

Sensibilidade estomática ao ABA em função do pH e de níveis de Ca^{2+} , NO_3^- e PO_4^{3-} na seiva do xilema

Maria Neudes Sousa de Oliveira^{1*}, Marco Antonio Oliva², Carlos Alberto Martínez², Helenice Mercier³ and Marco Aurélio Pedron e Silva²

¹Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Montes Claros, CEP 39401-089, Montes Claros, MG, Brasil; ²Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36571-000, Viçosa, MG, Brasil; ³Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, CP 11461, CEP 05422-970, Cidade Universitária, São Paulo, Brasil.

*Corresponding author: mneudes@unimontes.br

Received: 17/10/2001, Accepted 18/07/2002

A hipótese de que a sensibilidade estomática ao ácido abscísico (ABA) possa ser influenciada pelas características da seiva xilemática, como pH e concentração de Ca^{2+} , NO_3^- e PO_4^{3-} , foi testada em plantas de *Lycopersicon esculentum* L. var. Santa Clara submetidas a estresse hídrico induzido pela adição de PEG 6000 à solução nutritiva. Estimou-se a sensibilidade estomática ao ABA pela relação transpiração/ABA xilemático. Plantas intactas foram submetidas a estresse hídrico rápido e lento e determinaram-se as variações de pH e as concentrações de Ca^{2+} , NO_3^- e PO_4^{3-} na seiva do xilema. Também se estudaram os efeitos de diversas concentrações de Ca^{2+} , NO_3^- e PO_4^{3-} sobre a transpiração em folhas destacadas imersas em seiva artificial contendo ABA exógeno. Nas plantas intactas submetidas a estresse rápido, o aumento nas concentrações de Ca^{2+} , NO_3^- e PO_4^{3-} levou a um gradativo acréscimo da sensibilidade estomática ao ABA contido no xilema. Com estresse lento, o Ca^{2+} não influenciou a sensibilidade estomática ao ABA. Em folhas destacadas, a concentração de ABA exógeno necessário para promover redução na taxa transpiratória foi de 2,5 μM . A presença de Ca^{2+} na seiva xilemática estimulou o efeito inibitório sobre a taxa transpiratória, promovido pelo ABA. O aumento nas concentrações de Ca^{2+} e NO_3^- na seiva artificial intensificou o fechamento estomático induzido por ABA.

Palavras-chave: *Lycopersicon esculentum* L., estresse hídrico, seiva xilemática, transpiração.

Stomatal sensitivity to ABA related to pH and NO_3^- , PO_4^{3-} and Ca^{2+} levels of xylem sap: Stomatal sensitivity to abscisic acid (ABA) can be modified by variations in the xylem sap traits such as pH, Ca^{2+} , NO_3^- and PO_4^{3-} concentrations. In order to verify this hypothesis, plants of *Lycopersicon esculentum* L. cv. Santa Clara were submitted to sudden and slow onset of water stress by PEG 6000 addition to the nutritive solution. The stomatal sensitivity to ABA was estimated by changes in the transpiration/xylematic ABA ratio. To evaluate the inhibitory effect of Ca^{2+} , NO_3^- and PO_4^{3-} at different concentrations, detached leaves were submerged in artificial sap containing exogenous ABA. In intact plants, under sudden stress treatment, the ion concentration increment gradually raised the stomatal sensitivity to xylem ABA. Under slow stress treatment the stomatal response to ABA was not modified by Ca^{2+} . A dose of 2.5 μM exogenous ABA was needed to induce a drop in the transpiration rate of detached leaves. The presence of Ca^{2+} in the transpiration flux stimulated the ABA inhibitory effect on transpiration rate. The stomatal closure response to ABA was intensified when Ca^{2+} and NO_3^- were added to the artificial sap.

Key words: *Lycopersicon esculentum* L., transpiration, water stress, xylem sap.

INTRODUÇÃO

Em condições de laboratório, há, freqüentemente, boa correlação entre o aumento da resistência estomática e o da concentração de ácido abscísico (ABA) na seiva do xilema, em plantas submetidas a déficit hídrico (Tardieu

e Davies, 1993; Thompson et al., 1997; Wilkinson et al., 1998). No entanto, em condições de campo, pode ocorrer grande variação na abertura estomática para um mesmo nível de ABA na seiva (Schurr et al., 1992; Correia e Pereira, 1995).

