diplóide e rasteira, com folhas compostas por três folíolos verdes e pilosos, de margens dentadas. A floração é branca ou rosada e depois de polinizada por abelhas, dá lugar ao morango, um receptáculo floral desenvolvido que contém nele os verdadeiros frutos, pequenos pontos negros ou verdes, designados de aquénios (Castroviejo *et al.*, 2001). A sua distribuição global vai da costa oeste do norte da América passando por vários países europeus, crescendo muitas vezes na sombra parcial de florestas perenifólias, de pinheiros ou de coníferas. Para plantação artificial, os morangueiros devem ser mantidos em zonas com grande exposição ao sol após o início das primeiras chuvas do ano. Assim estas plantas ficam com folhas e flores mais pequenas, comparativamente com morangueiros plantados em zonas de sombra, mas os seus receptáculos são notavelmente maiores (Turhan e Kargi, 2007). De momento a família das Rosaceae está a ser estudada a nível genómico, incluindo o morangueiro (Slovin *et al.*, 2009) e seus respectivos híbridos, inclusivamente o *Fragaria xananassa*, o mais usado a nível mundial para produção do morango (Turhan e Kargi, 2007). Estes estudos do genoma do morangueiro serão cruciais para a compreensão dos efeitos dos vários stresses abióticos exercidos sobre ele, visto que poderão fornecer informação necessária a aumentar a produtividade da sua cultura.

Os stresses abióticos mais importantes enquanto factores limitantes do crescimento e desenvolvimento desta planta, são o stress salino e o stress de frio, que podem causar notáveis alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares e assim afectar drasticamente a sua produtividade. Já foram estudados alguns genes que desempenham um papel crucial na tolerância ao stress, nomeadamente pela identificação de proteínas por ele reguladas, as quais incluem a betaína-aldeído desidrogenase (BADH), proteínas abundantes em embriogénese tardia (LEAs), o factor transcrricional induzido pelo frio (CBF1) e a proteína anti-congelação (AFP). Plantas transgénicas com os genes descritos tinham activação constitutiva de resposta a stresses salinos e de congelação. Mais recentemente foi descrita a WCOR410, uma proteína da família das desidrinas ácidas, que terá um papel fundamental na destabilização da membrana plasmática durante stress hídrico e de frio e será determinante na resistência celular a congelação. Estudos feitos com plantas transgénicas que expressavam o gene *Wcor410* mostram que tinham uma tolerância de 5°C a mais do que as plantas do tipo selvagem e estirpes que não o expressavam. Tal sugere que este gene está envolvido na crioprotecção da membrana plasmática contra stress de congelação (Qin *et al.*, 2008).

O objectivo deste estudo foi a aplicação dos conhecimentos da fisiologia vegetal e ecofisiologia dedicados essencialmente às respostas ao stress hídrico e oxidativo numa espécie não-modelo, com indivíduos aclimatados tanto a condições de alta irradiação como a indivíduos aclimatados a ensombramento contínuo, com interesse académico e potencialmente económico.

MATERIAL E MÉTODOS

Determinação de características morfológicas: Foram utilizadas plantas envasadas expostas a stress durante uma semana para determinação do potencial hídrico das folhas, através da Bomba de Scholander e no que respeita à medição das restantes características, foi utilizado o porómetro de vapor de água (LI-1600). Os procedimentos utilizados foram efectuados de acordo com os protocolos fornecidos pela docente nas aulas práticas. Foram ainda utilizadas plantas expostas a stress rápido em que as medições dos parâmetros a estudar foram igualmente medidos com o porómetro de vapor de água (LI-1600), procedendo-se de acordo com o protocolo fornecido.

Medições de reflectância em folhas: No que respeita à medição das reflectância esta foi efectuada com um espectrofotómetro portátil UniSpec-SC Enclosure Spectral Analysis System, utilizado para trabalhos de campo e tal como anteriormente o procedimento efectuou-se de acordo com os protocolos fornecidos na aula. As medições das variáveis ambientais necessárias para se medir as condições de conforto térmico, que ocorreram no local onde se encontravam os exemplares da espécie em estudo, foram obtidas com o uso do equipamento “HOBO Pro-séries” fabricado pela Onset Computer Corporation.

Condutividade: Os passos para a realização desta experiência foram executados de acordo com o protocolo fornecido pelo docente nas aulas práticas.

Deteção qualitativa de H₂O₂ (coloração com DAB): Procedeu-se como descrito no protocolo fornecido.

Determinação da peroxidação lipídica através do método com MDA: Os passos para a realização desta experiência foram executados de acordo com o protocolo fornecido pelo docente nas aulas práticas, excepto na maceração das folhas do grupo 3 que foram maceradas em etanol, sem se ter adicionado azoto líquido.

Determinação da concentração de sacarose: Os procedimentos para a determinação do conteúdo foliar em sacarose após a indução de stress de dessecação, foram os descritos no protocolo fornecido, exceptuando nas quantidades das várias amostras para medição da absorvância. Aquando da evaporação do etanol, não se diluiu a amostra em água, sendo a amostra utilizada directamente para medição da absorvância. Os volumes totais após evaporação do etanol foram de 1mL, excepto para 3 replicados das plantas de sol em que o etanol foi evaporado até aos 0,5 mL. Posteriormente aqueceu-se a 80°C, durante 8 minutos e arrefeceu-se rapidamente as amostras. Leu-se então as absorvância a 420 nm. Foram utilizados 100 µL para medição da absorvância nas amostras de sol, e 50 µL para as amostras de sombra. Na determinação da curva de calibração pelo método do resorcinol, colocou-se 0,1 mL amostra, contendo uma concentração conhecida de sacarose entre 5 e 50 mM, à qual se adicionou 0,25 mL de resorcinol e 0,75 de ácido clorídrico (HCL 30%). Aqueceu-se também a 80°C, durante 8 minutos, arrefeceu-se rapidamente as amostras e leu-se então as absorvância a 420 nm.

Análise da expressão do gene *rd29A* (RT-PCR): Procedeu-se como indicado no protocolo, utilizando-se RNA extraído de *Arabidopsis thaliana*, visto os RNAs extraídos de *Fragaria vesca* terem ficado degradados.

Fluorescência modulada: Procedeu-se de acordo com o protocolo, com as seguintes alterações: recolheu-se um folíolo de morangueiro e pesou-se, após as medições pesou-se novamente o folíolo, o qual foi deixado posteriormente ao ar (stress hídrico). Repetiram-se os passos 1 a 3 duas vezes.

Fluorescência JIP: Procedeu-se de acordo com o protocolo, com as seguintes alterações: após a aplicação do pulso de luz saturante pesaram-se novamente as amostras. Após as pesagens, as amostras foram deixadas ao ar (stress hídrico). Repetiram-se os passos 1 a 5 periodicamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ecofisiologia: É importante ter presente que a transpiração reflecte a influência das condições atmosféricas, das disponibilidades hídricas do solo, da estrutura física da folha, de características morfológicas e mecanismos de resposta fisiológica que controlam a perda de água pelas folhas (Calder, 1990). O processo fisiológico da transpiração é exercido através de regulação da abertura estomática em resposta às condições ambientais (luz, temperatura, humidade do ar e défices hídricos junto ao sistema radicular), depende da evaporação que se processa na interface folha/atmosfera e do abastecimento hídrico desta, função do gradiente de potencial e da resistência hidráulica total entre o solo e a folha (Jarvis, 1980).

A determinação da radiação fotossinteticamente activa (PAR) disponível é essencial em diversas aplicações, devido ao seu papel na fotossíntese e noutros processos das plantas, a medições da PAR são usadas para caracterizar o crescimento e a morfologia das plantas (Carter *et al.*, 1992), para estimar a competição (Cannel e Grace, 1993), bem como para avaliar interacções entre elas. A intensidade da radiação solar que atinge a superfície terrestre é variável de acordo com as condições atmosféricas, mas cerca de metade da radiação está na região espectral de aproximadamente 380 a 780 nm que os humanos apreendem como luz visível (Daubenmire, 1974).

O défice de pressão de vapor de água entre o interior da folha e o ar externo (VPD) é um importante factor ambiental que afecta o funcionamento estomático, está também intimamente ligado com a transpiração, e é uma medida recentemente encontrada para medir as consequências microclimáticas de estufas, como também é utilizado para avaliar doenças, potencial de condensação e necessidades de irrigação de determinada planta, sendo assim uma potencial ferramenta para a medição de afecções consequentes de stress hídrico.

As condições hídricas estão muito relacionadas aos processos fisiológicos de grande importância para as plantas. Processos como transpiração, fotossíntese, respiração e crescimento são muito influenciados pelas mudanças ocorridas no estado hídrico das folhas (Hsiao, 1973). A extensão dos efeitos do défice hídrico nas espécies vegetais depende da sua intensidade e da duração da capacidade genética das plantas em responder às mudanças do ambiente (Chaves, 1991).

A radiação solar que atinge as folhas é parcialmente reflectida e parcialmente absorvida, sendo a restante transmitida. A reflectância de uma folha abrange a luz reflectida pela superfície da folha e a radiação que se dispersa a partir do interior da folha. Assim, esta vai depender da constituição da superfície da folha (se tem pêlos por exemplo) ou mesmo do seu estado hídrico (Theno, 2002).

A estimativa de parâmetros biofísicos de determinadas tipologias vegetais tem sido estudada através de modelos de reflectância, que incluem tanto variáveis ambientais como da planta em estudo. De entre essas variáveis destaca-se a reflectância espectral das folhas, que é considerada de grande importância devido aos resultados que têm vindo a ser obtidos e por isso é determinada com um significativo grau de confiança (Ponzoni *et al.*, 2007).

Medidas de reflectância ao nível das folhas podem ser utilizadas para avaliar alterações ao nível do conteúdo hídrico, capacidade fotossintética e *status* oxidativo, induzidas por stress hídrico, radiação e temperaturas elevadas, podendo ser calculados vários índices de reflectância (Correria, 2009). Embora seja necessário, para facilitar o estudo, tratar cada stress separadamente, na natureza eles não ocorrem isoladamente e influenciam-se mutuamente.

Características morfológicas: Comparando as plantas de sol com as de sombra, encontram-se algumas diferenças na sua morfologia. Destas diferenças, a área foliar é onde se observa a maior diferença: nas plantas de sombra a área é quase 5 vezes superior à das plantas de sol. O peso fresco e seco têm também uma diferença elevada entre os dois tipos de planta, mas neste caso a diferença é menos acentuada, nas plantas de sombra os pesos são quase 3 vezes superiores. Para além destas diferenças bastante acentuadas, há outras mais ligeiras. A espessura da folha apenas difere em 10 mm, sendo também as plantas de sombra as mais espessas. Pelo contrário, o teor hídrico relativo (RWC) das folhas nas plantas de sombra é quase 3 vezes inferior às de sol. Quanto à área foliar específica (SLA), a diferença é praticamente inexistente. No número de

estomas por campo, existem mais nas plantas de sol na página inferior, não havendo nestas plantas nenhum estoma na página superior, mas a diferença para as plantas de sombra é baixa, tanto na página inferior como na superior. Na densidade estomática observam-se diferenças superiores ao transpor o n.º de estomas da área do campo para a área foliar.

Tabela1 – Comparação de diferentes características morfológicas entre plantas de sol e sombra. As letras a) e b) indicam se existem diferenças nos parâmetros entre os dois tipos de folhas.

Habitat	Área folha (cm ²)	Espessura (mm)	Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)	Teor hídrico relativo (%)	SLA (cm ² /mg)	Clorofila (SPAD)
SOL	5,00 ± 0,84 a)	285 ± 21,21 a)	75,07 ± 13,45 a)	20,23 ± 0,83 a)	72,51±4,82a)	0,25 ± 0,02	25,73 ± 2,11 a)
SOMBRA	14,41 ± 0,73 b)	286 ± 41,16 a)	223,24 ± 8,15 b)	56,48 ± 2,69 b)	74,80±1,79a)	0,26 ± 0,00	37,96 ± 0,54 b)

Tabela 2- Comparação de diferentes características morfológicas entre plantas de sol e sombra. As letras a) e b) indicam se existem diferenças nos parâmetros entre os dois tipos de folhas.

Habitat	Nº de estomas/campo		Densidade estomática (nº/mm ²)	
	Pág. inferior	Pag. superior	Pág. inferior	Pág. superior
SOL	20,73 ± 0,47 a)	0,00 ± 0,00 a)	126,75 ± 2,81 a)	0,00 ± 0,00 a)
SOMBRA	16,0 ± 8,20 a)	1,03 ± 1,27 b)	100,62 ± 51,60 b)	6,50 ± 8,01 b)

As diferenças morfológicas verificadas nos dois tipos de plantas devem-se essencialmente às diferentes condições existentes nos dois habitats (sol e sombra). As plantas necessitam de luz para realizarem a fotossíntese e o que se verificou foi que as plantas em condições de pouca luz (sombra) desenvolveram adaptações a esta carência. A área foliar aumentou cerca de 5 vezes e com este aumento de área, aumentou também o peso, neste caso em cerca de 3 vezes, comparativamente com as plantas de sol (como observado noutra espécie por Fahl *et al.*, 1994).

O teor hídrico relativo é semelhante nas plantas de sombra e nas plantas de sol. A espessura da folha é ligeiramente superior nas folhas de sombra, contrário ao que seria de esperar, visto que normalmente folhas sujeitas a maior radiação desenvolvem células de paliçada do mesófilo mais longas, para absorverem mais luz. No caso deste estudo, o habitats de sol e sombra estavam bastante próximos e a água disponível nos habitats seria aproximadamente a mesma. Como tal, as plantas de sombra mostraram reter tanta água como as de sol (Tabela 1), como mostra o seu RWC. Isto deverá ser explicado como um mecanismo de retenção da água nas plantas de sol, como defesa à elevada irradiação, beneficiando com o menor número de estomas presentes e à sua presença apenas na página inferior, e ao inventual o fecho dos estomas mais frequentemente.

Um sinal claro da adaptação das plantas de sombra é as diferenças ao nível do número de estomas. As plantas de sol, contrariamente às de sombra, continham um grande número de estomas na página inferior e, conseqüentemente, uma densidade estomática também elevada. Na página superior, as plantas de sol não possuíam nenhuns estomas, enquanto as de sombra continham, em média, 1 estoma por campo de observação (cerca de 0,16 mm²) (Tabela 2).

As plantas de sol, sujeitas a uma maior incidência solar, desenvolveram como adaptação uma estratégia para se protegerem do excesso de luz que aumentaria a transpiração pelo aumento de calor provocado pela radiação – os estomas encontram-se apenas na página inferior, a qual recebe significativamente menos luz que a página superior; as plantas de sombra não necessitam de reduzir o número de estomas – têm menos estomas na página inferior e mais na página superior, visto que não têm necessidade de evitar tanto a transpiração e podem então manter o maior número de estomas e o seu maior tempo de abertura para maior captação de carbono e transpiração.

Análise dos factores ambientais (HOBO): Foram analisados vários factores abióticos envolvidos no crescimento da espécie em estudo. Na Fig.1 estão indicados os valores da humidade relativa, temperatura do ar, temperatura do solo e radiação fotossinteticamente activa (PAR) durante um período de 24 horas.

