

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Indução e seleção de linhagens celulares de *Eucalyptus urophylla* para
tolerância aos estresses hídrico e térmico**

Juliana de Oliveira Fernandes Viana

**Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre em Recursos
Florestais. Área de concentração:
Recursos Florestais com opção em
Silvicultura e Manejo Florestal.**

**Piracicaba
2005**

**Juliana de Oliveira Fernandes Viana
Engenheiro Florestal**

Indução e seleção de linhagens celulares de *Eucalyptus urophylla* para tolerância aos estresses hídrico e térmico

**Orientador:
Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Recursos Florestais. Área de concentração: Recursos Florestais com opção em Silvicultura e Manejo Florestal

**Piracicaba
2005**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Viana, Juliana de Oliveira Fernandes

Indução e seleção de linhagens celulares de *Eucalyptus urophylla* para tolerância aos estresses hídrico e térmico / Juliana de Oliveira Fernandes Viana. - - Piracicaba, 2005.
67 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

1. Estresse hídrico 2. Eucalipto 3. Fertilização "in vitro" 4. Linhagem vegetal 5. Resistência térmica 6. Seleção genética I. Título

CDD 634.9734

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A Deus somente,

OFEREÇO

Aos meus pais, Valter e Sonia, e às minhas irmãs, Sabrina e Marcela,

DEDICO

Agradecimentos

- À Deus por estar sempre presente em minha vida, me auxiliando, me fortalecendo e guiando os meus passos pelos melhores caminhos;

- Aos meus pais, Valter e Sonia, e às minhas irmãs, Sabrina e Marcela, por me amarem e me apoiarem em todo o momento;

- Ao Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves pela oportunidade, orientação, paciência, incentivo e principalmente pela amizade;

- À ESALQ/USP (Piracicaba) e ao Departamento de Ciências Florestais e toda a equipe de secretários (Margarete, Catarina e Marcelo) e assistentes destes pela eficiência e colaboração nos serviços prestados em todos os momentos;

- À Eng. Lúcia Barbosa, ao Eng. Rogério da Silva e ao Eng. Juarez Nogueira e à equipe do CDTC da Votorantim Celulose e Papel (Jacareí - SP) pelo uso do HPLC, materiais de consumo e pela atenção e ajuda prestada;

- A toda equipe da florestal da Votorantim Celulose e Papel (Luiz Antonio – SP) e em especial à Eng. Celina do Valle, ao Eng. César Bonine, às analistas Joana da Cunha, Grasieli Lopes, Daniela Runho, Ana Cecília Pellegrini, Euripa Marcelino e Fernanda Freire pela compreensão, apoio e amizade.

- Ao Prof. Dr. Francides Gomes da Silva Junior pelas informações e sugestões dispensadas no decorrer do trabalho;

- Aos amigos do LAFISA: Diva Correia, Carlos Bravo, Saulo Aidar, Wirifran Andrade, Edson Namita, Daruska Cardim, Cláudia M. Lima, Vanderlei Stefanuto pela amizade, colaboração em momentos difíceis, companheirismo e compreensão;

- Ao técnico responsável do LAFISA: José Roberto Romanini pela grande ajuda prestada;

- Ao Evandro Dell Amatrice pela amizade, paciência e atenção nos momentos de correria;

- À Amália Antão pelas orientações e serviços prestados sobre procedimentos da FAPESP;

- À Silvia Zinsli pela atenção, colaboração e ajuda prestada durante a correção da dissertação;

- À minha família: Miriam e Eugênio Rocha, Elvin Rocha, Manuel Araújo e aos meus amigos: Kellen e César Sousa, Junia e Lucas Figueira, Família Nicoletto, Francisco Azenha Junior, Regina Gonçalves, Pastor Samuel, Tereza e Sara F. da Silva, todas as crianças do coral

Canto Juvenil e Perfeito Louvor, Paula Castelo, Roberta Alonso, Lis Uliana, Jean Medeiros e Fernando Soares por me apoiaram e me fortalecerem emocionalmente durante esse período;

- Ao Prof. Dr. Gustavo Maia Souza pela orientação, paciência, amizade e socorro nas horas de desespero;

- Ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida e à técnica Cássia Figueiredo pelo uso do laboratório, material de consumo e pela dedicação;

- À Prof^ª. Amanda Ribeiro Vieira por prontamente me ajudar a trabalhar os dados e definir a estatística mais adequada;

- À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado e pela confiança e sugestões no projeto;

- Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta dissertação.