Segundo Tardieu e Davies (1992; 1993), as respostas estomáticas ao ABA do xilema são diretamente afetadas pelo estado hídrico da folha, alterando a sensibilidade das células-guarda ao ABA. Reduções muito pequenas no potencial hídrico foliar ($< -0,06$ MPa) (Thompson et al., 1997), valor abaixo do normalmente encontrado em planta no seu ambiente de crescimento, são suficientes para potencializar a resposta dos estômatos ao ABA. Também é possível encontrar variação na sensibilidade estomática ao ABA do xilema em potenciais hídricos foliares inalterados.

Estudos recentes mostram que outros fatores, como estado nutricional da planta (Jeschke et al., 1997), composição iônica (Schurr et al., 1992) e pH da seiva xilemática (Thompson et al., 1997) influenciam as respostas estomáticas ao ABA. Tem-se proposto que o aumento no pH apoplástico, mediando alterações na distribuição de ABA, possa funcionar como um sinal químico primário para as folhas, indicando uma redução na disponibilidade de água no solo. Reduções na taxa transpiratória associadas ao aumento no pH apoplástico já se observaram em algumas espécies (Wilkinson e Davies, 1997; Thompson et al., 1997; Wilkinson et al., 1998), as quais tinham níveis de ABA correspondentes aos encontrados em plantas irrigadas. Alterações na composição iônica da seiva do xilema contribuem para as variações no pH da seiva em plantas submetidas à deficiência hídrica (Gollan et al., 1992; Schurr et al., 1992). Dos estudos sobre essas alterações, concluiu-se que as concentrações de Ca^{2+} , NO_3^- e PO_4^{3-} podem contribuir na sinalização raiz-parte aérea em plantas submetidas à deficiência hídrica, alterando seja a sensibilidade estomática ao ABA, seja o pH da seiva e, conseqüentemente, a distribuição do ABA.

Este trabalho pretendeu avaliar a sensibilidade dos estômatos ao ABA xilemático de plantas intactas de tomateiro submetido a estresse hídrico, em função de alterações do pH e concentrações de Ca^{2+} , NO_3^- e PO_4^{3-} da seiva decorrente do estresse e em folhas destacadas em que os mesmos íons e ABA foram aplicados exogenamente via seiva artificial.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições de cultivo: Plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L. var. Santa Clara) foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos contendo duas plantas, com ca-

pacidade para 2,5 L de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), utilizada com metade da concentração e pH 6,5. A cada dois dias, toda a solução dos vasos era substituída por uma nova e o volume de água perdida, repostado diariamente com água destilada. Plantas com 40 dias após a semeadura foram transferidas para a sala de crescimento com fotoperíodo de 10 h (com início às 8:00 h) e densidade de fluxo fotossintético (DFF), ao nível das plantas, de $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura do ar entre 20 e 23 °C e umidade relativa do ar entre 60 e 63 %, onde realizaram-se todas as medições. Para evitar o aquecimento foliar, colocou-se uma lâmina de água de 0,05 m entre a fonte de luz e as plantas. Não se observaram diferenças entre a temperatura foliar e a do ar.

Indução do estresse: Três dias após a transferência das plantas para a sala de crescimento (aos 43 d de idade), dois tipos de estresse hídrico moderado foram induzidos, adicionando-se polietileno glicol 6000 (PEG 6000) à solução nutritiva: estresse rápido e lento.

O estresse rápido foi induzido mediante a adição de 7 % de PEG 6000 à solução nutritiva ($-0,083$ MPa). Após 1, 2, 3, 4 e 5 h da adição de PEG à solução, avaliou-se a taxa transpiratória (E) e realizou-se a coleta de seiva, na qual se determinou o pH e teores de Ca^{2+} , NO_3^- , PO_4^{3-} e ABA.

O estresse lento foi induzido por meio da aplicação gradativa, diária e crescente de PEG 6000 à solução nutritiva: dia 1 (1 % de PEG), dia 2 (3 % de PEG), dia 3 (5 % de PEG), dia 4 (7 % de PEG). Nessas concentrações de PEG, os potenciais osmóticos das soluções foram de $-0,006$; $-0,024$; $-0,049$ e $-0,083$ MPa respectivamente, suficientes para induzir o início do fechamento dos estômatos. Vinte e quatro horas após a adição do PEG 6000 à solução nutritiva, sempre às 9:00 h, avaliou-se a taxa transpiratória (E) e realizou-se a coleta de seiva para a determinação de pH, teores de Ca^{2+} , NO_3^- , PO_4^{3-} e ABA.