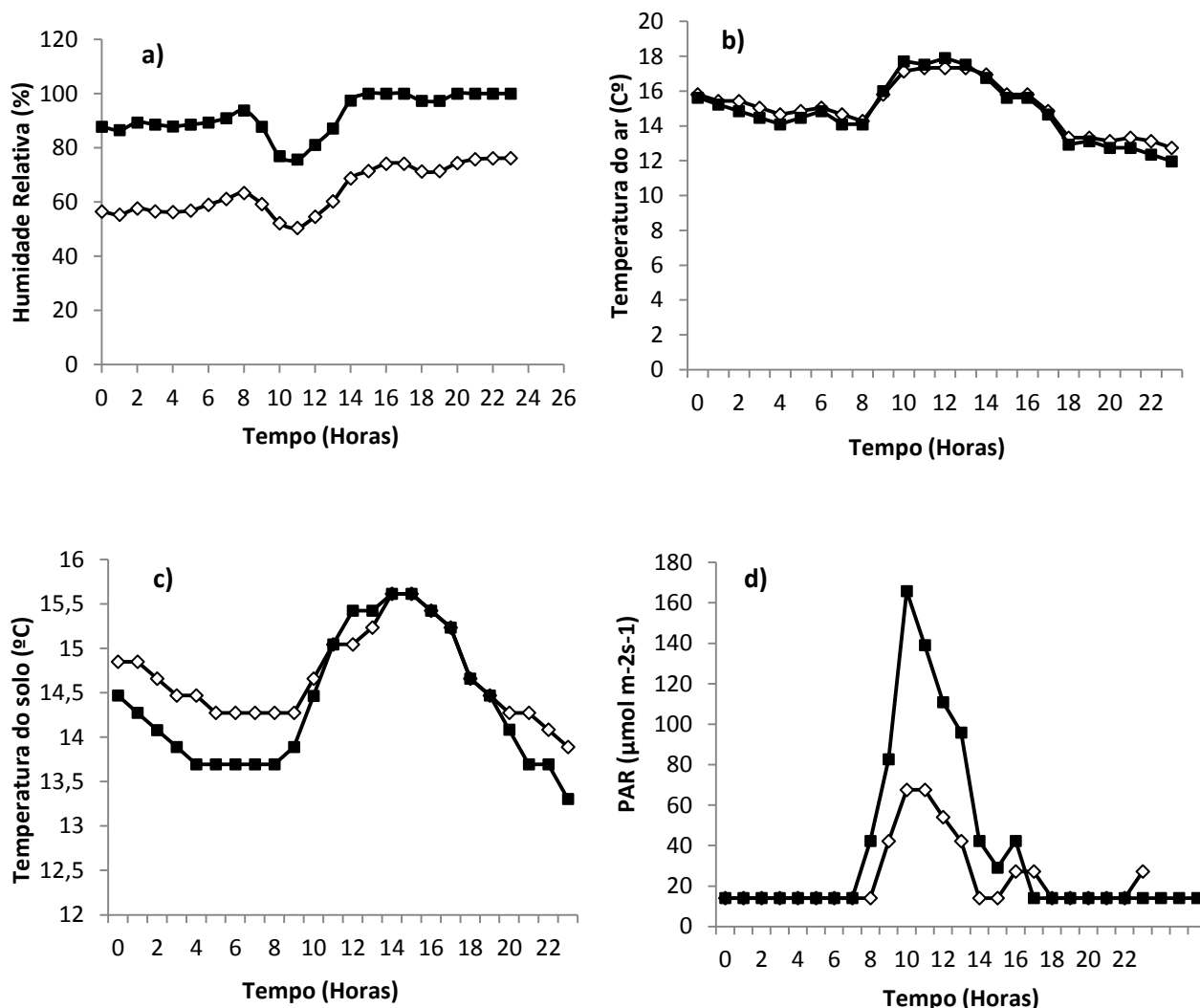


Figura 1- Avaliação dos parâmetros do local de crescimento de *Fragaria vesca* através do “HOBO”, ao longo de 24 horas. Folhas de sombra (—◇—) e de sol (—■—). a) Humidade Relativa(%), b) Temperatura do ar (C°), c) Temperatura do solo (C°) e d) radiação fotossinteticamente activa, PAR (μmol m⁻²s⁻¹).

Na Fig.1a é possível observar a variação da humidade relativa ao longo do dia e verifica-se que tanto para as folhas de sol como para as folhas de sombra esta percentagem é constante, desde a meia-noite até por volta das 8 horas da manhã. A partir desta hora até por volta das 11 horas ocorre um decréscimo da mesma, voltando a subir novamente por volta das 12 horas e até as 15 horas. A partir das 14 horas o valor de humidade relativa permanece constante, no limiar dos 100% até às 23 horas, onde volta depois a diminuir ligeiramente. É ainda possível observar que a percentagem de humidade relativa para as folhas de sol é mais elevada que a das folhas de sombra, ocorrendo sempre entre as duas uma diferença de aproximadamente 22,5%, que se mantém constante ao longo de todo o tempo.

Uma menor humidade relativa provoca um fecho hidropassivo dos estomas (Taiz e Zeiger, 2002), resultante da perda de turgor das células guarda, em condições de stress hídrico. Portanto a ocorrência de maior humidade na zona das plantas de sol poderá ser compensada pela diminuição do número de estomas e pela sua ausência na página superior das folhas, que permitirá uma maior retenção de água, visto que haverá maior fecho passivo dos estomas e consequentemente menor

transpiração. Noutros casos o fecho dos estomas é hidroactivo, em que a concentração de solutos nas células guarda diminui após a acção do ácido abscísico (ABA), que provocará a saída de água e perda de turgor, levando ao fecho estomático.

No que respeita à Fig.1b pode observar-se o valor da temperatura do ar, também ao longo de 24 horas. Este valor é bastante idêntico nos dois tipos de folhas (sol e sombra), sendo que entre as 16 e as 9 horas (período da noite) o valor da temperatura é mais baixo que nas restantes horas do dia, entre as 10 e as 15 horas, no qual se observa um aumento da temperatura do ar.

Na Fig.1c é estudada a variação da temperatura do solo e observa-se que esta é também bastante linear entre as folhas de sol e sombra, sendo que as folhas de sombra apresentam uma temperatura um pouco mais elevada que as de sol entre o período das 19 às 9 horas da manhã. A partir desta hora observa-se uma sobreposição das duas rectas o que significa que durante o período entre as 10 e as 19 horas do dia o valor da temperatura do solo é igual tanto para as folhas de sol como para as folhas de sombra. Portanto a temperatura do ar e do solo não influenciará as diferenças das aclimações dos dois tipos de plantas.

A radiação fotossinteticamente activa é observada através da Fig.1d que esta só apresenta valores significativos a partir do período entre as 6h e as 16 horas, sendo que se observa um aumento da mesma das 6h até ao meio dia começando a então a diminuir.

Após um estudo mais específico dos factores ambientais a que as plantas estão sujeitos (variação dos parâmetros estudados durante 24 horas) procedeu-se a uma análise mais geral dos mesmos. A Fig.2 resume os valores dos parâmetros obtidos, fazendo-se uma comparação média geral entre as plantas de sol e sombra durante os 5 dias de estudo.

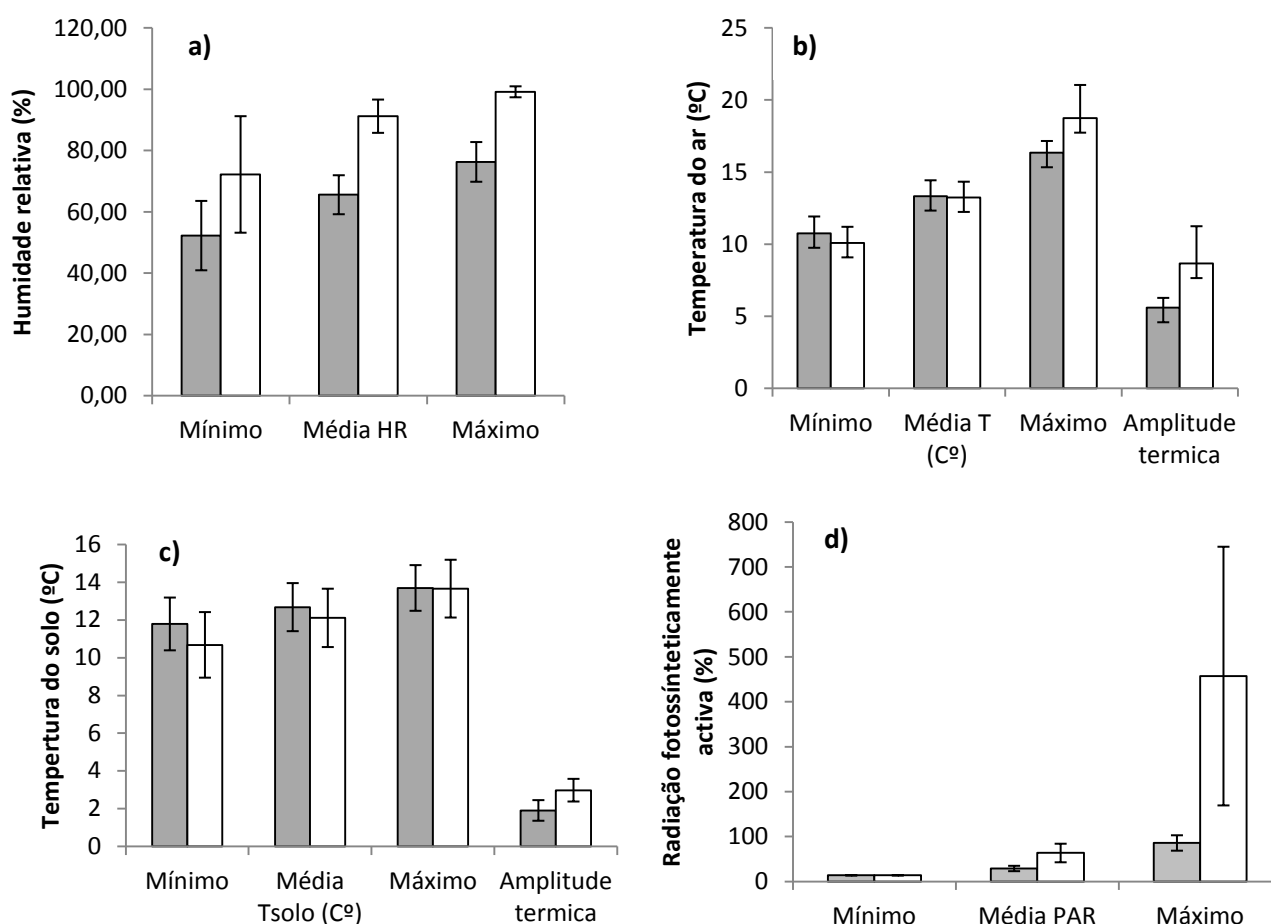


Figura 2- Avaliação dos parâmetros do local de crescimento de *Fragaria vesca* através do “HOB0” durante os 5 dias de estudo. a) Humidade Relativa(%), b) Temperatura do ar (C°), c) Temperatura do solo (C°) e d) Radiação fotossinteticamente activa -PAR ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Para cada um dos parâmetros indicados é feita a comparação entre a média, máximo e mínimo dos valores obtidos para cada folha (sol □ e sombra ■).

Na Fig.2a está indicada média da variação da humidade relativa correspondente às plantas de sol e sombra e observa-se que os valores são superiores para as plantas de sol que apresentam uma média que ronda os 91,23% enquanto plantas de sombra apresentam um valor médio de 65,62%. Verifica-se ainda que nas plantas de sol a humidade relativa atingiu um valor máximo de quase 100% e um mínimo de 72%, enquanto as plantas de sombra chegaram apenas aos 76% de máxima e 52 % de mínima.

Na Fig.2b podemos observar que os valores da temperatura do ar são bastante aproximados nos dois tipos de plantas, apresentando as plantas de sombra um valor ligeiramente superior (13,33°C), em relação ao das plantas de sol (13,24°C). Verifica-se ainda que a variação da amplitude térmica entre os valores máximos e mínimos varia entre os 5°C, nas plantas de sombra e os 8°C nas plantas de sol.

No que respeita à temperatura do solo (Fig.2c) as diferenças são, tal como anteriormente, muito pouco significativas, observando-se que para plantas de sombra este valor é ligeiramente superior (12,67°C) em relação às plantas de sol (12,10°C), e as variações de amplitude térmica entre os valores máximos e mínimos são também bastante baixas, 1,9°C para plantas de sombra e 3°C para plantas de sol.

Os valores de radiação fotossinteticamente activa estão indicados na Fig.2d, e como é possível observar são de entre todos os que apresentam maiores diferenças entre plantas de sol e sombra, sendo mais elevados nas plantas de sol ($63,70 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e para plantas de sombra apresentam um valor bastante mais baixo ($20,22 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Observa-se ainda que os valores mínimos para ambas as folhas são exactamente iguais ($14 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), o contrário acontece para os valores máximos onde se observa uma enorme discrepância entre folhas de sol e sombra, as quais apresentam valores de $287,7 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $86,0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente.

Os valores obtidos para as condições ambientais são bastante coerentes e estão todos relacionados entre si. De acordo com Parkhurst *et al.* (1972), a variação da temperatura do ar é determinada de acordo com o balanço da radiação solar incidente na superfície do solo e na folha, sendo esta radiação absorvida por ambos. Este facto corrobora os resultados obtidos, que indicam que o valor da temperatura do ar é mais elevado precisamente no mesmo período de tempo em que a radiação fotossinteticamente activa é mais elevada.

Durante a noite o balanço de radiação é negativo ocorrendo perda de calor para a atmosfera e consequentemente das superfícies do solo e das folhas, o que provoca uma perda de calor da camada de ar com a qual estão em contacto, ou seja, ocorre uma diminuição da temperatura do ar.

A humidade relativa é um factor que também varia bastante durante o dia, sendo que a maior percentagem de humidade relativa ocorre durante a noite e madrugada. Este facto é explicado devido a proporcionalidade inversa existente entre este dois factores, ou seja quando mais alta é a PAR mais baixa é a humidade relativa no local (Daubenmire, 1974), o que confirma os valores obtidos na Fig.2a.

Como seria de esperar à medida que a radiação fotossinteticamente activa aumenta, a temperatura do ar e do solo tornam-se também mais elevadas e consequentemente a humidade relativa do ar no local vai baixando. Esta diminuição na humidade relativa ajudará ao já referido fecho hidropassivo dos estomas, particularmente nas plantas de sol que ajudará a uma retenção de água neste período. As plantas de sombra apresentam valores mais baixos de PAR o que explica que tenham valores mais baixos de temperatura e consequentemente humidades relativas mais baixas em relação às plantas de sol.

Relação do défice de pressão de vapor com a transpiração e condutância estomática em plantas submetidas a stress rápido: Medições altas de VPD significam que o ar tem uma maior capacidade de contenção de água, estimulando a transpiração da planta nestas condições de baixa humidade. Medição baixas por outro lado, significam que o ar está perto da saturação o que indica que não poderá receber mais humidade das folhas (Prenger e Ling, 2009). Fomos então comprovar

tais asserções na nossa experiência com *Fragaria vesca*, avaliando os parâmetros de transpiração; déficit de pressão de vapor, condutância estomática e água perdida (Tabela 3).

Tabela 3 – Dados experimentais obtidos com a utilização do porômetro em folhas de sol e folhas de sombra submetidas a stress rápido. Comparação dos diferentes parâmetros (Hr - humidade relativa; Tr – Transpiração; G – condutância estomática; VPD – Déficit de Pressão de Vapor). Um $p < 0,05$ indica diferenças significativas entre os valores de sol e sombra. As letras a) e b) indicam se existem diferenças nos parâmetros entre os dois tipos de folhas.