MUITO OBRIGADA!

“Não te mandei eu? Sê forte e corajoso; não temas, nem te espantes, porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares”

Josué 1:9

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 DESENVOLVIMENTO.....	15
2.1 Revisão bibliográfica.....	15
2.1.1 Seleção de linhagens.....	15
2.1.2 Considerações gerais sobre o estresse	16
2.1.3 Efeito da alta temperatura.....	18
2.1.4 Efeito do estresse hídrico.....	19
2.1.5 Interação do estresse hídrico e térmico.....	22
2.2 Material e Métodos.....	24
2.2.1 Material vegetal.....	24
2.2.2 Desinfestação, inoculação e obtenção dos explantes (modificado de ARRUDA et al., 2001)	25
2.2.3 Seleção de linhagens celulares	27
2.2.4 Avaliação do material selecionado	29
2.2.5 Análise estatística	31
2.3 Resultados.....	31
2.3.1 Considerações gerais	31
2.3.2 Crescimento relativo dos calos.....	34
2.3.3 Avaliação do tratamento 1	35

2.3.4 Avaliação do tratamento 2.....	37
2.3.5 Avaliação do tratamento 3.....	39
2.3.6 Avaliação do tratamento 4.....	41
2.3.7 Avaliação do tratamento 5.....	43
2.3.8 Avaliação do tratamento 6.....	45
2.3.9 Teor de prolina	47
2.3.10 Teor de proteínas totais solúveis	48
2.3.11 Teor de Açúcares não-estruturais solúveis	49
2.3.12 Análise fatorial por componentes principais	53
2.4 Discussão	53
2.4.1 Crescimento relativo dos calos	53
2.4.2 Ajuste osmótico	53
3 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIA	58
ANEXO	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Efeito da prolina sob a concha de hidratação de proteínas sob condições de estresse (BUCHANAN et al., 2000).....	20
Figura 2 – Carboidratos comuns na parede celular das plantas e suas interconversões (BUCHANAN et al., 2000).....	22
Figura 3 - O fenômeno de tolerância cruzada, onde pré-tratamentos de plantas com doses subletais de ozônio ou de irradiação ultravioleta (UV) podem conferir tolerância ao patógeno virulento. A planta que não recebeu esse pré-tratamento pode morrer	23
Figura 4 – Plântulas de <i>Eucalyptus urophylla</i> aos quinze dias após a germinação em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) sólido	25
Figura 5 - Calos de <i>Eucalyptus urophylla</i> com 120 dias em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) sólido suplementado com 5mgL ⁻¹ de Picloram.....	27
Figura 6 – Calos de <i>Eucalyptus urophylla</i> em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) líquido, com manta acrílica, suplementado com 200mg.L ⁻¹ de polietilenoglicol (PEG 6000) e com 5mgL ⁻¹ de Picloram logo após o tratamento de temperatura	28
Figura 7 – Panorama geral da experimentação realizada em calos de <i>Eucalyptus urophylla</i> submetidos à deficiência hídrica e ao estresse térmico	29
Figura 8 - Calos de <i>Eucalyptus urophylla</i> após vinte dias de cultivo em meio líquido com deficiência hídrica para primeira seleção, apoiados em manta acrílica	32
Figura 9 - Calos de <i>Eucalyptus urophylla</i> após vinte dias de cultivo em meio N7 líquido para recuperação, apoiados em manta acrílica.....	33
Figura 10 - Calos de <i>Eucalyptus urophylla</i> após vinte dias de cultivo em meio líquido com deficiência hídrica para segunda seleção, apoiados em manta acrílica.....	33
Figura 11 – Taxa de crescimento relativo nos calos de <i>Eucalyptus urophylla</i> submetidos aos estresses hídrico e térmico em diferentes fases de seleção (A) (estado inicial, 1ª seleção, recuperação e 2ª seleção) e sob variações de temperatura (B). Para visualizar as comparações de médias, ver anexo A	35