Coleta e análise da seiva do xilema: Para essa coleta efetuou-se uma excisão no caule a 0,05 m acima do colo da planta, destacando-se a parte aérea, e lavou-se o corte com água destilada para evitar possíveis contaminações da seiva com substâncias contidas no suco das células rompidas durante a excisão. Imediatamente, colocou-se o exsudato, coletado da parte basal da planta com o auxílio de uma pipeta Pasteur, em N_2 líquido, armazenando-o a -20 °C. A separação do ABA da seiva foi feita em HPLC

e, a quantificação, por um teste imunológico (ELISA), usando anticorpos monoclonais, segundo o método descrito por Peres et al. (1997). O teor de Ca^{2+} foi analisado por absorção atômica. Os teores de NO_3^- e PO_4^{3-} foram determinados espectrofotometricamente, conforme Cataldo et al. (1975) e Linderman (1958), respectivamente.

Sensibilidade estomática ao ABA xilemático de plantas estressadas: A sensibilidade estomática ao ABA contido na seiva do xilema das plantas submetidas aos estresses hídrico lento e rápido foi calculada de acordo com Schurr et al. (1992) pela relação E (avaliada na quinta folha) / $[\text{ABA}]_{\text{xilema}}$

A sensibilidade estomática ao ABA foi avaliada em função das variações de pH e dos teores de Ca^{2+} , NO_3^- e PO_4^{3-} da seiva do xilema das plantas submetidas aos estresses.

Efeito Ca^{2+} , NO_3^- e PO_4^{3-} sobre a sensibilidade estomática ao ABA exógeno em folhas destacadas: Para avaliar o efeito da concentração de Ca^{2+} , NO_3^- e PO_4^{3-} sobre E de folhas destacadas, utilizou-se a seiva artificial de Wilkinson et al. (1998), em dois pHs (6,0 e 7,0). Os tratamentos foram seiva artificial completa, constituída de 1,0 mM de PO_4^{3-} , 1,0 mM de Ca^{2+} e 3,0 mM de NO_3^- , seiva artificial com metade da concentração de fosfato (0,5 mM de PO_4^{3-} , 1,0 mM de Ca^{2+} e 3,0 mM de NO_3^-), seiva artificial com metade da concentração de nitrato (1,0 mM de PO_4^{3-} , 1,0 mM de Ca^{2+} e 1,5 mM de NO_3^-) e seiva artificial com o triplo da concentração de cálcio (1,0 mM de PO_4^{3-} , 3,0 mM de Ca^{2+} e 3,0 mM de NO_3^-).

Estudaram-se os efeitos do ABA exógeno sobre as respostas estomáticas nos diversos níveis de Ca^{2+} , PO_4^{3-} e NO_3^- no fluxo xilemático, adicionando-se 2,5 μM de (\pm)-cis-trans-ABA sintético (Sigma) a cada uma das soluções.

Avaliação da taxa transpiratória: Em todos os tratamentos essa taxa (E) foi avaliada na quinta folha (destacada ou não) das plantas mantidas em sala de crescimento. Nos tratamentos com folhas destacadas, elas foram imersas em água destilada, selecionadas para a mesma E inicial, e imediatamente imersas nas soluções citadas no item anterior. Avaliou-se E 0; 0,5; 1,5; 2,5; 3,5 e 4,5 h após a imersão. As avaliações, realizadas na superfície abaxial, por ser mais responsiva ao ABA

(Correia et al., 1999), foram iniciadas entre 8:00 e 9:00 h e realizadas com um analisador de gases ao infravermelho portátil (modelo LCA-2, ADC, UK). A DFF durante as medições foi de 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Análise estatística: O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Cada valor representa a média de quatro avaliações em plantas diferentes, exceto para as análises de ABA em que foram utilizadas amostras compostas, resultantes de quatro amostras simples. Os dados foram submetidos à análise da variância pelo teste F, a 5 % de probabilidade, e a diferença entre as médias, calculada pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sensibilidade estomática ao ABA xilemático de plantas estressadas: Plantas de tomateiro submetidas a estresse hídrico lento e rápido mostraram uma queda na razão $E / [\text{ABA}]_{\text{xilema}}$ indicando aumento na sensibilidade estomática ao ABA (figura 1). A sensibilidade das células-guarda ao ABA pode ser determinada pela relação transpiração (E) ou condutância estomática (g_s) com a concentração do ABA no xilema. Ensaio preliminares, entretanto, encontraram uma correlação linear positiva entre E e g_s ($y = 7,0072x + 1,6201$; $R^2 = 0,91$). As concentrações de ABA foram relacionadas com a taxa transpiratória, em vista de os valores de E mostrarem maior estabilidade nas determinações e menores coeficientes de variação (figura 1).