Habitat	VPD (mbar/bar)	Tr ($\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	G ($\text{mmol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	HR (%)
Sol	10,26 $\pm$ 1,89 a)	0,54 $\pm$ 0,17 a)	0,03 $\pm$ 0,01 a)	59 $\pm$ 1,41 a)
Sombra	12,03 $\pm$ 0,59 a)	0,53 $\pm$ 0,21 a)	0,03 $\pm$ 0,02 a)	58 $\pm$ 0,00 a)
<i>t-student</i>	0,17	0,47	0,41	-

Através da análise da Tabela 3 é possível verificar a relação de diferentes parâmetros acima referidos entre folhas de sol e sombra sujeitas a stress rápido. Verifica-se que a média do déficit de pressão de vapor, apesar de não muito significativa ($p=0,17$), é mais elevado em plantas de sombra do que em plantas de sol (12,03 mbar/bar e 10,26 mbar/bar respectivamente). O mesmo acontece para as variações da transpiração dos dois tipos e folhas, nas quais se verifica um maior valor de transpiração nas plantas de sol ($0,54 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$) em relação as plantas de sol ($0,53 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$), esta diferença é muito pouco significativa tal como indicado pelo valor de $p=0,46$.

A condutância estomática ao contrário das anteriores apresenta os mesmos valores tanto para folhas de sombra como para folhas de sol ($0,03 \text{mmol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Em ambos os casos, a humidade relativa do ar não varia muito, sendo que se apresenta superior nas plantas de sol (59%) em relação a plantas de sombra (58%).

Verificou-se comparativamente uma medição de déficit de pressão de vapor superior em plantas de sombra do que em plantas de sol, revelando então que o ar na câmara do porômetro estava menos saturado em plantas de sombra. Como seria de esperar em plantas de sol a transpiração estava então comprometida pelo déficit de pressão de vapor mais baixo, possuindo também assim uma maior humidade relativa em relação às plantas de sombra.

Foi paralelamente medida a condutância estomática para verificar a sua relação com o déficit de pressão de vapor. Para diferentes valores de VPD não se verificaram alterações dos valores da condutância estomática, mantendo-se uma medição de $0,03 \text{mmol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ tanto em plantas de sol como em plantas de sombra. Em experiências anteriores tal relação nunca foi plenamente atestada, existindo muitas vezes uma isenção de resposta da condutância sob valores discordantes de VPD, e quando tal não acontece os mecanismos envolvidos continuam por explicar e replicar experimentalmente, confirmando-se então como um assunto ainda em aceso debate por parte da comunidade científica (Streck, 2003).

Tal demonstra uma possível preponderância adaptativa das plantas que crescem à sombra, com a sua transpiração e respectiva humidade relativa (inversamente proporcional) a revelarem-se menos dependentes do déficit de pressão de vapor e assim de stresses provenientes de uma humidade atmosférica elevada.

Determinação do potencial hídrico, medição de resistências estomáticas, transpiração e radiação fotossinteticamente activa em plantas expostas a stress rápido: Após uma semana de exposição ao stress hídrico, foram analisados os parâmetros acima referidos em plantas envasadas, procedendo-se à comparação entre as médias e os desvios padrão em plantas de sol e sombra.

Tabela 4- Comparação dos diferentes parâmetros (Radiação fotossinteticamente activa - PAR, Resistência estomática - Rs, Transpiração - Tr e Potencial hídrico - Ψ) em plantas de sol e sombra envasadas, após terem sido submetidas a stress híbrido durante uma semana. Com valores gerais de Humidade relativa (%) - entre os 33%, Temperatura da cuvette - 23°C, Temperatura da folha - 23°C. As letras a) e b) indicam se existem diferenças nos parâmetros entre plantas de sol e sombra. Um $p < 0,05$ indica diferenças significativas entre os valores dos dois tipos de folhas.

Habitat	PAR ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Rs (s.cm^{-1})	Tr ($\mu\text{g.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Ψ (Mpa)
Sol	9,3 $\pm$ 1,5 a)	50 $\pm$ 12,25 a)	0,28 $\pm$ 0,08 a)	0,8 $\pm$ 0,1 a)
Sombra	141,6 $\pm$ 98,9 b)	91,6 $\pm$ 9,83 b)	0,14 $\pm$ 0,015 b)	1 $\pm$ 0,26 a)
t-student	0,041	0,005	0,020	0,144

Através da Tabela 4 é possível observar a relação entre os diferentes parâmetros, relacionando folhas de sol com folhas de sombra. Os valores de radiação fotossinteticamente activa (PAR) são bastante diferentes entre cada uma das plantas, observa-se que em plantas de sombra a média dos valores ($141,6 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) é bastante superior ao das folhas de sol ($9,3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), apresentando um valor de $p = 0,041$ o que indica a diferença de valores entre as duas folhas é significativa.

No que respeita aos valores da resistência estomática (Rs) este valor é mais elevado em plantas de sombra ($91,6 \text{s.cm}^{-1}$) do que em plantas de sol (50s.cm^{-1}). $p = 0,005$ indica que existe uma diferença bastante significativa entre as folhas de sol e sombra.

Observam-se também diferenças no valor da transpiração (Tr) para as duas folhas, mas ao contrário dos parâmetros anteriormente descritos estes valores são superiores nas plantas de sol ($0,28 \mu\text{g.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$), em relação às plantas de sombra, me que se apresentam um pouco mais baixos ($0,14 \mu\text{g.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

As diferenças de potencial hídrico (Ψ) entre as duas folhas podem também ser observadas na Tabela 4 e verifica-se que estes valores encontram-se bastante próximos um do outro (0,8 Mpa para folhas de sol e 1 Mpa para folhas e sombra), facto corroborado pelo valor de $p = 0,1$ que indica que a diferença entre os valores para as duas folhas é pouco significativa. A diferença de potencial hídrico nas diferentes folhas está em conformidade com o tamanho das folhas, sendo maior em folhas de sombra, em que a folha é maior e menor em folhas de sol onde a folha é mais pequena.

No que respeita ao estudo dos parâmetros medidos através do porómetro, em plantas envasadas sujeitas a stress hídrico durante uma semana, concluiu-se que os valores de transpiração, resistência estomática e potencial hídrico são factores que dependem uns dos outros mas acima de tudo dependem do valor de PAR, sendo esta a variável independente.

A transpiração, resistência estomática e potencial hídrico são todos factores que correspondem a uma resposta, tanto ao stress aplicado anteriormente (stress hídrico), como ao tipo de aclimação e radiação sujeitas. Como tal, para plantas de sombra observou-se grandes níveis de radiação, uma grande resistência estomática de quase 92s.cm^{-1} , de maneira a evitar a perda de água por transpiração, principalmente aquando de um stress hídrico.

A análise dos dados da transpiração e da resistência estomática confirmam exactamente isso, a correlação existente entre estes dois factores, sendo a variável dependente a transpiração (Damalga *et al.*, 2006). Já em plantas aclimatadas ao sol verifica-se que a radiação a que são submetidas é mais baixa, facto não expectável, mas fazendo com que a resistência estomática não seja tão alta como em sombra, pois a aclimação ao sol permite-lhe aguentar e resistir melhor a condições de stress hídrico. Este facto é corroborado pelos resultados obtidos na experiência realizada, visto que em plantas de sombra a resistência estomática é muito superior às plantas de sol. É ainda confirmada a correlação entre a radiação fotossinteticamente activa (PAR) e a resistência estomática, também confirmada por Nogueira, 2001. O facto dos valores de PAR serem mais elevados nas plantas de sombra pode ser explicado devido a erros de medição, pois para além de terem sido conduzidos por diferentes pessoas, não foram efectuados nas mesmas condições (Turhan & Kargi, 2007).

Reflectância: A partir da Fig.4 é possível observar que com percentagens de conteúdo hídrico mais elevadas ocorre um aumento do índice de reflectância fotoquímico em plantas de sombra, o mesmo não se verifica para as plantas de sol nas quais não se observa grandes variações de PRI. A diferença entre os valores de PRI para os dois tipos de folhas é também observada, sendo este superior nas plantas de sol. O efeito contrário é observado no que respeita ao teor hídrico relativo, que se apresenta superior em plantas de sombra.

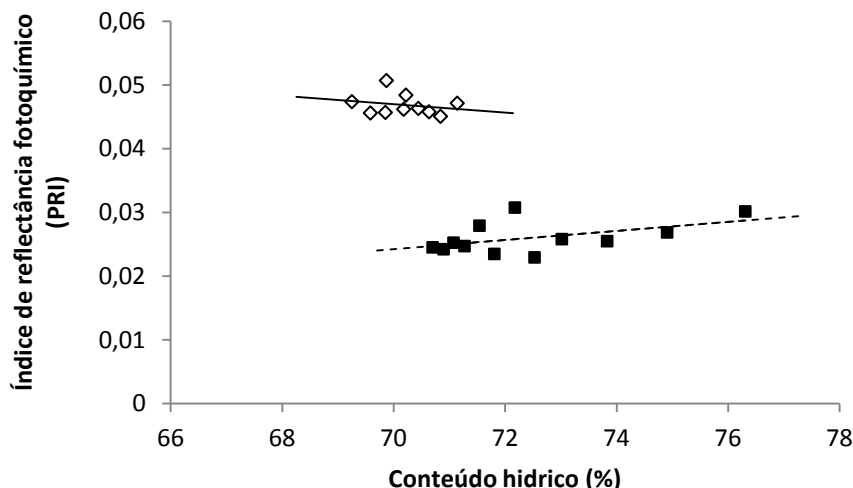


Figura 4 - Relação entre a variação do conteúdo hídrico (%) e o índice de reflectância fotoquímico entre folhas de sol $\diamond$ e sombra $\blacksquare$ expostas a stress. Linhas de tendência para cada situação, sol (— $y = -0,0007x + 0,0931$; $R^2 = 0,0521$) e sombra (- - - $y = 0,0007x - 0,0931$; $R^2 = 0,2461$).

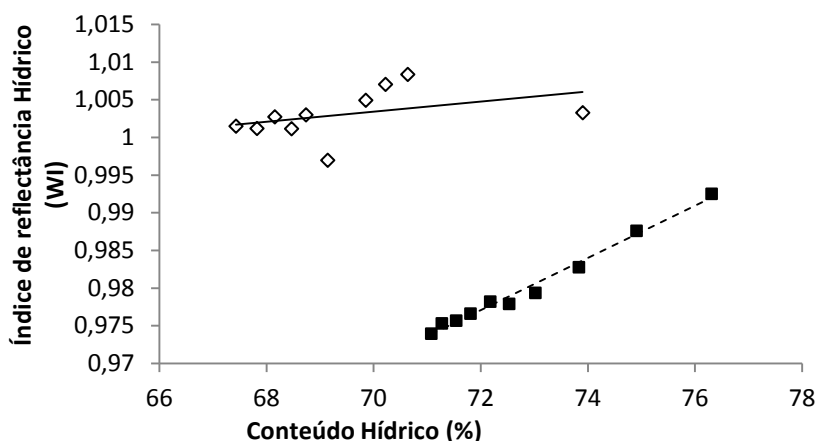


Figura 5 - relação entre a variação do conteúdo hídrico (%) e o índice de reflectância hídrico entre folhas de $\diamond$ e sombra $\blacksquare$ expostas a stress. Linhas de tendência para cada situação, sol (— $y = 0,0007x + 0,9563$; $R^2 = 0,1536$) e sombra (- - - $y = 0,0035x - 0,7276$; $R^2 = 0,9863$).

Através da Fig.5 é possível verificar a relação entre a variação de conteúdo hídrico e o índice de reflectância hídrico. Para plantas de sombra observa-se uma proporcionalidade entre os valores de WI e a percentagem de conteúdo hídrico, indicando que à medida que este diminui, diminui também o referido índice reflectância. A diferença entre os valores de WI para os dois tipos de folhas é igualmente estabelecida, sendo este superior nas plantas de sol. Tal como na Fig.4 é observado o efeito contrário no que respeita a percentagem de conteúdo hídrico que é superior em plantas de sombra.

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que o índice de reflectância hídrico está directamente relacionado com o conteúdo hídrico da folha, ou seja, quanto mais baixa a percentagem de conteúdo hídrico na folha menor o índice de reflectância hídrico e vice-versa. O facto de as folhas de sol apresentarem valores mais elevados no que respeita ao índice de reflectância pode ser explicado como uma resposta de aclimação, com a relação de diversos factores como a anatomia e fisiologia foliar (Printer *et al.* 1985), ou seja, folhas de sol tendo

dimensões mais pequenas apresentam percentagens de conteúdo hídrico mais baixas logo índices de reflectância hídricos mais elevados. O contrário acontece em folhas de sombra visto que apresentam dimensões foliares maiores logo um conteúdo hídrico também maior o que implica índices de reflectância hídricos mais baixos.

Em plantas aclimatadas ao sol existe um elevado número de carotenos oxigenados (xantofilas) que reflectem a energia excessiva. Isto ocorre como modo de protecção dos próprios fotossistemas à fotoxidação. Os resultados obtidos corroboram este facto, pois aquando de uma diminuição de conteúdo hídrico ocorre um aumento PRI, visto que a menores percentagens de conteúdo hídrico é verificada uma diminuição das taxas fotossintéticas, pois os tecidos com menor conteúdo hídrico baixam o rendimento fotossintético. (Anderson, 1986) O aumento da reflectância serve então como medida defensiva para esses cloroplastos que já não conseguem aceitar mesma energia que era inicialmente aproveitada.

O mesmo não se verifica para plantas de sombra, que devido à sua aclimação apresentam números mais baixos de xantofilas, visto que estas necessitam de absorver mais energia que as plantas de sol. Os resultados obtidos indicam que para valores mais baixos de conteúdo hídrico ocorre uma diminuição de PRI o que sugere uma menor necessidade de fotoprotecção. (Yang *et al.*, 1994; Post e Vesk, 1992).

Condutividade: Os sintomas visuais de danos induzidos são difíceis de quantificar quando as espécies de plantas ou génotipos são rastreados para susceptibilidades diferentes para um tipo de stress específico. Por isso sem dúvida, um dos métodos mais seguros e fiáveis seria medir a taxa de crescimento relativo, mas este método requer uma grande disponibilidade de tempo e requer uma ampla oferta de equipamentos e infra-estruturas em ambiente controlado (Hendry e Grime, 1993).

Alternativamente, um número de parâmetros fisiológicos, incluindo a fuga de electrólitos, tem sido utilizado como indicadores mais rápidos. Em stress como o hídrico verifica-se um aumento no fluxo passivo de iões devido a uma redução na integridade membranas. (Whitlow *et al.*, 1993)

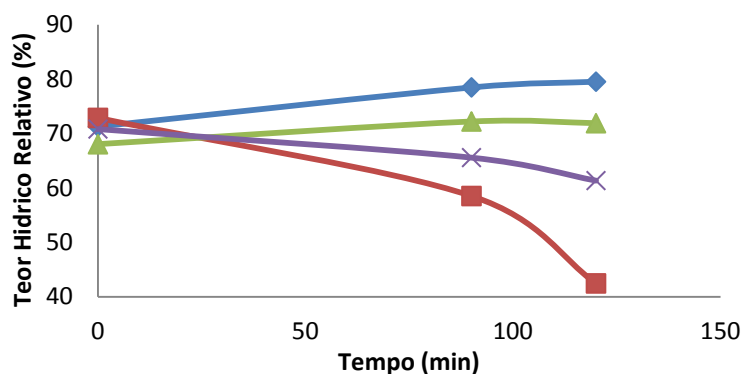


Figura 6- Variação do Teor Hídrico Relativo, RWC (%) ao longo do tempo (min) para: —●— Controlo para folhas de sol, —■— Folhas de sol em stress hídrico, —▲— Controlo para as folhas de sombra e —×— Folhas de sombra em stress hídrico.