- Figura 12 - Parâmetros bioquímicos do tratamento 1 ao final das diferentes fases de seleção (estado inicial, primeira seleção, recuperação e segunda seleção) de calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos à 25°C por duas horas em BOD e em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) por 20 dias..... 36
- Figura 13 - Parâmetros bioquímicos do tratamento 2 ao final das diferentes fases de seleção (estado inicial, primeira seleção, recuperação e segunda seleção) de calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos à 25°C por duas horas em BOD e em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) suplementados com 20% de PEG 6000 por 20 dias..... 38
- Figura 14 - Parâmetros bioquímicos do tratamento 3 ao final das diferentes fases de seleção (estado inicial, primeira seleção, recuperação e segunda seleção) de calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos à 30°C por duas horas em BOD e em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) suplementados com 20% de PEG 6000 por 20 dias..... 40
- Figura 15 - Parâmetros bioquímicos do tratamento 2 ao final das diferentes fases de seleção (estado inicial, primeira seleção, recuperação e segunda seleção) de calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos à 35°C por duas horas em BOD e em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) suplementados com 20% de PEG 6000 por 20 dias..... 42
- Figura 16 - Parâmetros bioquímicos do tratamento 5 ao final das diferentes fases de seleção (estado inicial, primeira seleção, recuperação e segunda seleção) de calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos à 40°C por duas horas em BOD e em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) suplementados com 20% de PEG 6000 por 20 dias..... 44
- Figura 17 - Parâmetros bioquímicos do tratamento 6 ao final das diferentes fases de seleção (estado inicial, primeira seleção, recuperação e segunda seleção) de calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos à 45°C por duas horas em BOD e em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) suplementados com 20% de PEG 6000 por 20 dias..... 46
- Figura 18 – Teor de prolina nos calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos aos estresses hídrico e térmico nas diferentes fases de seleção (A) (estado inicial, 1ª seleção, recuperação e 2ª seleção) e sob variações de temperatura (B). Para visualizar as comparações de médias, ver anexo A..... 47

- Figura 19 – Teor de proteínas totais solúveis nos calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos aos estresses hídrico e térmico nas diferentes fases de seleção (A) (estado inicial, 1ª seleção, recuperação e 2ª seleção) e sob variações de temperatura (B). Para visualizar as comparações de médias, ver anexo A..... 48
- Figura 20 – Teor de ácido glucorônico nos calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos aos estresses hídrico e térmico nas diferentes fases de seleção (A) (estado inicial, 1ª seleção, recuperação e 2ª seleção) e sob variações de temperatura (B). Para visualizar as comparações de médias, ver anexo A..... 49
- Figura 21 – Teor de celobiose nos calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos aos estresses hídrico e térmico nas diferentes fases de seleção (A) (estado inicial, 1ª seleção, recuperação e 2ª seleção) e sob variações de temperatura (B). Para visualizar as comparações de médias, ver anexo A..... 50
- Figura 22 - Teor de glicose nos calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos aos estresses hídrico e térmico nas diferentes fases de seleção (A) (estado inicial, 1ª seleção, recuperação e 2ª seleção) e sob variações de temperatura (B). Para visualizar as comparações de médias, ver anexo A..... 51
- Figura 23 – Teor de poliose nos calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos aos estresses hídrico e térmico nas diferentes fases de seleção (A) (estado inicial, 1ª seleção, recuperação e 2ª seleção) e sob variações de temperatura (B). Para visualizar as comparações de médias, ver anexo A..... 52
- Figura 24 – Teor de arabinose nos calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos aos estresses hídrico e térmico nas diferentes fases de seleção (A) (estado inicial, 1ª seleção, recuperação e 2ª seleção) e sob variações de temperatura (B). Para visualizar as comparações de médias, ver anexo A..... 52

RESUMO

Indução e seleção de linhagens celulares de *Eucalyptus urophylla* para tolerância aos estresses hídrico e térmico

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a possível relação entre a temperatura alta e o provável aumento de tolerância à deficiência hídrica, bem como identificar e selecionar as linhagens celulares de *Eucalyptus urophylla* sob os aspectos fisiológicos e bioquímicos. Para isso, calos oriundos de hipocótilos de *Eucalyptus urophylla* mantidos em cultura de tecidos em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) com 5 mg L⁻¹ de Picloram foram utilizados para conduzir os testes. Estes calos foram submetidos a uma pressão de seleção em meio N7 (SIMOLA, 1985) suplementado com 20% de polietilenoglicol (PEG 6000) e em seguida, eles foram tratados em diferentes temperaturas (25, 30, 35, 40 e 45°C) por duas horas em BOD. Então, esses frascos foram mantidos por vinte dias sob condições constantes de luz (50 μmol m⁻² s⁻¹ PAR) e temperatura de 26 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, parte do material foi avaliada e o restante foi transferido para meio de cultura N7 suplementado com 5 mg L⁻¹ de Picloram. Decorrido quatro meses, parte das linhagens sobreviventes à primeira seleção foram transferidas para o meio N7 líquido, visando avaliar a capacidade de recuperação do material. O restante dos calos selecionados foi novamente submetido aos estresses hídrico e térmico, conforme o tratamento realizado anteriormente, por vinte dias. Para avaliação das três etapas do experimento (primeira seleção, recuperação e segunda seleção), foram feitas determinações do teor de prolina, proteínas totais solúveis e carboidratos não-estruturais solúveis (ácido glucorônico, celobiose, glicose, poliose e arabinose), bem como avaliação do crescimento através da medição do peso seco e peso fresco. Os resultados foram avaliados por análise fatorial utilizando técnicas de componentes principais (PCA) e pela comparação de médias de acordo com a Análise de Variância (ANOVA) e LDS (Least Significant Difference). Assim, verificou-se que em primeira instância, altas temperaturas podem aumentar a tolerância a posterior deficiência hídrica, mas numa segunda exposição essa vantagem não é significativa. Além disso, linhagens tolerantes a condições de estresse podem ser selecionadas utilizando essa metodologia.