Diversos autores afirmam, entretanto, que a relação $E / [\text{ABA}]_{\text{xilema}}$ parece estar influenciada por fatores relacionados com o estado hídrico da planta, nutriente, pH, etc. (Tardieu e Davies, 1993; Correia e Pereira, 1995; Thompson et al., 1997; Correia et al, 1999).

Nas plantas submetidas a estresse rápido (horas após a adição de PEG), a redução significativa ($p > 0,05$) na razão $E / [\text{ABA}]_{\text{xilema}}$ com o aumento de NO_3^- e PO_4^{3-} na seiva foi gradativa (figura 1). Nesse caso, maiores variações nos níveis desses nutrientes foram necessárias para uma resposta estomática numa dada concentração de ABA na seiva. Nas plantas submetidas a estresse lento (dias após a adição de PEG), a queda na $E / [\text{ABA}]_{\text{xilema}}$ foi acentuada, indicando que pequenas variações na concentração dos íons na seiva do xilema, principalmente de NO_3^- , podem alterar a resposta estomática ao ABA presente na seiva. Isso pode indicar que reduções na taxa

transpiratória das plantas submetidas a esse tipo de estresse dependam de menos ABA na seiva se os níveis desses nutrientes aumentarem. É possível que alterações na concentração de tais ânions alterem a capacidade tampão da seiva e as respostas estomáticas ao ABA. Já foi observado que em *Helianthus annuus* o aumento no suprimento de NO_3^- em plantas intactas promove um aumento na sensibilidade estomática ao ABA (Mengel et al., 1994) e que em *Ricinus communis* o PO_4^{3-} é o íon que mais contribui para a capacidade tampão da seiva do xilema (Schurr e Schulze, 1995).

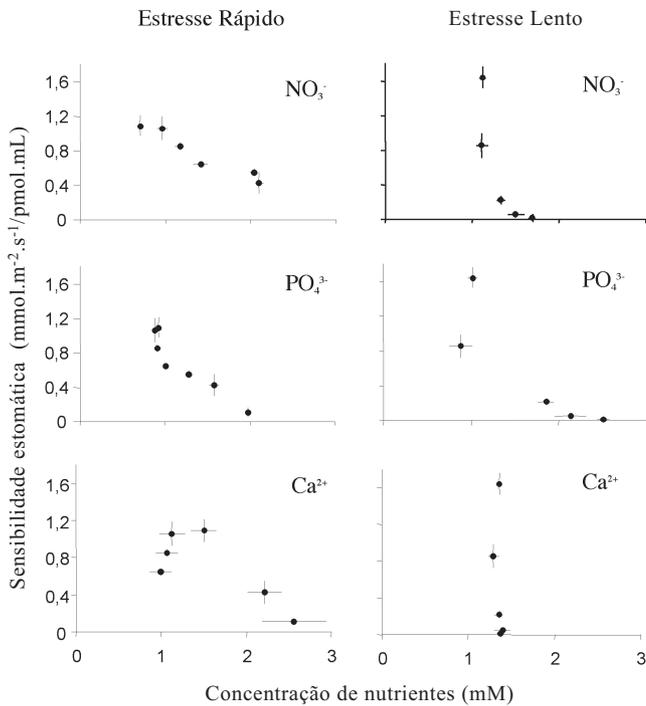


Figura 1. Variação da sensibilidade estomática (transpiração/ $[\text{ABA}]_{\text{xilema}}$) em plantas intactas de tomateiro submetidas a estresse hídrico rápido e lento em função das concentrações de Ca^{2+} , NO_3^- e PO_4^{3-} encontradas na seiva do xilema. As barras horizontais representam o desvio padrão da concentração de nutrientes e as verticais, o desvio padrão da sensibilidade estomática.