De maneira a estudar o impacto do stress hídrico inicialmente foi-se ver como este interferia no teor hídrico relativo (RWC) das folhas. Na Fig.6 observa-se que as folhas recolhidas de modo a proceder-se à verificação do RWC não ultrapassam o valor de 85%, estando todas (controlo sol, stress sol, controlo sombra e stress sombra), muito perto do valor umas das outras para o tempo 0 min, tempo em que é iniciado a verificação do teor hídrico relativo sujeito ao stress hídrico. A segunda medição foi realizada aos 90 min, e já se começam a notar algumas disparidades, principalmente entre os valores de controlo e stress, tanto em sol como em sombra, pois verifica-se que os controlo, apresentam um aumento ligeiro do RWC enquanto que as folhas em stress apresentam um decréscimo ligeiro do RWC se compararmos com os dados aos 0 min (Fig.6). Entre sol e sombra também se observam algumas diferenças pois enquanto os valores para controlo, tanto

de sombra como sol, permanecem par a par tal como no início sendo os valores mais altos os de controlo sol e depois sombra, já em stress a situação modifica-se pois as folhas de sol que tinham o valor inicial mais alto neste momento observa-se que tem o valor mais baixo de RWC. A última e terceira medição foi realizada aos 120 minutos, onde se verificou um decréscimo dos valores de stress, principalmente de sol, que chegou aos 42,5% e sendo o único que desceu abaixo da barreira dos 60% de RWC. O stress sombra também verificou um decréscimo de teor hídrico mas não tão acentuado quanto o verificado pelo sol, chegando aos 61,4% de RWC. Já nos controlos, as folhas do sol continuam aumentar o seu teor hídrico relativo alcançando um máximo aos 79,5%, enquanto os controlos sombra ao invés de acompanharem as de sol como na medida anterior, verificam um decréscimo do valor do RWC.

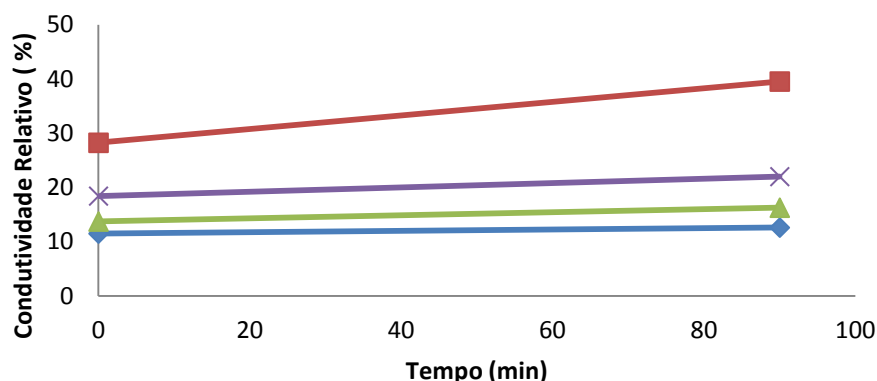


Figura 7- Variação da condutividade relativa (%) ao longo tempo (min). ◆ Controlo para folhas de sol, ■ Folhas de sol em stress hídrico, ▲ Controlo para as folhas de sombra e ✕ Folhas de sombra em stress hídrico.

Na Fig.7 observou-se a condutividade relativa ao longo do tempo como medida para apurar a fuga de electrólitos e por sua vez o stress hídrico nas folhas. No tempo 0, verifica-se a condutividade relativa inicial das folhas stress e controlo antes do stress hídrico ser aplicado, sendo mais baixo para o controlo sol e mais alto para o stress sol. Após 90 minutos de stress hídrico realiza-se uma segunda medição, o que salta a primeira vista e que tanto os controlo como os stress, todos aumentam os valores de condutividade relativa. No entanto observa-se um grande aumento dos valores de condutividade relativa nas folhas de sol em stress, com uma diferença de cerca de 11% para o valor inicial, enquanto nas folhas de sombra em stress esse aumento fica só pelos 7%. Já nos controlos esse aumento foi muito mais ligeiro, tendo-se verificado o valor mais alto para as folhas em sombra com um aumento de cerca de 3% e os mais baixos para as de sol com aumentos da

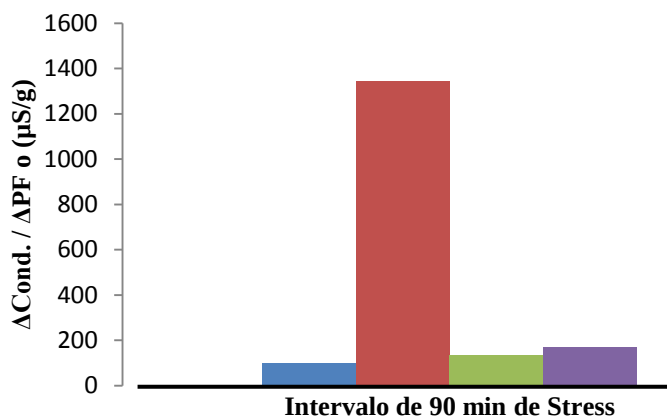


Figura 8 - Relação entre a variação da condutividade e do peso fresco das folhas para o intervalo de 90 minutos em stress. ■ Controlo para folhas de sol, ■ Folhas de sol em stress hídrico, ■ Controlo para as folhas de sombra e ■ Folhas de sombra em stress hídrico.

Por último foi-se observar a relação entre a variação da condutividade e do peso fresco das folhas, para o intervalo de 90 minutos em stress. Verificou-se que para as folhas de sol a diferença entre stress e controlo é abismal, sendo que essa mesma diferença ultrapassa o valor de 1200 μS de condutividade por g de folhas frescas (variação para intervalo de 90 minutos). Enquanto em sombra esses valores são muito inferiores já que a diferença entre stress e controlo é apenas de 34 μS de condutividade por g de folhas frescas (variação para intervalo de 90 minutos) (Fig.8). Ou seja, em stress hídrico, para uma grama de diferença de peso fresco observa-se uma maior fuga de electrólitos em folhas sol do que em sombra.

Os resultados aqui apresentados indicam que tal como seria de esperar, o stress hídrico modifica a integridade das membranas através da perda de turgescência, verificado por uma diminuição do teor hídrico relativo. Ou seja, ao longo do tempo a fuga de electrólitos é tanto maior que afecta adversamente todas as funções fisiológicas, pois as membranas que envolvem os organelos, como os cloroplastos, mitocôndrias e vacúolo, essenciais para um bom funcionamento celular são afectadas, tornando-se canais para a transferência de iões e reduzindo assim a fotossíntese e a respiração, entre outros (Nilsen e Orcutt, 1996).

O facto do stress em folhas de sol apresentar maiores perdas em relação ao teor hídrico relativo do que em folhas de sombra deve-se principalmente à ligação que existe entre a perda de água e a condutância estomática. Ou seja o teor hídrico relativo está dependente da regulação estomática. Para que a folha não perca muita água e por sua vez modifique a integridade das membranas através da perda de turgescência (resultando em valores mais altos de condutividade), as plantas de sombra para pequenas perdas de teor hídrico relativo, apresentam uma condutância estomática que diminui muito mais rapidamente e mais cedo do que nas folhas de sol. Existe assim uma maior perda de electrólitos quando ocorre stress nas folhas de sol do que nas folhas de sombra, como se verifica na Fig.8 (Lemoine *et al.* 2002).

Para concluir, salienta-se que a principal perda de água e por sua vez de electrólitos é controlada pela regulação estomática e por sua vez pela sua condutância, controlada pelos níveis do teor hídrico relativo da planta, pois este é um dos factores chave que controlam a abertura e fecho dos estomas (Monteith, 1995; Franks *et al.* 1997).

Determinação da peroxidação lipídica: Em algumas espécies, a seca ou lesões por calor induzem stresse oxidativo, resultando na produção e acumulação de espécies reactivas de oxigénio (ROS), altamente tóxicos, tal como o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), e hidróxilo ($\text{OH}^\cdot$) (Bowler *et al.*, 1992; Foyer *et al.*, 1994). As ROS produzidas durante um stress podem causar muitos danos a componentes celulares, incluindo lípidos, proteínas, açúcares e ácidos nucleicos (Monk *et al.*, 1989). O stresse oxidativo pode mesmo levar à inibição da fotossíntese e dos processos de respiração e, assim, do crescimento da planta. As plantas têm evoluído sistemas enzimáticos e não-enzimáticos de modo a conseguirem eliminar ROS. Em sistemas enzimáticos, temos por exemplo, a enzima superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação de O_2^- para H_2O_2 e O_2 . A catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (AP) podem quebrar a molécula de H_2O_2 . A glutatona redutase (GR) também pode remover H_2O_2 através do ciclo glutatona-ascorbato para manter um elevado nível de ascorbato reduzido dentro dos cloroplastos. No entanto, a função dos sistemas de limpeza enzimáticos pode ser interrompida aquando uma seca ou um stress térmico, que pode resultar num aumento da peroxidação lipídica e consequente dano nas membranas celulares. (Chowdhury e Choudhuri 1985; Zhang e Kirkham, 1994).

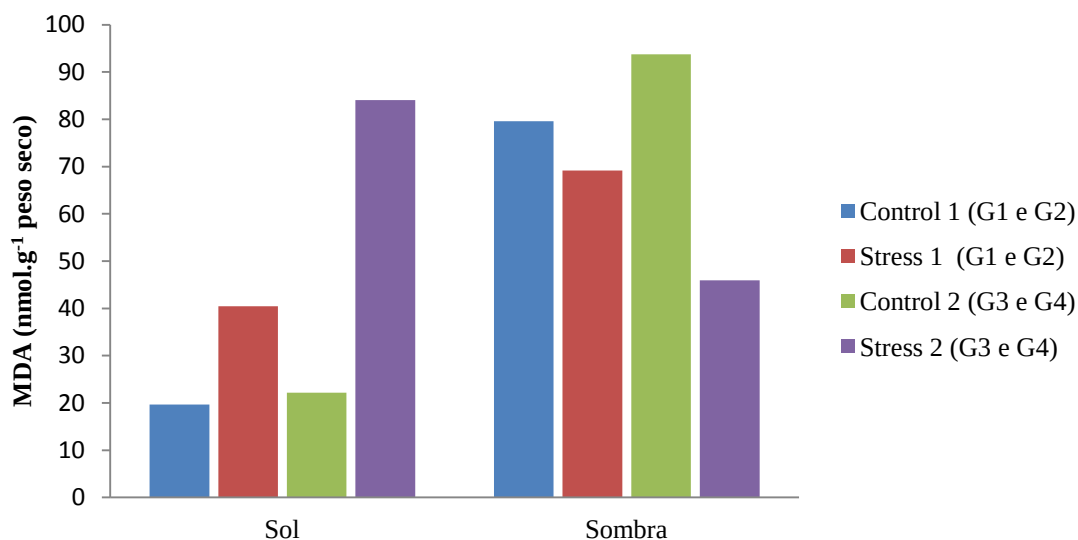


Figura 9 - Determinação de peroxidação lipídica.

A produção de MDA aumenta consideravelmente das folhas de sol para as folhas de sombra, tanto por parte dos controlos como em relação às folhas submetidas ao stress hídrico, sendo evidentes grandes diferenças. Os valores de MDA à sombra não descem para menos de 40 nmol.g⁻¹ peso seco, no entanto atingem valores acima dos 90 nmol.g⁻¹ peso seco (Fig.9), apresentando grandes valores de peroxidação lipídica. Quanto aos valores de sol apresentam valores mais baixos, tendo um mínimo perto dos 20 nmol.g⁻¹ peso seco e um máximo na ordem dos 80 nmol.g⁻¹ peso seco, apresentando menor peroxidação do que as folhas de sombra mas uma maior amplitude desde o valor mínimo até ao máximo.

Observando os grupos sol e sombra mais de perto é de realçar que nos grupos de sol os valores mais altos de MDA e por sua vez de peroxidação lipídica encontram-se nas folhas de stress, já nos grupos sombra os valores mais altos de MDA encontram-se nas folhas controlo.

Comparando os valores de MDA entre grupos do mesmo tipo, observa-se para os grupos de sol valores muito semelhantes ao nível dos controlos, perto dos 20 nmol.g⁻¹ peso seco, porém muito dispares em relação às folhas de Stress, obtendo valores de 40 nmol.g⁻¹ peso seco para o grupo 1 enquanto valores perto de 85 nmol.g⁻¹ peso seco, para o grupo 3, ou seja mais do dobro do valor de peroxidação lipídica.

Já com os grupos de sombra não se observa o mesmo padrão dos grupos sol, ou seja as diferenças dos controlos são mais próximas as diferenças dos stress entre grupos, sendo de cerca de 15 nmol.g⁻¹ peso seco para os controlo e de 23 nmol.g⁻¹ peso seco para os stress. Apesar disso e como no grupo de sol existe uma maior diferença que no grupo de sombra (grupo 3 e 4), comparando valores de controlo e stress, do que para os grupos de sol, grupos 1 e 2.

Uma aclimação bem documentada a mudanças nas condições de luz é a alteração da ultra-estrutura do cloroplasto (tilacóides, empilhamento e tamanho dos grana) (Anderson, 1986). Plantas de ambientes de pouca luz têm mais grana e os tilacóides mais empilhados uns nos outros, do que as plantas encontradas em habitats com muita exposição ao sol.

Outro facto importante tem a ver com os pigmentos fotossintéticos, os carotenóides estão associados tanto aos pigmentos antena como às proteínas dos centros de reacção, e têm múltiplas funções na fotossíntese. Como pigmentos acessórios, os carotenóides podem absorver luz que pode ser transferida, para a clorofila e por sua vez para a fotossíntese mas estes também desempenham um papel vital na protecção do aparelho fotossintético de danos causados por excesso de absorção de luz. Os carotenóides oxigenados (xantofilas) podem realizar fotoprotecção extinguindo o estado excitado da clorofila por calor (não-fotoquímica), bem como actuar como antioxidante e eliminar qualquer ROS que se tenham formado (Siefermann-Harms, 1987).

Quanto às concentrações e proporções de pigmentos fotossintéticos (ou seja, clorofila a e b, e carotenóides) estes estão correlacionados com a radiação que estas plantas experimentam no seu habitat natural. As plantas que crescem em condições de pouca luz, têm muitas vezes uma maior quantidade de clorofila e uma menor proporção entre clorofila a e b do que as plantas de locais com muita exposição à luz, possivelmente para aumentar a eficiência de captação de luz (Anderson, 1986). Da mesma forma, uma maior proporção da clorofila para com os carotenóides, também é muito comum em plantas de habitats sombreados, quando comparados com espécies de habitats bem iluminados, sugerindo uma menor necessidade de fotoprotecção. (Yang *et al.*, 1994; Post e Veski, 1992).

O stress por excesso de radiação também pode ser evitado, limitando a energia em excesso de alcançar os cloroplastos. A captação de luz pode ser ajustada pelas folhas e pelos movimentos dos cloroplastos, como por exemplo as folhas de sol serem mais pequenas (Seel *et al.*, 1992; Wada *et al.*, 2003).

Outro ponto muito importante são os antioxidantes, como o ácido ascórbico, pois estes podem efectivamente limpar o excesso de ROS e assim suportar o fluxo de electrões, mesmo sob condições de stress. (Halliwell e Gutteridge, 1999; Smirnoff, 2000). Folhas de plantas aclimatadas ao sol normalmente possuem maiores quantidades de ácido ascórbico do que folhas aclimatadas à sombra (Asada, 1999; Smirnoff 2000) e assim, têm um melhor e mais desenvolvido sistema antioxidante.

Estes aspectos bem documentados estão coerentes com os nossos dados pois são nos grupos de sol onde se observam os valores mais baixos de MDA e por sua vez menor peroxidação lipídica, exceptuando um que será mencionado mais tarde (stress 2 – sol – G3), como seria de esperar.

Continuando a discutir os resultados, existem mais alguns aspectos muito interessantes que ajudaram a fundamentar os nossos dados e estão mais relacionados com o tipo de stress introduzido, stress hídrico. A dessecação pode reduzir os componentes lipídicos nas membranas dos tilacóides, inibindo por este meio a fotossíntese (Guschina *et al.*, 2002).