Palavras-chaves: seleção *in vitro*, *Eucalyptus urophylla*, estresse hídrico, estresse térmico.

ABSTRACT

Induction and selection of *Eucalyptus urophylla* cell lines resistant to thermic and hydric stresses

This work aimed to assess a possible relation between high temperature and improvement in drought tolerance, as well as identify and select *Eucalyptus urophylla* cell lines under physiological and biochemical aspects. Callus obtained from hypocotyl of *Eucalyptus urophylla* and cultivated in N7 medium (SIMOLA, 1985) with the addition of 5mg.L⁻¹ of Picloram were used to carry out the tests. These callus were transferred to N7 medium (SIMOLA, 1985) supplemented with 20% of PEG 6000 and then, they were treated at different temperatures (25, 30, 35, 40 and 45°C) for two hours in BOD. Then, they were kept under constant conditions of light (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) and temperature (26 \pm 2 °C) with photoperiod of 12 hours for 20 days. After that, part of the material was evaluated and the remained callus was transferred to N7 medium supplemented with 5 mg L⁻¹ of Picloram. Passed four mouths, half of the selected cell lines was transferred to N7 liquid medium, aiming to evaluate the capacity of recovery of the material. The other part of the selected callus was submitted to water and thermal stress again, as in the first selection, for 20 days. The evaluation of the callus response was made through the quantification of proline, total soluble proteins, soluble sugars (glucuronic acid, glucose, celobiose, poliose and arabinose). The data were analysed through factorial analyses using principal component technics and through means comparison according to ANOVA and LSD (Least Significance Difference) test. Thus, these results showed a positive relation between high temperature and improvement in drought tolerance in first instance, but in a second exposition to this stress factor, these advances was not significant. Tolerant cell lines to stress conditions could be selected using this methodology.

Key words: *in vitro* selection, *Eucalyptus urophylla*, water stress, heat stress.

1 INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus* é uma árvore que exibe uma excelente produtividade, fibras curtas de boa qualidade e que produz alta quantidade de polpa celulósica. Devido a tantas qualidades, o eucalipto é amplamente empregado e o seu plantio e uso vem crescendo pelo mundo. Entretanto, a maior limitação para a expansão dessa espécie é a alta sensibilidade ao estresse térmico e hídrico, causando perdas na produtividade seja devido diretamente ao estresse abiótico sofrido ou às doenças resultantes da condição ambiental.

Assim, o monitoramento precoce dessas mudanças ocorridas nos tecidos das plantas nos permite identificar e entender o mecanismo de controle dos estresses hídrico e térmico, e, dessa forma, nos levar à seleção de espécies tolerantes.

Recentemente, descobriu-se que proteínas do estresse são sintetizadas em resposta a diferentes fatores ambientais (BRAY, 1993), tais como dois polipeptídios (70 e 80 kDa) que são produzidos em resposta à deficiência hídrica, os quais são similares às proteínas de choque térmico (heat shock protein – HSP) sintetizadas em resposta a esse estresse. Isso nos mostra que a adaptação da planta à seca do solo é acompanhada pela herança de sua tolerância ao déficit hídrico e à alta temperatura (KUZNETSOV et al., 1992).

Portanto, hipotetiza-se que tratamentos utilizando temperatura alta podem aumentar a tolerância à deficiência hídrica em calos de *Eucalyptus urophylla*.