A velocidade do estresse também influenciou a concentração de Ca^{2+} na seiva do xilema. Estresses rápidos e lentos apresentaram tendências diferentes quanto ao acúmulo de Ca^{2+} na seiva do xilema. Em ambos, houve mudanças na sensibilidade dos estômatos em relação ao ABA, sendo, no estresse rápido, a menor sensibilidade atingida na concentração de 1,5 mM de Ca^{2+} . Concentrações maiores e menores de Ca^{2+} no xilema aumentaram a sensibilidade ao ABA. Esses resultados confirmam que, em tomate, como em *Lupinus albus* e *Vicia faba*, a sen-

sibilidade estomática esta relacionada com concentração de Ca^{2+} no xilema. (Ridolf et al., 1994; Correia e Pereira, 1995; Correia et al., 1999). Entretanto, quando o estresse foi aplicado em forma lenta a sensibilidade ao ABA variou significativamente ($p > 0,05$) numa estreita margem de concentrações de Ca^{2+} na seiva do xilema.

Os efeitos das alterações de pH e composição de nutrientes na seiva do xilema de plantas submetidas à deficiência hídrica sobre a sensibilidade estomática ao ABA foram estudados em algumas espécies (Gollan et al., 1992; Schurr et al., 1992; Wilkinson e Davies, 1997). Foi proposto que o pH influencia a sensibilidade estomática ao ABA, por alterar a sua distribuição entre os diferentes compartimentos foliares, aumentando a concentração de ABA disponível para os receptores das células-guarda. O pH alcalino serviria tanto como sinal da deficiência hídrica como um sequestrador de ABA para compartimentos alcalinos do apoplasto. Enquanto os resultados de Wilkinson e Davies (1997) mostraram um aumento da sensibilidade ao ABA em pH mais alcalino, os de Schurr et al. (1992) indicaram uma redução na sensibilidade estomática ao ABA. No presente experimento, ao contrário dos nutrientes, o aumento no pH da seiva do xilema, observado nas plantas submetidas a estresse rápido, apresentou baixa relação ($R^2 = 0,24$) com a sensibilidade estomática ao ABA presente na seiva (figura 2), indicando que, no tomateiro, o pH *per se* não seria um sinalizador primário entre raiz e parte aérea em plantas submetidas a estresse hídrico. Nas plantas submetidas a estresse lento, não ocorreu variação significativa ($p > 0,05$) no pH da seiva xilemática (figura 2).

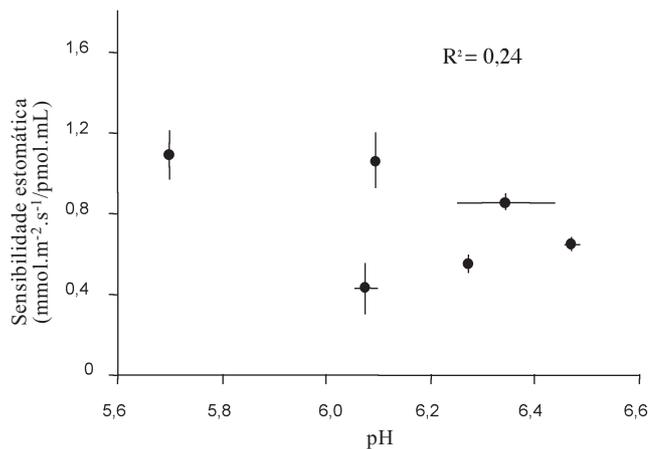


Figura 2. Variação da sensibilidade estomática (transpiração/ $[\text{ABA}]_{\text{xilema}}$) em plantas de tomateiro submetidas a estresse hídrico rápido em função do pH da seiva do xilema. As barras horizontais representam o desvio padrão do pH e as verticais, o desvio padrão da sensibilidade estomática.