Já na Natureza, a seca é muitas vezes acompanhada por uma luz solar intensa, nessas condições, os cloroplastos são particularmente sensíveis ao dano oxidativo. A radiação aumenta qualquer dano oxidativo durante a desidratação porque diminui a fotossíntese, e leva o excesso de energia de excitação dos centros activos para a formação de ROS se os fotossistemas de protecção são oprimidos (Smirnoff, 1993).

Ou seja, como as plantas aclimatadas à sombra (grupos sombra), não tem ou são raros, os fotossistemas de protecção à radiação, quando expostas a radiação do laboratório (a mesma que para das plantas do sol) produzem os valores mais altos de MDA (controlo 1 e 2 – sombra – G2,G4), pois a produção de bastantes ROS deve-se a altos níveis de fotossíntese e por sua vez altos níveis de peroxidação lipídica. Da mesma maneira as plantas aclimatadas ao sol, quando expostas à radiação do laboratório por meio dos seus fotossistemas de protecção, têm os valores mais baixos de MDA (controlo 1 e 2 – sol – G1,G4), pois conseguem diminuir a produção de ROS.

Quando se induz um stress hídrico tudo muda de figura, pois nos grupos sol existe um aumento do MDA, enquanto nos grupos sombra existe um abaixamento dos valores de MDA, verificado dos controlos para valores de stress. Aquando de um stress hídrico os fotossistemas de protecção que baixavam os valores de MDA para os grupos sol são oprimidos fazendo subir estes valores, pois já não são escoados por estes sistemas. Já nos grupos sombra, como não tem fotossistemas de protecção, então os valores de MDA baixam porque estão dependentes dos ROS produzidos pela Fotossíntese, e como a fotossíntese baixa com o stress hídrico, também os ROS a ela associados.

De salientar também que o dado anómalo (stress 2 – sol – G3), deve-se provavelmente ao erro no método do grupo 3, pois não se aplicou azoto líquido aquando da maceração das folhas, fazendo com que os valores de MDA disparassem tanto para os valores de stress.

Por ultimo é de referir que a especificidade do ensaio pode ser questionada, visto que são os aldeídos, que reagem ao TBA e porque existem vários outros pigmentos que absorvem a 532nm, muitas vezes dando valor exagerado da concentração de MDA (Janero, 1990)

Determinação da concentração de sacarose: Os produtos da fotossíntese necessitam de ser transportados pelo floema das folhas até aos vários tecidos não-fotossintéticos alvo, onde são armazenados ou utilizados na respiração. A sacarose é a forma principal de como se dá o transporte de carboidratos nas plantas superiores (Singh e MacLachlan, 1983), funcionando também como nutriente e provavelmente como molécula sinalizadora (Winter e Huber, 2000). A glucose e a frutose são açúcares redutores, podendo reagir com outras moléculas durante o transporte no floema, sendo essa possivelmente a razão pela qual a sacarose é o açúcar de eleição para ser usado no transporte, visto que não é redutora. Para além disso está mais protegida de enzimas hidrolíticas até chegar ao destino. É sintetizada nas folhas, sendo um dos produtos primários finais mais produzidos nestes órgãos das plantas. Durante o dia, em que ocorre fotossíntese, o substrato para a sua síntese é uma triose de fosfato libertada pelo cloroplasto para o citoplasma, através de um translocador membranar, em troca de fosfato inorgânico proveniente do citoplasma. Durante a noite o amido fornece o substrato, provavelmente na forma de glucose aquando da sua quebra por amilases. As principais enzimas citosólicas envolvidas na síntese da glucose são a sacarose fosfato sintase (SPS) e a frutose bifosfatase (FBPase).

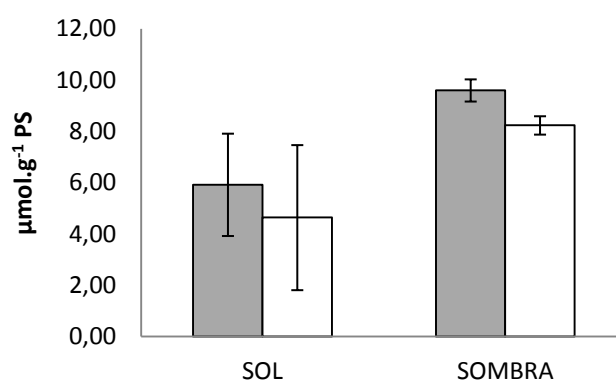


Figura 10 – Determinação da concentração de sacarose em $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{PS}$ de *Fragaria vesca*. Foram utilizados 6 folíolos como replicados de cada situação: folhas de sombra e de sol em situações de stress de dessecação (□) e controlo (■).

Na realização da curva de calibração para doseamento da sacarose pelo método do resorcinol, obtiveram-se valores acima do 2 de absorvância, ou seja, valores a que a lei de Lambert-Beer já não é válida, a concentrações de sacarose de 40 mM. Assim, o método é válido para concentrações de sacarose entre 5 e 30 mM. Testou-se também que a absorvância não é afectada significativamente pela presença de etanol a 80% nas amostras, fazendo-se uma recta de calibração com sacarose em etanol a 80%. Utilizando a equação da recta obtida por esta curva, calculou-se a concentração de sacarose em μM , calculando-se posteriormente a concentração em $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{PS}$, tendo em conta que se utilizaram para medição da absorvância 100 μL do total de 1 mL de amostra de sacarose em etanol para as folhas de sol, ou 100 μL de 0,5 mL de volume total para 3 dos replicados e 50 μL de etanol com sacarose nas plantas de sombra, visto a absorvância medida ser superior a 2 para estas folhas quando se usaram os 100 μL .

A sacarose e outros solutos têm um papel na estabilização estrutural de componentes subcelulares, incluindo membranas e proteínas. Estes açúcares em condições de stress hídrico asseguram que a pouca água que ainda se encontra na folha se mantenha num estado 'vidrado'. Alguns dos genes expressos são proteínas com zonas tanto hidrofílicas e hidrófobas que ligam iões ou então associarem-se a membranas (Lambers *et al.*, 2008), ou cinases dependentes de cálcio (Winter e Huber, 2000). Estas provavelmente têm uma função osmoprotectora, reduzindo o potencial dano provocado pelas elevadas concentrações de solutos provocadas pela perda de água (Lambers *et al.*, 2008).

Inibição por feedback ocorre com altas irradiações, que limita o transporte para o floema dos solutos. Nestas condições a capacidade de assimilar CO_2 excede a capacidade de exportar para o citoplasma e a metabolização posterior dos produtos da fotossíntese. Consequentemente os

intermediários fosforilados da via de síntese das trioses de fostasto para sacarose acumulam, sequestrando os fosfatos inorgânicos. Assim o fosfato inorgânico limita a fotossíntese visto que a capacidade de canalizar a triose de fosfato a amido no cloroplasto fica saturada (Lambers *et al.*, 2008). A redução de fosfato inorgânico para troca das trioses de fosfato do cloroplasto para o citoplasma, resulta também numa redução de substrato no citoplasma para a produção de sacarose. Isto deverá explicar a menor concentração de sacarose obtida nas folhas de sol e a diminuição em ambas as plantas, sol e sombra, da quantidade de sacarose em situação de stress hídrico (Fig. 10).

A actividade da enzima sacarose fosfato sintetase parece ser também inibida em stress de dessecação (Vassey & Sharkey, 1989), o que se deverá à diminuição da taxa fotossintética, provocada pela redução de CO₂ devido ao fecho dos estomas para evitar perda de água. Isto resulta numa menor síntese de sacarose (Lambers *et al.*, 2008). Conclui-se assim que a diminuição da concentração de sacarose terá resultado da diminuição da fotossíntese provocada pelo fecho dos estomas, que impede por sua vez a entrada de carbono para fixação. Para além disso, a sacarose sendo um carboidrato facilmente degradado para produção de energia, é mais prontamente utilizada (Winter e Huber, 2000).

Os resultados obtidos estão em concordância com outros relatados anteriormente. Liu *et al.*, 2004 observaram que o conteúdo em sacarose diminui em condições de stress de desidratação em soja. Haverá uma degradação da sacarose em frutose e glucose, os dois monossacáridos que a constituem. Normalmente a sacarose é dirigida para as estruturas reprodutoras onde é então degradada em glucose e frutose, atingindo mesmo concentrações mais elevadas do que nas mesmas estruturas em plantas que não sofrem stress (Liu *et al.*, 2004).

Deteção qualitativa de H₂O₂ (coloração com DAB); O stress oxidativo é provocado por espécies reactivas de oxigénio (ROS) como o peróxido de hidrogénio H₂O₂, água oxigenada, que aqui foi qualitativamente analisado por via da sua interacção com a 3, 3'-diaminobenzinida (DAB) dando origem a uma coloração acastanhada nas folhas.

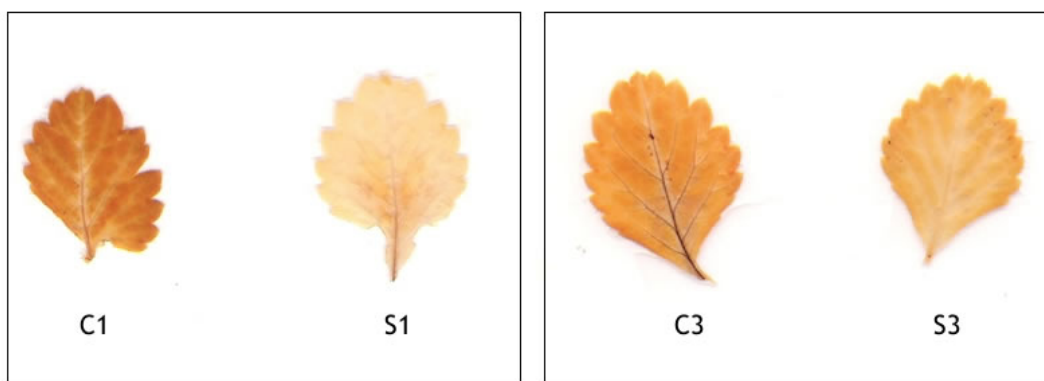


Figura 11 - Folíolos de plantas de sol (C – controlo; S – stress) corados pela interacção de DAB com H₂O₂ (replicados 1 e 3).

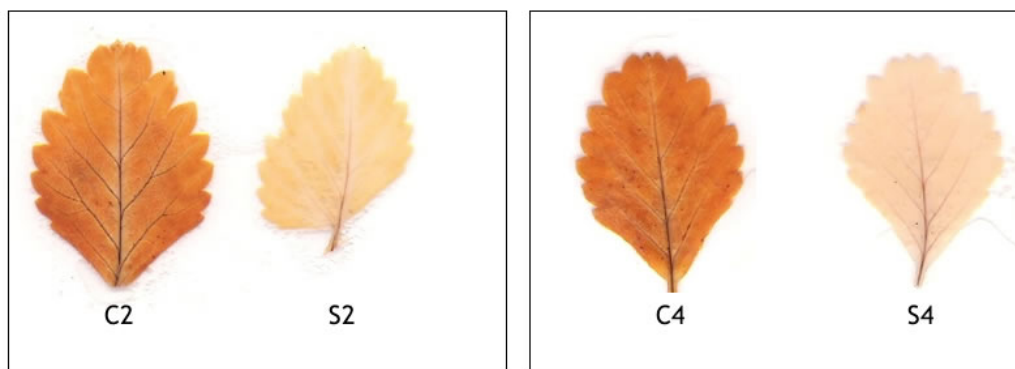


Figura 12 - Folíolos de plantas de sombra (C – controlo; S – stress) corados pela interacção de DAB com H₂O₂ (replicados 2 e 4).

A produção de H_2O_2 foi assim demonstrada com DAB, que reage com H_2O_2 na presença de peroxidases, produzindo um produto castanho fruto de polimerização, visível após a remoção de clorofila das folhas (Fig. 11 e 12). Demonstrou-se que existia uma maior concentração deste produto na região da folha de ligação ao pecíolo, aferindo-se então uma maior afinidade aos tecidos vasculares (Fryer, 2002). Contrariamente ao que se poderia esperar encontrar, as folhas de controlo apresentavam maior coloração acastanhada do que as folhas que foram sujeitas a um stress hídrico e, consequentemente, oxidativo, mostrando assim que continham nelas maior quantidade da espécie ROS H_2O_2 , resultado incompatível com os fundamentos teóricos e experimentais aplicáveis.

Análise da expressão do gene *rd29A* (RT-PCR): As plantas respondem à desidratação com alterações fisiológicas que vão ter efeitos mais imediatos como o fecho dos estomas e a redução da taxa fotossintética, mas se prolongada a duração do stress estas alterações irão-se fazer sentir no seu desenvolvimento, como o crescimento reduzido das folhas e a ramificação das raízes e mesmo dos caules (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 1993b). As plantas respondem a este tipo de stress activando a transcrição de genes chave, que levam à produção de ácido abscísico, ou ABA, que se desloca das raízes até às folhas, mas também ocorrem respostas independentes de ABA. Condições adversas que promovem a produção de ABA são as elevadas salinidades (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000), o frio, que induz o fecho dos estomas e a síntese de proteínas específicas (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 1994), estando na origem de stress osmótico (Xiong *et al.*, 1999), principal responsável pela sua indução (Taiz e Zeiger, 2002). Outras respostas ocorrem independentemente de ABA, como é o caso da expressão do gene *rd29A*.

Para analisar a actividade de *rd29A*, analisou-se a sua expressão em *Arabidopsis thaliana*. Procedeu-se inicialmente à extracção de RNA de folhas de *Fragaria vesca* em stress e um controlo não sujeito a stress. Devido ao RNA ter ficado bastante degradado, como se pode observar na Fig.13 a) e b), utilizaram-se RNAs previamente extraídos das folhas de *A. Thaliana* (Fig.14a).

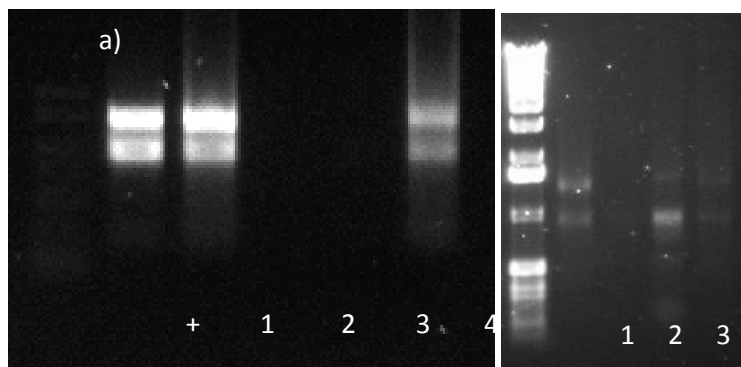


Figura 13 - Electroforese de RNA após a sua extracção: a) Volume corrido de 1 μ l com RNA de *Arabidopsis thaliana* (+) e de *Fragaria vesca* de sol em condições de stress de desidratação (1) e controlo (3). *Fragaria vesca* de sombra em stress (4) e controlo (2); b) Electroforese ao RNA extraído com as mesmas condições que as descritas em a), mas com volumes usados de 0,1 μ l (1 e 4) e 5 μ l (2 e 3) para possibilitar a visibilidade RNA extraído.

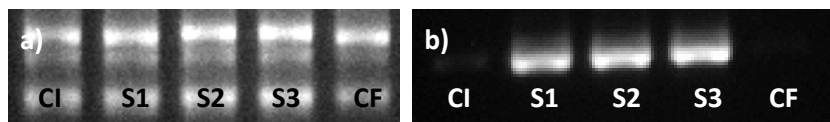


Figura 14 – a) RNA extraído de *Arabidopsis thaliana*. S1 corresponde a uma planta sujeita a 7 dias sem água, com um RWC=85%; S2 foi sujeito a 10 dias de stress e possuía uma RWC de 49% e S3 a 12 dias possuindo nesta altura um RWC de 29%. CI e CF são plantas bem irrigadas no início e 12 dias após o início da indução de stress de dessecação, respectivamente, com RWC=81%; b) Resultado da electroforese aos produtos do RT-PCR ao gene que expressa RD29A. CI corresponde a um controlo no início da indução de stress às folhas S1, S2 e S3. CF é o controlo no final, para comprovar que não havia de facto expressão no controlo no período de stress induzido a S1, S2 e S3.