Dessa forma, este trabalho visou avaliar a possível relação entre a temperatura alta e o aumento de tolerância à deficiência hídrica, bem como identificar e selecionar as linhagens celulares de *Eucalyptus urophylla* sob os aspectos fisiológicos e bioquímicos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Seleção de linhagens

Seleção, em genética, é a contribuição diferenciada de descendentes, através de genótipos distintos da mesma população, para a próxima geração (VALOIS et al., 1996). Assim, há duas estratégias básicas para seleção de mutantes “in vitro” (GONZALES, 1994):

- i) Seleção numa única etapa: o agente de seleção é usado em concentrações duas ou três vezes maior que a concentração mínima resultante (CMR) em 100% de inibição. Esse é um método simples com resultados claros e com menor probabilidade de falhas.
- ii) Seleção em várias etapas: essa estratégia pode ser aplicada onde a seleção em única etapa não funciona. A concentração do agente de seleção é consideravelmente menor que a CMR, ficando por volta de 50% de inibição. A concentração aumenta gradualmente em subcultivos sucessivos para permitir o rápido crescimento de células resistentes para os tipos selvagens das células sensíveis que ultrapassam o limite de crescimento. Por esse processo, deveria ser possível a obtenção eventual de culturas crescendo vigorosamente com inibidor bem acima da CMR estabelecida pela cultura original não selecionada.

Em ambos os tipos de seleção, há exemplos de êxito na obtenção de linhagens tolerantes e/ou resistentes. No caso da seleção em uma única etapa, verificou-se que linhagens resistentes de calos de *Brassica* sp foram obtidas após a submissão dessas a um meio de cultura suplementado com 0,24 mM de zinco ou 0,80 mM de manganês (ROUT et al, 1999). O mesmo tipo de seleção foi observada em *Helianthus annuus* (SANTOS, 2000) e em *Nicotiana tabacum* (BARB et al., 2003).

Já a seleção em várias etapas atingiu o mesmo resultado ao submeter calos de plantas de tabaco a diferentes concentrações de manganês. À medida que os calos sobreviviam à concentração adicionada ao meio (que se iniciou com 0,1 mM de Mn), eles eram transplantados para meio com uma concentração maior, até que se atingiu 5mM de Mn, na qual os calos sobreviventes passaram para o meio de regeneração (SANTANDREA et al, 2000). A mesma seleção foi utilizada em *Medicago varia* (KÖNIGSHOFER & LECHNER, 2002).

Em relação aos caracteres selecionados, alguns podem ser feitos em nível celular, tais como resistência à toxina de um fungo, à herbicida, à poluentes, à alta concentração salina e temperaturas extremas, entre outras.

Uma vantagem disso é permitir a seleção de milhões de células em um espaço muito pequeno com poucos esforços e recursos. Entretanto, não se pode garantir que alguns fenótipos que são expressos nesta fase possam apresentar a mesma característica na planta regenerada, pois certos genes podem não ser ativados em nível celular, e as funções específicas dos tecidos podem ocorrer somente quando a célula é parte integrante de uma planta intacta. Porém, há caracteres selecionados em nível celular que podem ser verificados novamente em nível de planta (BHOJWANI & RAZDAN, 1996).

Em seleções de células, esperam-se melhores resultados, pois ocorre melhor contato dessas com o agente de seleção e regeneração de mutantes sólidos. Porém, calos têm sido utilizados na maioria dos estudos envolvendo seleção *in vitro* (BHOJWANI & RAZDAN, 1996).

Independente do explante inicial utilizado, atualmente há vários exemplos na literatura de seleções de linhagens *in vitro*, tais como em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) resistentes ao herbicida imazethapyr (TAREGYAN et al., 2000), em gemas de *Tagetes minuta* tolerantes a deficiência hídrica (MOHAMED et al., 2000), em três plantas transgênicas (batata, tabaco e tomate) resistentes ao vírus do mosaico do tabaco (HALDRUP et al., 2001).

2.1.2 Considerações gerais sobre o estresse

O termo estresse é, nas maiorias das definições, considerado como um desvio significativo das condições ótimas para vida, e induz à mudanças e respostas em todo os níveis funcionais do organismo, as quais são reversíveis à princípio, mas podem se tornar permanentes (LARCHER, 2004).

Dessa forma, o estresse abiótico refere-se ao ponto sub e supra-ótimo de fatores físicos e químicos do ambiente (VALOIS et al., 1996), tais como temperatura, quantidade de sal (principalmente NaCl), disponibilidade de água, irradiação solar, os quais atingem à maioria dos processos fisiológicos como a fotossíntese, fixação de nitrogênio e respiração, além de afetar diferentes estágios de desenvolvimento da planta, incluindo a germinação de sementes, desenvolvimento de plântulas, crescimento vegetativo e reprodutivo, maturação de sementes e senescência, que são diferencialmente alterados em resposta às condições de estresse (GROVER et al., 1999).