Resposta estomática ao ABA exógeno: Os estudos sobre o papel do ABA na comunicação raiz-parte aérea têm sido realizados mediante o suprimento de ABA exógeno para plantas inteiras, folhas destacadas ou epidermes isoladas. A presença de ABA exógeno em tomateiro promoveu redução significativa ($p > 0,05$) de E , 2 h após a imersão das folhas na seiva artificial de Wilkinson et al. (1998), apenas quando sua concentração atingiu 2,5 μM (figura 3). Concentrações de 0,01 e 0,1 μM não alteraram E , mesmo após 3 h de imersão. Em plantas intactas de *Helianthus annuus* (Schurr et al., 1992) e de *Lupinus albus* (Correia et al., 1999), concentrações na faixa de 0,1 a 1,0 μM promoveram também reduções na condutância estomática. Essas observações indicam que a sensibilidade estomática ao ABA é maior em plantas intactas, quando comparada a folhas destacadas (Correia et al., 1999) e que plantas intactas devem necessitar de menor nível de ABA para promover o fechamento estomático. Concentrações maiores de 2,0 e 2,0 μM de ABA foram empregadas por Heckenberger et al. (1996) e Correia et al. (1999) em folhas destacadas de *Lupinus albus* e *Helianthus annuus*, respectivamente, para causar reduções de E . Os mesmos autores consideram que essas concentrações estão muito acima da concentração necessária para promover a redução de E em plantas intactas das referidas espécies e que a resposta estomática ao ABA se encontra mais relacionada ao fluxo de ABA no xilema que a concentração (Heckenberger et al., 1996). Quando folhas são destacadas, o fluxo é alterado (Correia et al., 1999).

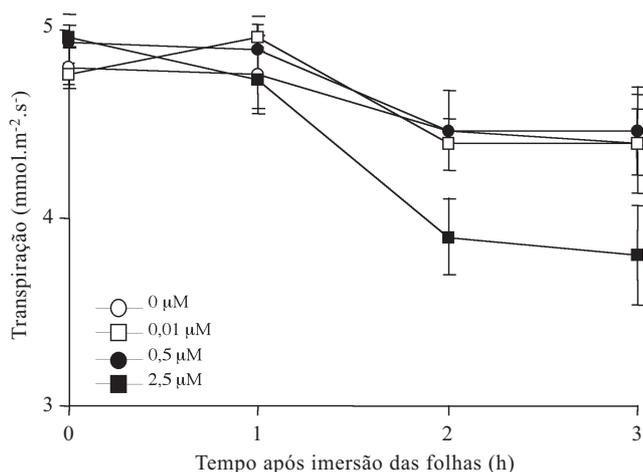


Figura 3. Taxa transpiratória (E) de folhas destacadas de plantas de tomate não estressadas e imersas em seiva artificial, pH 6,0, contendo diferentes doses de ABA.

Efeito do Ca^{2+} , NO_3^- e PO_4^{3-} sobre as respostas estomáticas ao ABA exógeno em folhas destacadas: Independentemente da concentração de nutrientes na seiva xilemática, reduções significativas ($p > 0,05$) de E ocorreram em folhas imersas em solução contendo ABA (figura 4). Observaram-se os maiores efeitos do ABA sobre as reduções de E em folhas imersas nas soluções contendo as maiores concentrações de NO_3^- e Ca^{2+} (3,0 mM), quando comparadas às menores concentrações (1,0 mM). No pH alcalino (7,0) e em 3,0 mM de NO_3^- e Ca^{2+} , a redução de E ocorreu mesmo na ausência de ABA, 5 e 3,5 h após a imersão das folhas, respectivamente. Esse resultado concorda com a hipótese de que o aumento no pH da seiva do xilema, que geralmente ocorre em plantas crescendo em solo com reduzida disponibilidade de água (Wilkinson et al., 1998), pode promover o fechamento estomático, por alterar a distribuição de ABA sem requerer sua síntese (Schurr et al., 1992). Em algumas espécies, o pH pode afetar a abertura estomática antes do acúmulo de ABA no xilema. Em outras, o contrário pode ocorrer.

Em plantas intactas são descritas correlações positivas entre a sensibilidade estomática ao ABA e as concentrações de Ca^{2+} e NO_3^- na seiva do xilema. Observações de que um aumento no suprimento de NO_3^- para plantas intactas e para folhas destacadas promove um aumento no pH do apoplasto foliar (Mengel et al., 1994; Hoffmann e Kosegarten, 1995) e de um aumento da sensibilidade estomática ao ABA do xilema associado ao aumento na concentração de Ca^{2+} (Ridolf et al., 1994) podem explicar as maiores reduções de E em folhas de tomateiro imersas em solução alcalina contendo 3,0 mM de NO_3^- ou Ca^{2+} , em relação às imersas em solução com 1,0 mM, pH 6,0.