Rd29A codifica para uma proteína hidrofílica de 78 kDa, mas a sua função concreta é ainda desconhecida. A sua indução e dos genes a montante é feita rapidamente e consiste num processo de duas fases (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 1993). Em *Arabidopsis thaliana* a primeira indução ocorre 20 minutos depois do início da dessecação, ocorrendo a segunda cerca de 3 horas depois. Nem todos os genes são transcritos em condições de desidratação quando se fornece às plantas ABA exógeno, indicando uma resposta independente do ácido abscísico (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 1994). A primeira indução rápida observada aos 20 minutos não é mediada pelo ABA (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 1993) mas a segunda às 3 horas é, através de elementos reguladores *cis* (ABRE) no promotor de *rd29A*. O promotor de *rd29A* contém assim um elemento regulador independente de ABA (DRE, *dehydration responsive elements*), que responde à desidratação ou outros tipos de stress, como se pode ver na Fig.15. O gene a montante de *rd29A*, *rd29B* já é induzido por ABA através do elemento regulador ABRE, ou *abscisic acid responsive element* (Fig.15). Estes elementos interagem com os factores de transcrição resultantes do sinal (Knight e Knight, 2001; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Pensa-se ainda haver interacção destes elementos DRE e do elemento ABRE para a transcrição destes genes na segunda indução em resposta ao ABA (Narusaka *et al.*, 2003).

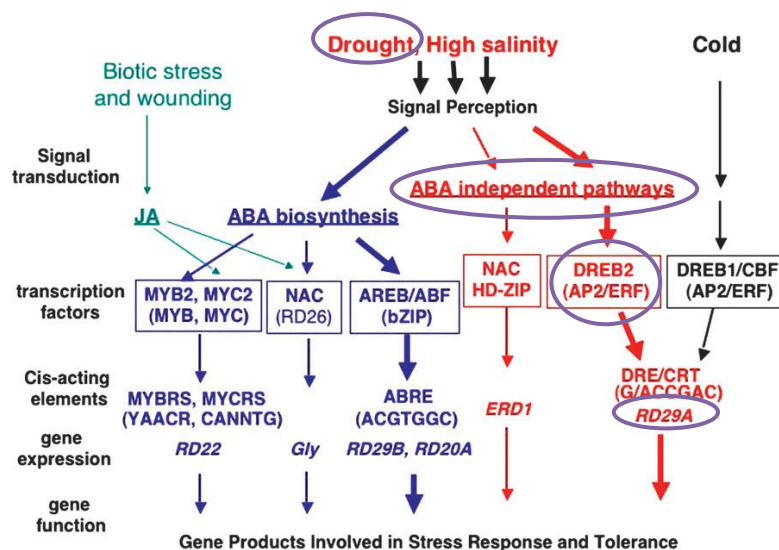


Figura 15 - Modelo da indução da expressão de *rd29A* e outros genes envolvidos nas respostas ao stress salino, de frio e desidratação (Adaptado de Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Observou-se que nas folhas em que se causou stress de dessecação ocorre de facto a expressão de *rd29A*, e que nos controlos não se observa a sua expressão (Fig.14b). Portanto a o stress de dessecação terá desencadeado o sinal (DREB) que interage com o elemento DRE do promotor de *rd29A* (Narusaka *et al.*, 2003) permitindo a produção da proteína. Observa-se uma banda muito fraca em CI, podendo este indicar algum stress causado por uma possível demora na colocação da folha em água após a colheita. Nas folhas sujeitas a stress o teor relativo de água (RWC) manteve-se alto após os 7 dias de stress, havendo uma perda de água mais acentuada ao longo dos 5 dias de stress que se seguiram. Este facto poderá ser representativo da actividade de *rd29A* na retenção de água em situação de stress de dessecação, sendo os valores mais baixos de S2 e S3 devidos a uma falha continuada na aquisição de água pela planta, que leva a uma perda da eficácia da maquinaria celular e consequentemente todos os processos metabólicos.

Fluorescência modulada: A fluorescência é caracterizada pela emissão de um fóton resultante da libertação de energia de um electrão excitado ao regressar ao seu nível de menor energia. Ao iluminar-se uma folha, as moléculas de clorofila absorvem energia e ocorre a transferência de electrões para o nível superior (Marques da Silva *et al.*, 2007). A energia absorvida pode ser libertada por dissipação de calor, vias fotoquímicas ou por emissão de fluorescência (Marques da Silva *et al.*, 2007; Marques da Silva, 2009a).

Ao iluminar-se uma folha adaptada ao escuro, imediatamente após a iluminação, ocorre uma primeira emissão de fluorescência, correspondendo à fluorescência mínima (F_0) (Marques da Silva *et al.*, 2007; Marques da Silva, 2009a). Esta emissão ocorre quando os centros de reacção do Fotossistema II estão disponíveis para aceitar energia (i.e. estão abertos). À medida que a energia vai chegando aos centros de reacção, estes vão ficando indisponíveis (i.e. fechados), diminuindo o rendimento fotoquímico e aumentando a fluorescência até todos os centros estarem fechados. Atingiu-se, então, o nível máximo de fluorescência – F_m (Marques da Silva, *et al.*, 2007).

Fluorescência modulada é uma técnica de emissão de fluorescência em que a fonte emite radiação apenas num determinado comprimento de onda e em que o detector rejeita todos os sinais diferentes da modulação. Com esta técnica é possível induzir a fluorescência numa amostra com uma luz actínica contínua (a qual não é modulada) e medir apenas a fluorescência emitida pela luz modulada. Assim o aparelho pode medir a fluorescência máxima – detecção da fluorescência e reflexão da luz actínica e da luz modulada – e a fluorescência mínima – detecção da fluorescência e reflexão da luz actínica (Marques da Silva, 2009a). A análise da fluorescência da clorofila permite conhecer o estado fisiológico das plantas sem lhes provocar danos (Marques da Silva *et al.*, 2007; Živčák *et al.*, 2008).

Dos diversos parâmetros medidos pela Fluorescência Modulada, observou-se que alguns sofreram decréscimos com o prolongar do stress hídrico e que existem diferenças entre as plantas de Sol e as de Sombra. Ambas as fluorescências mínima (F_0) e máxima (F_m) sofrem uma diminuição brusca nas plantas de Sol (Fig.16 - F_0 e F_m). Nas plantas de Sombra esta diminuição é ligeira. Quanto ao rendimento quântico fotoquímico (F_v/F_m), nas plantas de Sol, este tem uma diminuição quase linear ($R^2 = 0,9983$) e nas plantas de Sombra, em vez de uma diminuição, há um aumento. No entanto, estas variações são bastante pequenas.

Traçando um gráfico com F_0 e F_m em função do conteúdo hídrico relativo, RWC (Fig.16) observa-se que os valores da fluorescência mínima, de ambos os tipos de plantas, são bastante próximos. Observa-se também que os valores da fluorescência máxima estão mais dispersos, principalmente no caso das plantas de Sol. Com base nestes dados pode-se argumentar que a fluorescência mínima é comum aos dois tipos de planta pois com pouca luz não são necessários mecanismos de protecção contra a luz (no caso das plantas de sol). A fluorescência máxima já é mais variável devido às diferenças no comportamento face à luz saturante – as plantas de sol, estando habituadas a grandes intensidades solares, protegem-se usando outras formas de dissipação da energia que não a fluorescência, enquanto as plantas de sombra, habituadas a pouca intensidade solar, necessitam de captar o máximo de luz possível e como tal não têm mecanismos de protecção.

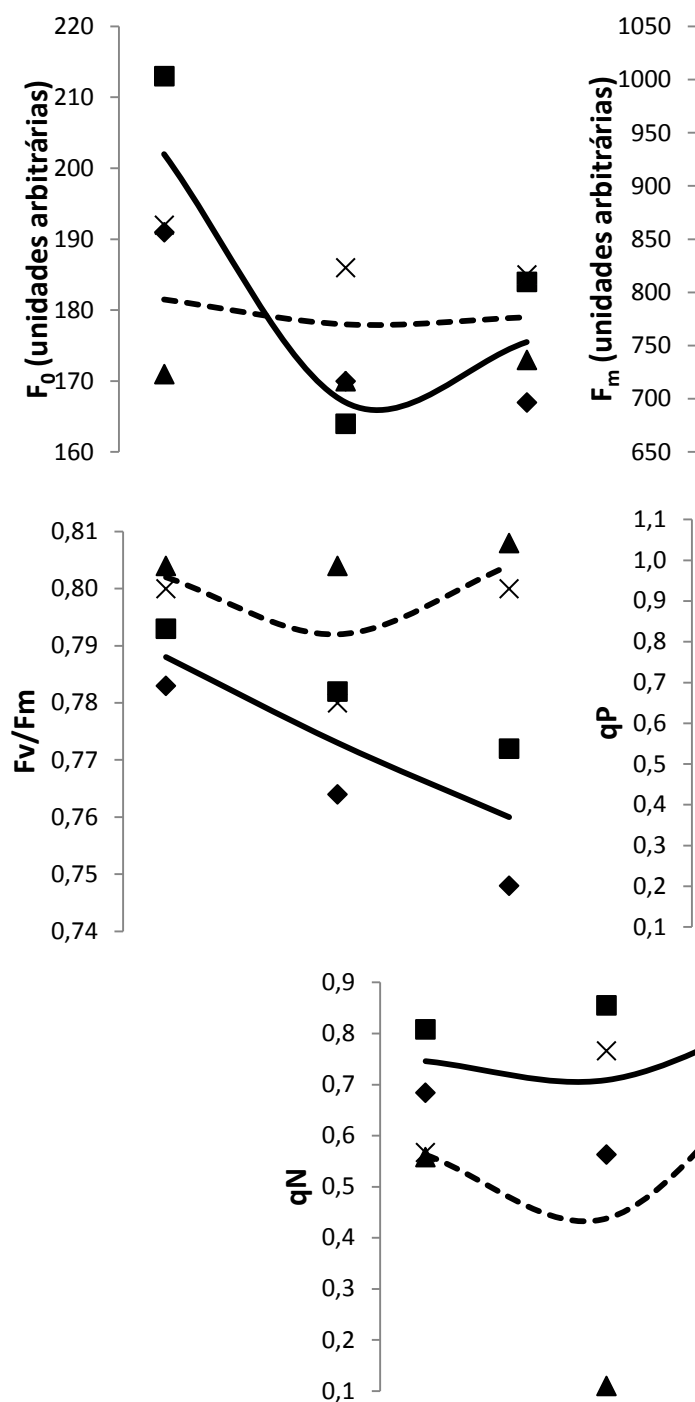


Figura 16 – Parâmetros da Fluorescência Modulada ao longo de 3 medições. Os pontos referem-se aos valores medidos de cada parâmetro para 2 plantas de sol e 2 de sombra. ■ Sol 1; ♦ Sol 2; ▲ Sombra 1; × Sombra 2; — Média de Sol; ---- Média de Sombra.

Pelo mesmo gráfico observa-se também que as plantas de Sol atingem um défice hídrico maior que as plantas de Sombra. Isto poderá ser devido ao facto de, apesar de as plantas de Sombra possuírem maior área foliar, estas possuem menor densidade estomática, ajudando assim a reduzir as perdas de água.

Como esperado, ocorreu diminuição da supressão fotoquímica durante o stress hídrico, tanto nas plantas de Sol como nas de Sombra (Fig.16 - q_p). A supressão fotoquímica da fluorescência deve-se à transferência de energia dos estados electrónicos excitados para os centros de reacção. Como com o stress hídrico ocorre diminuição da fotossíntese (logo ocorre também diminuição das vias fotoquímicas), a energia dos estados excitados deixa de ser captada pelos centros de reacção,

levando ao decréscimo da supressão fotoquímica. Pelo contrário, com o aumento do stress, ocorreu aumento da supressão não-fotoquímica (Fig.16 - qN), sendo que se a transferência de energia deixa de ser para os centros de reacção, outras formas são usadas para libertar a energia acumulada.

Fluorescência JIP: Iluminando-se subitamente uma folha adaptada ao escuro, a emissão de fluorescência resultante não é constante. Esta emissão caracteriza-se por um aumento rápido seguido de um decréscimo até um nível constante (Strasser *et al.*, 2000), sendo possível desenhar uma curva característica. Baseado nesta curva, desenvolveu-se um teste – o Teste-JIP (Strasser *et al.*, 2000; Marques da Silva, 2009b). Este teste pode ser usado para medir diversos parâmetros quantitativos das transferências de energia ocorridas no fotossistema II (Živčák *et al.*, 2008). O uso desta análise complexa é vantajoso pois permite inferir a existência de stress nas plantas antes do surgimento dos sintomas habituais (Živčák *et al.*, 2008). Assim, a vitalidade do material vegetal pode ser caracterizado pelo Índice de Performance (P_i), o qual é calculado segundo a Equação 1 (Živčák *et al.*, 2008).

$$PI = \frac{1-(F_0/F_m)}{M_0/V_j} \times \frac{F_m-F_0}{F_0} \times \frac{1-V_j}{V_j} \quad (1)$$

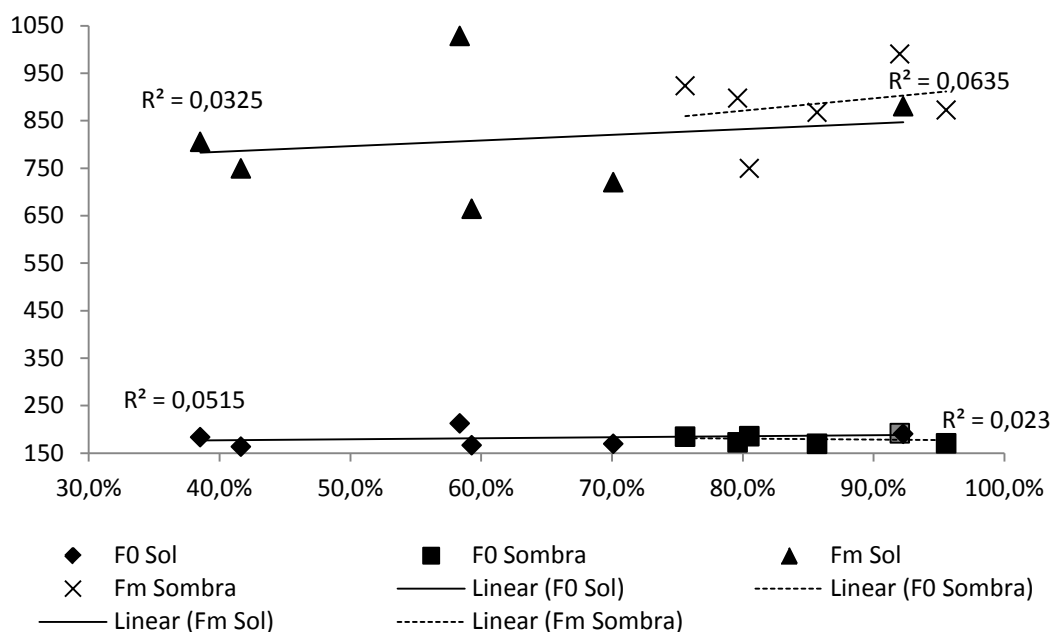


Figura 17 – Correlação entre a Fluorescência mínima (F_0) ou a Fluorescência máxima (F_m) e o Teor Hídrico Relativo (RWC).

Na fluorescência JIP observa-se novamente, e tal como na fluorescência modulada, que as plantas de sol sofrem maior stress hídrico que as de sombra (Fig.17, 18 e 19). Como já foi referido, esta observação poderá dever-se às diferenças na densidade estomática entre os dois tipos de plantas. Observando a Fig.17, vê-se que nas plantas de sol, o RWC decresce mais rapidamente que nas plantas de sombra e que em ambas o decréscimo é aproximadamente linear ($R^2 = 0,97$ – plantas de sol e $R^2 = 0,9753$ – plantas de sombra).

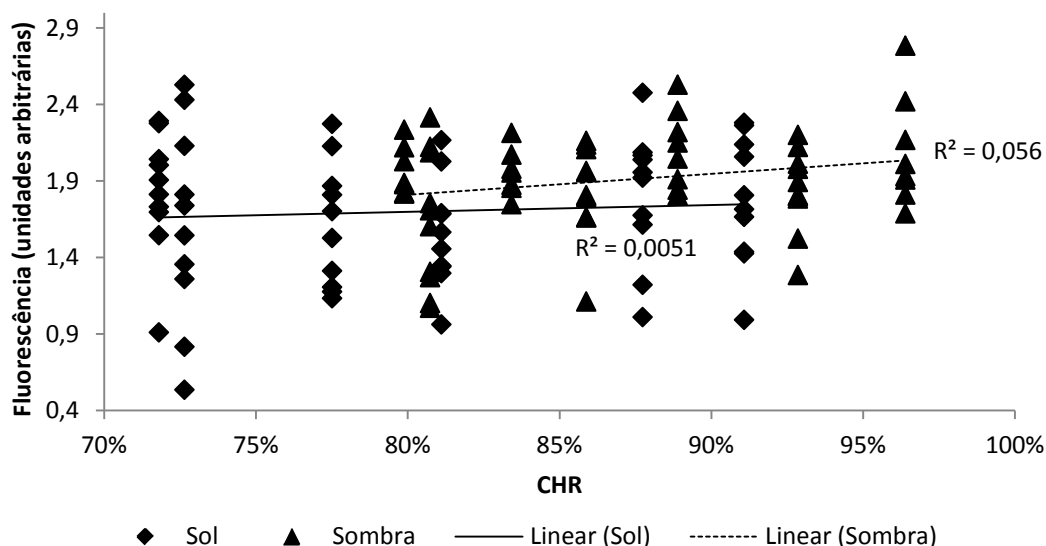


Figura 18 – Correlação entre P_i e o RWC das plantas de sol e de sombra. Os pontos correspondem às medições realizadas em 20 folíolos de plantas de sol e de sombra.

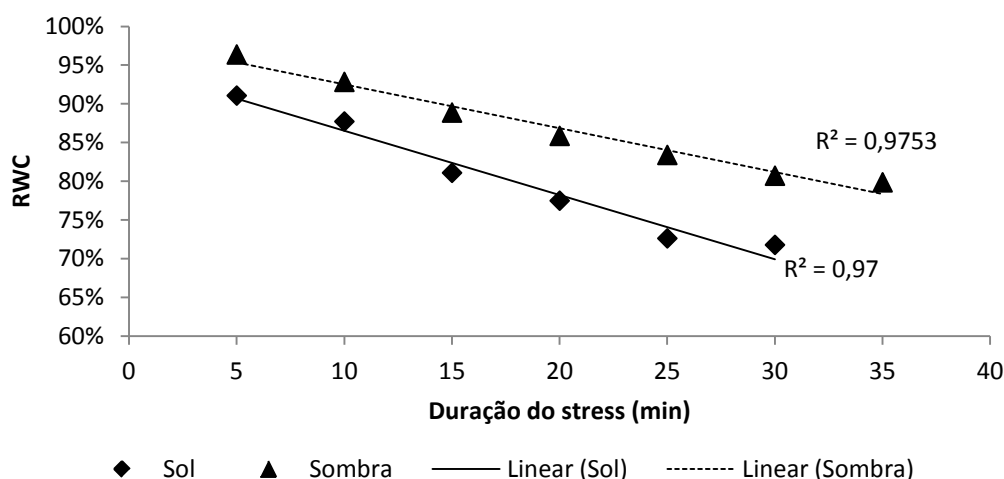


Figura 19 – RWC ao longo das medições do Teste JIP em duas plantas de Sol e duas de Sombra.

Segundo Chaves (1991) e Cornic *et al.* (1992), um déficit hídrico de 30% (RWC de 70%) é crítico para o funcionamento da maquinaria fotossintética. No nosso trabalho não obtivemos plantas com déficit hídrico superior a 30%, como tal não podemos confirmar se o índice de performance (P_i) desce de forma abrupta após este limiar de funcionamento da fotossíntese. No entanto, pelos dados obtidos (Fig.18), o decréscimo no P_i não é. Apesar disso, nas plantas de sombra, o decréscimo de P_i é mais acentuado que nas plantas de sol (declive de 1,37 nas plantas de sombra e 0,44 nas de sol), indicando que as plantas de sombra sofrem mais o stress hídrico que as de sol.

CONCLUSÕES

O seguinte esquema (Fig.20) ilustra o relacionamento entre os factores ecológicos abióticos como a temperatura, os valores de radiação fotossinteticamente activa e a humidade relativa e os aspectos morfológicos, anatómicos e bioquímicos que permitiram uma aclimação aos ambientes específicos.

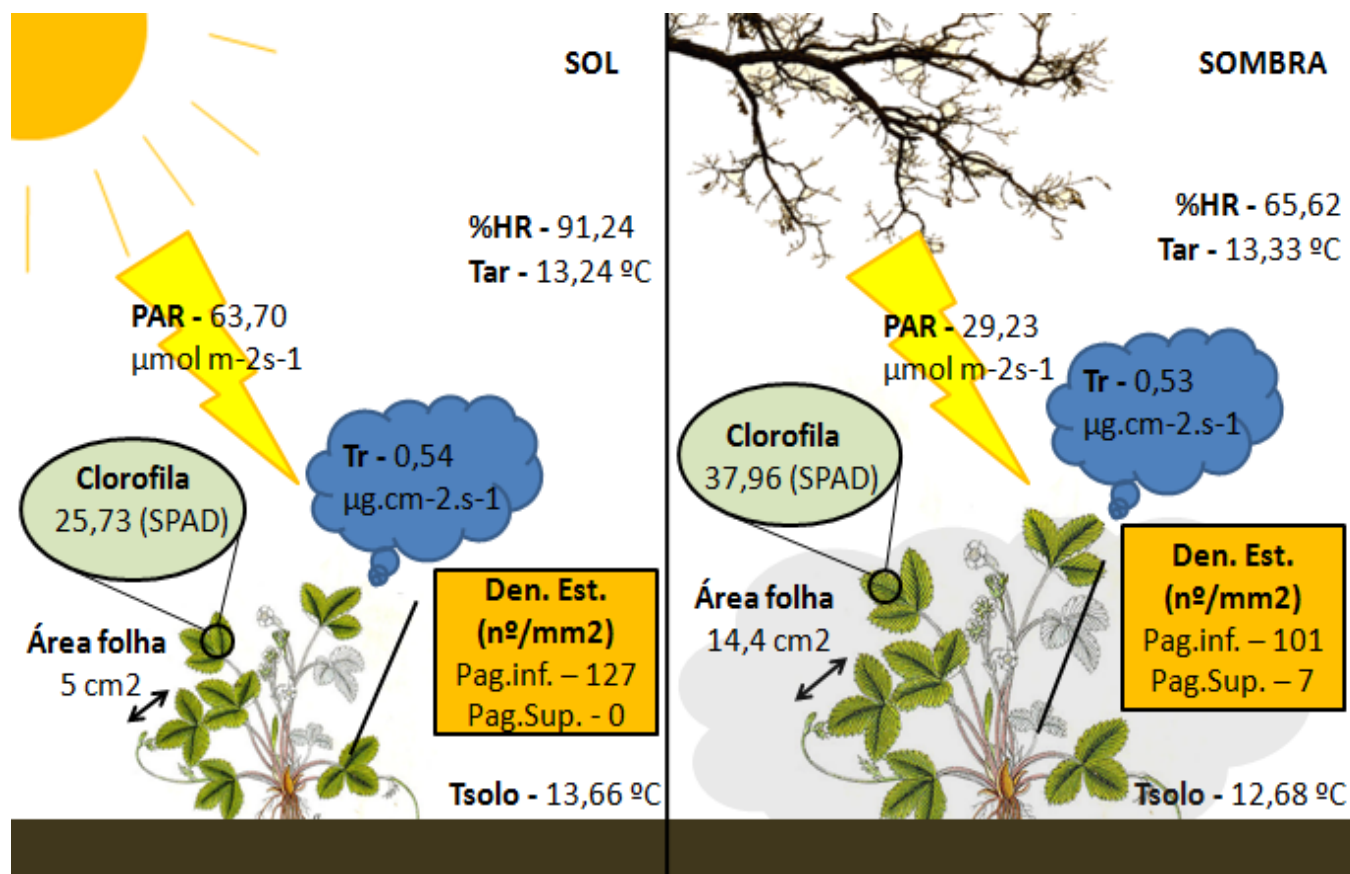


Figura 20 – Representação esquemática dos factores ecofisiológicos gerais que se relacionam na aclimação de plantas expostas ao sol e à sombra.

Começando por analisar as plantas de sol, estas têm folhas mais pequenas e com menor quantidade de clorofila de maneira a evitarem a radiação em excesso que é verificada pelos níveis maiores de PAR, presentes na Fig.20. Um menor valor dos níveis de clorofila é compensado com valores mais altos de carotenóides oxigenados (xantofilas) que ensombra os fotossistemas e dissipam a energia em excesso reflectindo muita dessa energia, para além de servirem como escoamento para radicais livres de oxigénio, a redução da área da folha faz com que esta também receba menos energia. Todas estas mudanças ajudam numa fuga ao stress pela fotoxidação dos seus fotossistemas. Valores mais altos de radiação muitas vezes são acompanhados também de algum stress hídrico, pois a temperatura sobe, e a planta tem tendência a transpirar mais para não sobreaquecer. Como defesa a planta diminui a área das suas folhas e passa todos os seus estomas para a página inferior para que transpiração seja muito menor e perca então menos água, sendo esta última o factor limitante. Já nas plantas de sombra todas as mudanças que ocorreram na planta, ao contrário das plantas de sol, foram para absorver o máximo de radiação, pois é a radiação o factor limitante para o seu crescimento e desenvolvimento neste tipo de ambientes específicos. Por isso as suas folhas têm uma maior área e maior teor de clorofila e também menores concentrações de carotenóides de maneira a conseguirem retirar o máximo proveito da radiação a que estão expostas para este tipo de ambientes. Como a água já não é um factor limitante para este tipo de ambiente, factores como a localização dos estomas modificam-se em relação as anteriores.

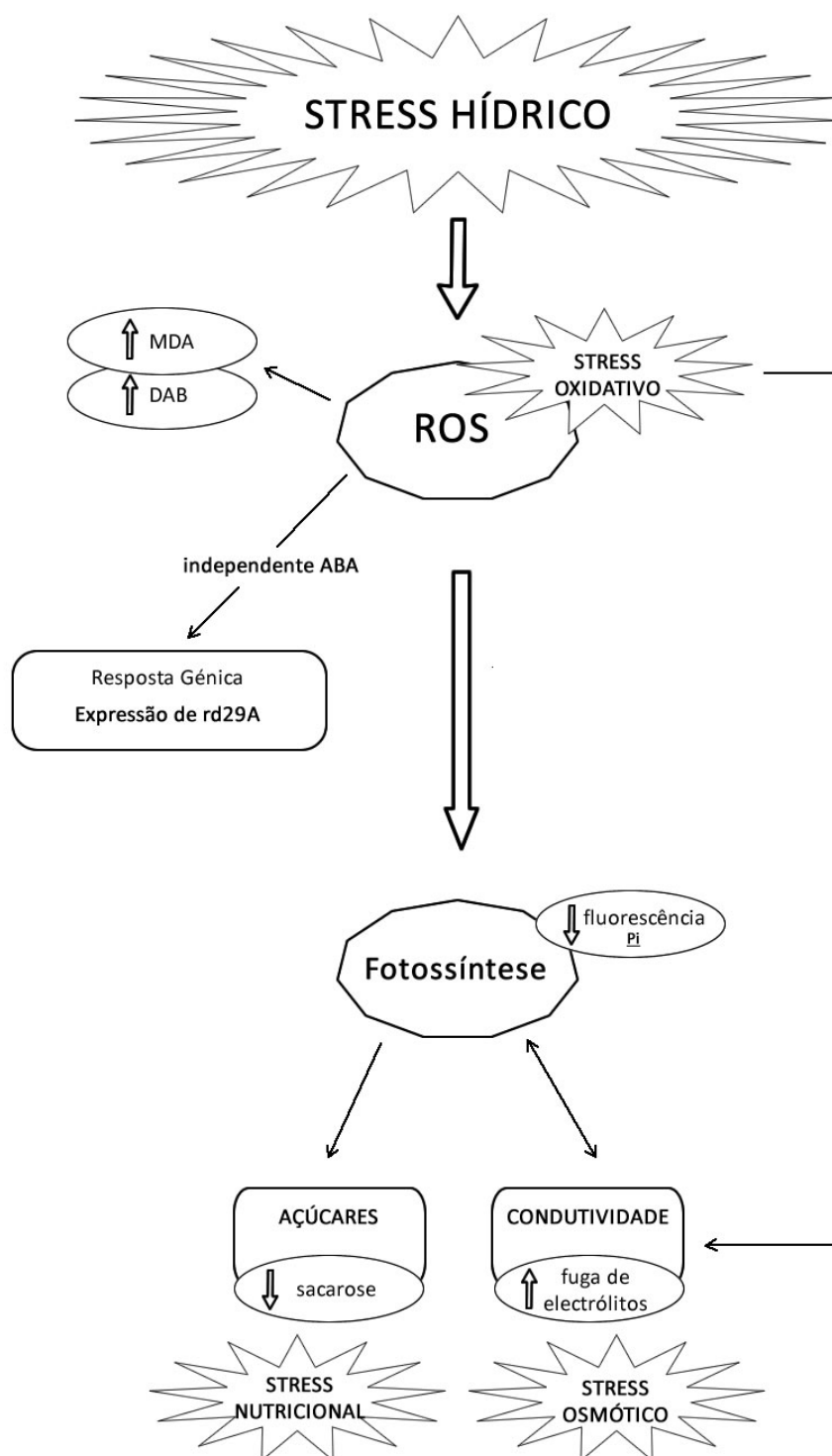


Figura 21 – Esquema explicativo da complexidade da resposta das plantas ao stress abiótico (hídrico), que provocam danos celulares causados por stress secundário, como stress osmótico e oxidativo. Os sinais de stress inicial (efeito osmótico e iónico, mudanças e fluidez da membrana) desencadeiam o processo a jusante da sinalização e controle da transcrição. Estes activam mecanismos de resposta ao stress para restabelecer a homeostase de modo a proteger e reparar as proteínas e membranas danificadas. Uma resposta inadequada a um ou a vários passos na sinalização e activação do gene podem resultar na alteração irreversível da homeostase celular e na destruição de proteínas funcionais e estruturais levando à morte celular.

O stress hídrico (Fig.21), bem como quase todos os outros stresses aplicados a plantas, intervêm directamente na acumulação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e no consequente surgimento de stress oxidativo a elas associado.