Ao contrário do que ocorreu em plantas intactas (figura 1), as alterações nas concentrações de PO_4^{3-} (0,5 e 1,0 mM) na seiva artificial não mostraram efeitos significativos ($p > 0,05$) sobre a resposta estomática ao ABA em folhas destacadas (figura 4). O mesmo resultado foi observado por Hoffmann e Kosegarten (1995) em folhas destacadas de girassol.

O Ca^{2+} é um mensageiro secundário envolvido na regulação estomática, sendo o fechamento estomático promovido por ABA precedido por um aumento de sua concentração nas células-guarda (McAinsh et al., 1990). Aumento no Ca^{2+} intracelular inibe a atividade da H^+ -

ATPase (Qiu e Su, 1998), o que pode levar a um aumento no pH apoplástico (Fromard et al., 1995; Patonnier et al., 1999). McAinsh et al. (1990) já haviam observado em plantas sob déficit hídrico, um aumento no pH apoplástico associado ao da concentração de Ca^{2+} citossólico. Além de inibir a atividade da H^+ -ATPase, o aumento no Ca^{2+} livre citossólico inativa os canais de influxo de K^+ e ativa canais de efluxo de Cl^- da membrana plasmática, provocando o fechamento estomático (Blatt e Grabov, 1997). Sendo assim, um aumento no pH apoplástico resultante do acréscimo da concentração de Ca^{2+} na solução de imersão pode ter promovido um aumento na sensibilidade estomática ao ABA em folhas destacadas de tomateiro, explicando as maiores reduções de E mesmo na ausência de ABA. O ABA e o Ca^{2+} parecem agir sinergisticamente sobre o fechamento estomático, observação esta proposta também por Silva et al. (1985) e Wilmer e Fricker (1996).

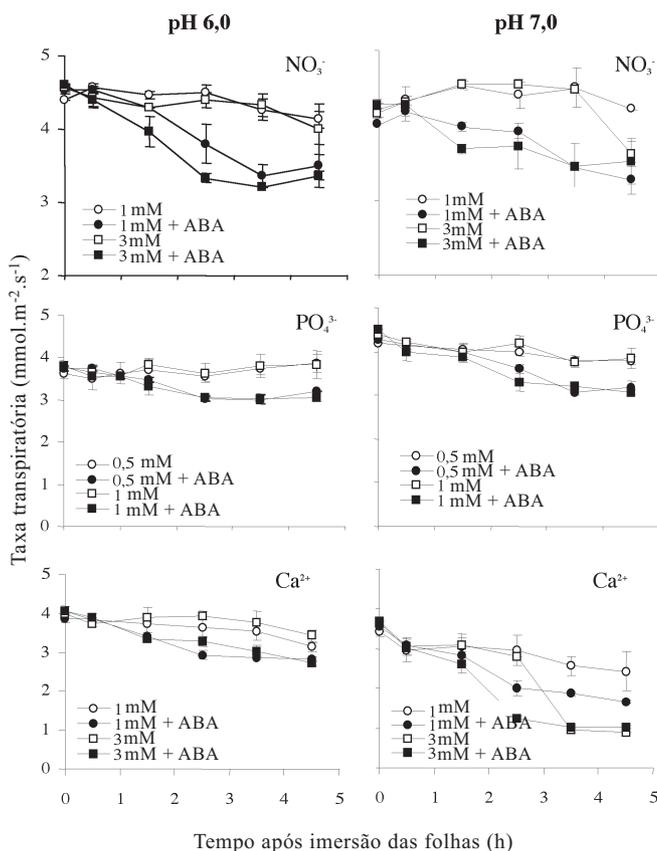


Figura 4. Efeito dos níveis de NO_3^- , PO_4^{3-} e Ca^{2+} sobre a taxa transpiratória induzida pelo ABA ($2,5 \mu\text{M}$) aplicado em folhas destacadas de tomateiro e imersas em seiva artificial pH 6,0 e 7,0.