Este stress oxidativo pode ser directamente medido pela aplicação da técnica da peroxidação lipídica com MDA e da detecção qualitativa do peróxido de hidrogénio com DAB, que irão avaliar a presença destes ROS. A análise da peroxidação lipídica levou a uma percepção da importância dos fotossistemas de protecção presentes em plantas de sol, mostrando que estes são subjugados por um stress hídrico, levando a contrariar a diminuição de ROS presentes nas folhas de controlo e levando a um aumento abrupto em situação de stress. A análise com DAB mostrou-se contraditória ao esperado, evidenciando uma menor identificação de peróxido de hidrogénio nas folhas sujeitas a stress, apesar de tal ser menos evidente nas plantas de sol, talvez pela presença destes fotossistemas de protecção. Já em plantas de sombra a análise da peroxidação lipídica pelo método de MDA e de detecção qualitativa do peróxido de hidrogénio com DAB tiveram resultados semelhantes, verificando-se no controlo um máximo de stress oxidativo, no entanto em stress verifica-se uma redução do stress oxidativo. Estes valores correlacionam a produção de ROS simplesmente com a fotossíntese, onde não se verifica um escoamento de ROS significativo como nas plantas de sol, ou seja quando a peroxidação baixa, também baixa a peroxidação lipídica.

Este stress oxidativo levou à activação de respostas génicas, independentes do ácido abscísico, nomeadamente na expressão do gene *rd29A*, presente em folhas levadas a stress mas inexistente no controlo, reforçando o seu papel na retenção de água na planta durante o stress hídrico.

Esta cascata de reacção ao stress irá influenciar directamente a fotossíntese da planta, medida por dois métodos de fluorescência. Pela fluorescência modulada observou-se que, com o evoluir do stress hídrico, ocorre diminuição da fluorescência, tanto nas plantas de sol como nas de sombra. Nas plantas de sol, o rendimento quântico fotoquímico (F_v/F_m) decresce de forma aproximadamente linear. Esta diminuição dever-se-à essencialmente ao aumento da supressão não-fotoquímica (q_N) – i.e., dissipação da energia incidida por outras formas que não a fluorescência ou vias directamente relacionadas com a fotossíntese (Strasser *et al.*, 2000). Os dados obtidos através do teste JIP mostraram uma ligeira diminuição no índice de performance (P_i) em ambos os tipos de planta, mais acentuada nas plantas de sombra. Isto permite-nos inferir que as plantas de sombra sofrem mais o stress hídrico, apesar de não evidenciarem sintomas nas folhas. Este dado reforça a ideia de que este parâmetro é o mais indicado para inferir o stress nas plantas, tal como sugerido por Christen *et al.* (2007).

Estas alterações na taxa fotossintética levam a efeitos consequentes na concentração de sacarose, observando-se um aumento do gasto deste açúcar por parte da planta em stress, não restabelecido devido à diminuição da taxa de fotossíntese, provocada pelo fecho estomático. Com a diminuição da produtividade fotossintética os intermediários da síntese de sacarose acumulam, sequestrando o fosfato inorgânico que seria necessário para a translocação das trioses de fosfato, substratos para da via de síntese da sacarose, do cloroplasto para o citoplasma. Assim a concentração de sacarose diminui, visto que esta é também mais facilmente hidrolizada para fornecer glucose e frutose à planta. As plantas de sol deverão ter menores concentrações de sacarose devido a alguma inibição que ocorre pela elevada irradiação, em que haverá fecho dos estomas mais frequentemente, de modo a evitar perdas de água, que terá consequências nos níveis de carbono disponíveis para a fotossíntese.

Tal também tem efeito na medição de fuga de electrólitos, onde o stress, pela diminuição do teor hídrico relativo, leva a uma maior ruptura da membrana plasmática das células da folha e consequente libertação de electrólitos, mas também da variação da condutância estomática, provocando também alterações nas trocas gasosas e, como tal, na fotossíntese e respiração.

Podemos então inferir que ao sujeitar as plantas a stress hídrico, ocorreu uma resposta manifesta não só a nível de stress oxidativo que dele resulta, mas também ao nível de stresses nutricionais e osmóticos, demonstrando assim que a presença de um único factor de stress leva ao surgimento de muitos outros e à interligação dos mecanismos de resposta de todos eles.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, J.M.** (1986) Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. *Annual Review of Plant Physiology*. **37**: 93-136.
- Asada K.** (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **50**: 601-639.
- Bowler, C., Montagu M.V., Inze, D.,** (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology*. **43**: 83-116.
- Boyer, J.S.** (1982) Plant productivity and environment. *Science*. **218**:443-448.
- Bray E.A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E.** (2000) Responses to abiotic stresses. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. pp.1158-1249.
- Calder, I.A.** (1990). *Evaporation in the uplands*. John Wiley and Sons, pp.148.
- Carter, R.E., Klinker, K.** (1992) Variation in shade tolerance of Douglas fir, western hemlock, and western red cedar in coastal British Columbia. *Forest Ecology Management*, **55**: 87-105.
- Castroviejo, S., Laínz, M., González, G.L., Monserrat, P., Muñoz-Garmendia, F., Paiva, J.** (2001) *Flora Ibérica* (6º Vol.). Consejo Superior de Investigaciones.
- Chaves, M. M.** (1991) Effects of water deficit on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*, **42**:1-16.
- Chowdhury S.R., Choudhuri M.A.** (1985) Hydrogen peroxide metabolism as an index of water stress tolerance in jute. *Plant Physiology*. **65**: 503-507.
- Christen, D., Schönmann, S., Jermini, M., Strasser, R. J., Dèfago, G.** (2007) Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. *Environmental Experimental Botany*. **60**: 504-514.
- Cornic, G., Ghashghaie, J., Genty, B., Briantias, J. M.** (1992) Leaf photosynthesis is resistant to a mild drought stress. *Photosynthetica*. **27**: 259-309.
- Cushman, J.C., Bohnert, H.J.** (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology*. **3**:117-124.
- Damalgo, G.A., Heldwein, A.B., Neid, A.H., Grimm, E.L., Pivetta, C.R.** (2006) Maximum evapotranspiration of sweet pepper in plastic greenhouse as a function of solar radiation, temperature, relative humidity and water vapor pressure deficit of the air. *Rural Science*. **36**.
- Daubenmire, R.F.** (1974) *Plants and Environment* (3ª ed). Wiley, New York. p. 422.
- Fahl, J., Carelli, M.L., Vega, J., Magalhães, A.C.** (1994) Nitrogen and irradiance levels affecting net photosynthesis and growth of plants. *Journal of Horticultural Science*, **69**: 161-169.
- Foyer, C.H., Leandais, M., Kunert, K.J.** (1994) Photooxidative stress in plants. *Plant Physiology*. **92**: 696-717.
- Franks, P.J., Cowan, I.R., Farquhar, G.D.** (1997) The apparent feed-forward response of stomata to air vapour pressure deficit: information revealed by different experimental procedures with two rainforest trees. *Plant Cell Environment*. **20**: 142-145 .
- Fryer, M.J., Oxborough, K., Mullineaux, P.M., Baker, N.R.** (2002) Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *Journal of Experimental Botany*. **53**: 1249-1254.
- Guschina, I.A., Harwood, J.L., Smith, M., Beckett, R.P.** (2002) Absciscic acid modifies the changes in lipids brought about by water stress in the moss *Atrichum androgynum*. *New Phytologist*. **156**: 255-264.

- Hendry, G., Grime, J.** (1993) *Methods in comparative plant ecology: a laboratory manual*. Chapman and Hall.
- Hsiao, T.C.** (1973) Plant response to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*. **4**:519-70.
- Janero, D.R.** (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine*. **9**: 515-54.
- Jarvis, P.G., Ford, E.D., Grace, P.** (1980) Stomatal conductance, gaseous exchange and transpiration. *Plants and Their Atmospheric Environment*. Blackwell Scientific Publishers. pp.175-204.
- Knight H., Knight M.R.** (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science*. **6**: 262–267.
- Lambers, H., Chapin, F.S., Pons, T.L.** (2008) *Plant Physiological Ecology* (2^a Ed). Springer Science+Business Media, LLC.
- Lemoine, D., Cochard, H., Granier, A.** (2002) Within crown variation in hydraulic architecture in beech (*Fagus sylvatica*): evidence for a stomatal control of xylem embolism. *Annals of Forest Science*. **59**: 19–27.
- Liu, F., Jensen, C.R., Andersen, M.N.** (2004) Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development: its implication in altering pod set. *Field Crops Research*. **86**: 1–13.
- Lopes, B.F., Seter, T.L., McDavid, C.R.** (1998) Photosynthesis and water vapor exchange of pigeon pea leaves in response to water deficit and recovery. *Crop Science*. Madison. **28**:141-145.
- Ludlow, M.M., Muchow, R.C.** (1990) A critical evaluation of trits for improving crop yields in water-limited environments. *Advance in Agronomy*. **43**: 107-153.
- Marques da Silva, J., Bernardes da Silva, A., Pádua, M.** (2007) Modulated chlorophyll a fluorescence: a tool for teaching photosynthesis. *Journal of Biological Education*. **41**(4): 178-183.
- Monk, L.S., Fagerstedt, K.V., Crawford, R.M.M.** (1989) Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Plant Physiology*. **76**: 456–459.
- Monteith, J.L.** (1995) A reinterpretation of stomatal responses to humidity. *Plant Cell Environment*. **18**: 357–364.
- Mühlenbock, P.** (2006) Genetics and molecular mechanisms controlling Reactive Oxygen Species and Hormonal Signalling of Cell Death in Response to Environment Stress in *Arabidopsis thaliana*. Doctoral Thesis – Stockholm University, Sweden.
- Narusaka, Y., Nakashima, K., Shinwari, Z.K., Sakuma, Y., Furihata, T., Abe, H., Narusaka, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2003) Interaction between two cis-acting elements ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis* rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *The Plant Journal*. **34**: 137-148.
- Nilsen ,E.T., Orcutt, D.M.** (1996) The physiology of plants under stress. *Abiotic factors*. John Wiley & Sons Inc.
- Nogueira, R.J., Silva J.F.** (2001) Resistência estomática, tensão de água no xilema e teor de clorofila em genótipos de gravioleira. *Scientia Agrícola*, **58**: 491-495.
- Parkhurst, D. F., Loucks, O.L.** (1972) Optimal leaf size in relation to environment. *Journal of Ecology*. **60**: 505-537.
- Ponzoni, F.J., Shimabukuro, Y.E.** (2007) Sensoriamento Remoto no Estudo da Vegetação, pp. 127.
- Post, A., Vesk, M.** (1992) Photosynthesis, pigments, and chloroplast ultrastructure of an Antarctic liverwort from sun-exposed and shaded sites. *Canadian Journal of Botany*. **70**: 2259-2264.
- Prenger, J.J., Ling, P.P.** (2009) Greenhouse Condensation Control: Understanding and Using Vapor Pressure Deficit (VPD). *Ohio State University Extension Fact Sheet - Food, Agricultural and Biological Engineering*

- Printer, P.J., Jackson, R.D., Ezra, C.E., Gausman, H.W.** (1985) Sun-angle and canopy architecture effects on the spectral reflectance of six wheat cultivars. *International Journal of Remote Sensing*. **6**(12): 1813-1825.
- Qin, Y., Silva, J.A.T., Zhang, L., Zhang, S.** (2008) Transgenic strawberry: State of the art for improved traits. *Biotechnology Advances*. **26**: 219–232.
- Santos, R.F., Carlesso, R.** (1998) Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, **2**(3): 287-294
- Seel, W.E., Baker, N.R. Lee, J.A.** (1992) Analysis of the decrease in photosynthesis on desiccation of mosses from xeric and hydric environments. *Physiologia Plantarum*. **86**: 451-458
- Serrano, R., Mulet, J.M., Rios, G., Marquez, J.A., de Larrinoa, I.F., Leube, M.P., Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, A., Proft, M., Ros, R., Montesinos, C.** (1999) A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of Experimental Botany*. **50**:1023–1036
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*. **3**: 217-223
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. **58**(2): 221-227
- Siefermann-Harms, D.** (1987) The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiologia Plantarum*. **69**: 561-568
- Silva, J., Silva, A., Pádua, M.** (2007) Modulated chlorophyll a fluorescence: a tool for teaching photosynthesis. *Journal of Biological Education* . **41** (4): 178-183.
- Singh, R., MacLachlan, G.** (1983) Transport and Metabolism of Sucrose versus Hexoses in Relation to Growth in Etiolated Pea Stem. *Plant Physiology*. **71**: 531-535.
- Slovin, J.P., Schmitt, K., Folta, K.L.,** (2009) An inbred line of the diploid strawberry *Fragaria vesca* f.*semperflorens* for genomic and molecular genetic studies in the Rosaceae. *Plant Methods*. **5**:15.
- Smirnoff, N.** (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*. **125**: 27-58.
- Smirnoff, N.** (1998) Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology*. **9**:214–219.
- Smirnoff, N.** (2000) Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London (Series B), Biological Sciences*. **355**: 1455-1464.
- Strasser, R. J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M.** (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. Taylor & Francis. pp. 445-483.
- Streck, N.A.** (2003) Stomatal response to water vapor pressure deficit: an unsolved issue. *Revista Brasileira de Agrociência*. **9**(4): 317-322.
- Taiz, L., Zeiger, E.** (2002) *Plant Physiology* (3rdEd.) Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Theno, F., Méthy, M., Winkel, T.** (2002) The Photochemical Reflectance Index (PRI) as a water-stress index. *Journal of Chemometrics*. **23**: 5135–5139.
- Turhan, E., Kargi, S.P.** (2007) *Fragaria Xananassa*. *Chronica Horticulturae* . **47**.
- Vassey, T.L., Sharke, T.D.** (1989) Mild Water Stress of *Phaseolus vulgaris* Plants Leads to Reduced Starch Synthesis and Extractable Sucrose Phosphate Synthase Activity. *Plant Physiology*. **89**: 1066-1070.

- Wada, M., Kagawa, T., Sato, Y.** (2003) Chloroplast movement. *Annual Review of Plant Biology*. **54**: 455-468.
- Wang, W.X., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A.** (2001) Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Horticulturae*. **560**: 285-292.
- Waring, R.H.** (2004) Tree Physiology: Stress. In: Burley, J., Evans, J., Youngquist, J. (eds.), pp. 1628-1632, *Encyclopedia of Forest Sciences*. Elsevier Science Ltd., London.
- Whitlow, T., Bassuk, N., Ranney, T., Reichert D.** (1992) An Improved Method for Using Electrolyte Leakage to Assess Membrane Competence in Plant Tissues. *Plant Physiology*. **98**: 198-205.
- Winter, H., Huber, S.C.** (2000) Regulation of Sucrose Metabolism in Higher Plants: Localization and regulation of Activity of Key Enzymes. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **19**(1): 31-67.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (1993) Arabidopsis DNA Encoding Two Desiccation-Responsive *rd29* Genes. *Plant Physiology*. **101**: 1119-1120.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (1993) Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *The Plant Cell*. **6**: 251-264.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (1994) A Novel cis-Acting Element in an *Arabidopsis* Genes Involved in Responsiveness to Drought, Low temperature, or High-Salt Stress. *The Plant Cell*. **6**: 251-264.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Shinozaki, K.** (1995) Regulation of Genes that are Induced by Drought Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*. **108**: 127-136.
- Yang, C.M., Hsu, J.C., Shih, C.F.** (1994) Response of chlorophyll a/b ratios in Yuan-Yang lake bryophytes to the alteration of light intensity. *Proceedings of the National Science Council: Part B: Life Sciences*. **18**: 134-137.
- Zhang, J., Kirkham, M.B.** (1994) Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiology*. **35**: 785-791.
- Zhu, J.K., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A.** (1997) Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Critical Review in Plant Sciences*. **16**: 253-277.
- Živčák, M., Brestič, M., Olšovská, K., Slamka, P.** (2008) Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum*. *Plant Soil & Environment*. **54**(4): 133-139.