Agradecimentos: Os autores agradecem o apoio financeiro ao CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

REFERÊNCIAS

- Blatt MR, Grabov A (1997) Signalling gates in abscisic acid-mediated control of guard cell ion channels. *Physiol. Plant.* 100:481-490.
- Cataldo DA, Schrader LE, Youngs VL (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Soil Sci. Plant Anal. Commun.* 6:71-80.
- Correia MJ, Pereira JS (1995) The control of leaf conductance of white lupin by xylem ABA concentration decreases with the severity of water deficits. *J. Exp. Bot.* 46:101-110.
- Correia MJ, Rodrigues ML, Osório ML, Chaves MM (1999) Effects of growth temperature on response of lupin stomata to drought and abscisic acid. *Aust. J. Plant Physiol.* 26:549-555.
- Fromard L, Babin V, Fleurat-Lessard P, Fromont JC, Serrano R, Bonnemain JL (1995) Control of vascular sap pH by the vessel-associated cells in woody species. *Plant Physiol.* 108:913-918.
- Gollan T, Schurr U, Schultze ED (1992) Stomatal responses to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. I. The concentration of cations, anions, amino acids and pH of the xylem sap. *Plant Cell Environ.* 15:551-559.
- Heckenberger U, Schurr U, Schulze ED (1996) Stomatal response to abscisic acid fed into the xylem of intact *Helianthus annuus* (L.) plants. *J. Exp. Bot.* 47:1405-1412.
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station, Berkeley 32p. (Circular 347).
- Hoffmann B, Kosegarten H (1995) FITC-dextran for measuring apoplast pH and apoplast pH gradients between various cell types in sunflower leaves. *Physiol. Plant.* 95:327-335.
- Jeschke WD, Peuke AD, Pate JS, Hartung W (1997) Transport, synthesis and catabolism of abscisic acid (ABA) in plants of castor bean (*Ricinus communis* L.) under phosphate deficiency and moderate salinity. *J. Exp. Bot.* 48:1727-1736.

- Linderman W (1958) Observations on the behaviour of phosphate compounds in *Clorella* at transition from dark to light. In: Proceedings of the United Nations International Conference on the Peacefull Uses of Atomic Energy, 2, 1958, Geneva, vol. 24, pt.1, p.8-15: Isotopes in Biochemistry and Physiology.
- McAinsh MR, Brownlee C, Hetherington AM (1990) Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca^{2+} precedes stomatal closure. *Nature* 342:186-188.
- Mengel K, Planker R, Hoffmann B (1994) Relationship between leaf apoplast pH and iron chlorose of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Plant Nutr.* 17:1053-1065.
- Patonnier MP, Peltier JP, Marigo G (1999) Drought-induced increase in xylem malate and mannitol concentrations and closure of *Fraxinus excelsior* L. stomata. *J. Exp. Bot.* 50:1223-1229.
- Peres LEP, Mercier H, Kerbauy GB, Zaffari GR (1997) Níveis endógenos de AIA, citocininas e ABA em uma orquídea acaule e uma bromélia sem raiz, determinado por HPLC e ELISA. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 9:169-176.
- Qiu Q, Su X (1998) The influence of extracellular-side Ca^{2+} on the activity of the plasma membrane H^{+} -ATPase from wheat roots. *Aust. J. Plant Physiol.* 25:923-928.
- Ridolf M, Garrec JP, Louguet P, Lafray D (1994) Effects of potassium and calcium deficiencies on stomatal functioning in intact leaves of *Vicia faba*. *Can. J. Bot.* 72:1835-1842.
- Schurr U, Gollan T, Schultze ED (1992) Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. *Plant Cell Environ.* 15:561-567.
- Schurr U, Schultze ED (1995) The concentration of xylem sap constituents in root exudate, and in sap from intact, transpiring castor bean plants (*Ricinus communis* L.). *Plant Cell Environ.* 18:409-420.
- Silva DLR, Hetherington AM, Mansfield TA (1985) Synergism between calcium ions and abscisic acid preventing stomatal aperture. *New Phytol.* 100:473-482.
- Tardieu F, Davies WJ (1992) Stomatal response to ABA is a function of current plant water status. *Plant Physiol.* 98:540-545.
- Tardieu F, Davies WJ (1993) Integration of hidraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and water status of droughted plants. *Plant Cell Environ.* 16:341-349.
- Thompson DD, Wilkinson S, Bacon MA, Davies WJ (1997) Multiple signals and mechanisms that regulate leaf growth and stomatal behavior during water deficit. *Physiol. Plant.* 100:303-313.
- Wilkinson S, Corlett JE, Oger L, Davies WJ (1998) Effects of xylem pH on transpiration from wild-type and *flacca* tomato leaves. *Plant Physiol.* 117:703-709.
- Wilkinson S, Davies WJ (1997) Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. *Plant Physiol.* 113:559-573.
- Wilmer C, Fricker M (1996) *Stomata*. 2nd edn. Chapman & Hall, London.