Quando a planta é submetida a um desses fatores de estresse (como por exemplo: deficiência hídrica, alta e baixa temperatura, salinidade ou radiação ultravioleta), receptores específicos percebem primeiramente os sinais vindos do ambiente (XIONG & ZHU, 2002) e, após a ativação, iniciam (ou suprimem) uma cascata de sinalizações para transmitir a informação entre as células e em muitos casos, ativar fatores de transcrição nuclear para induzir a expressão de locais específicos de genes (XIONG & ZHU, 2001).

Após receber o sinal nos receptores da membrana, as células utilizam cascatas de fosfoproteínas múltiplas para traduzir e amplificar essa informação. A fosforilação e desfosforilação de proteínas são, talvez, as formas mais comuns de sinalização dentro da célula ao regularem uma ampla faixa de processos celulares, tais como ativação de enzimas, congregação de macromoléculas, localização e degradação de proteínas (HARDIE, 1999).

Além das fosfoproteínas, tanto o cálcio como o ROS (reactive oxygen species ou espécies com oxigênio ativo) são importantes moduladores de eventos de tradução de sinais celulares, principalmente em condições de estresse biótico e abiótico (BOWLER & FLUHR, 2000), tais como ataque patogênico, deficiência hídrica, choque osmótico, alta e baixa temperatura e alta intensidade luminosa (PASTORI & FOYER, 2002).

Assim, em presença de um estressor (ou fator de estresse) moderado e de longa duração, um decréscimo no conteúdo relativo de água celular e/ou um aumento da pressão de excitação nos cloroplastos (devido ao excesso relativo de radiação fotossinteticamente ativa, PAR) causa: (1) ativação do sistema de sensores redox localizado no cloroplasto e na mitocôndria, bem como na interface entre a membrana plasmática e parede celular; isso pode levar a um pequeno aumento no nível de H_2O_2 e da capacidade antioxidante da célula; (2) alterações na interação entre parede celular e membrana plasmática, as quais ativam associados da parede celular ou receptores quinases da membrana plasmática e alguns sensores mecânicos na membrana plasmática; modificações dessas interações podem também estar envolvidas na abertura dos canais de cálcio na membrana plasmática e no aumento do influxo de cálcio vindo do apoplasto. Em plantas sujeitas ao estresse moderado, aumenta a síntese e acumulação de ABA, o hormônio engajado na sinalização nas células durante o frio, seca e estresse salino (XIONG et al., 2002).

O caminho da sinalização induzida por um estressor moderado e de longa duração promove a indução de genes de respostas iniciais e retardadas, envolvidos no controle do

metabolismo celular, permitindo o ajuste do crescimento e metabolismo da planta às condições de estresse (KACPERSKA, 2004).

Já os estressores severos e de rápida duração causam desestabilização da membrana (despolarização da membrana e alterações no sistema de transporte de íons), e resultam em aumento e manutenção freqüente da concentração de cálcio no citossol. Como consequência da desestabilização da membrana, a sinalização fosfolipídica é posta em operação e pode levar a um aumento na produção de ROS, acumulação de H₂O₂ e peroxidação lipídica, bem como um aumento na síntese de hormônios, tais como o jasmônico e o etileno (WANG et al., 2000).

Essa é a situação de alarme, na qual pode levar a uma injúria irreversível e morte celular ou a recuperação da célula, dependendo do impacto do estressor (KACPERSKA, 2004).

Para observar mais precisamente esses acontecimentos, a utilização da cultura *in vitro* para estudos de respostas ao estresse oferece algumas vantagens no que diz respeito ao controle das condições ambientais, eliminando possíveis interferências de outros tipos de estresse, bem como possibilitar uma condição mais homogênea de exposição dos tecidos da planta ao potencial osmótico desejado (HASEGAWA et al., 1984).

2.1.3 Efeito da alta temperatura

Mudanças na temperatura ambiental são acontecimentos altamente variáveis que as funções celulares das plantas necessitam se ajustar constantemente. Como formas de vida sésseis, as plantas precisam desenvolver mecanismos que possam sentir e responder às variações na temperatura de uma forma muito rápida e flexível para assegurar a continuidade e funcionalidade das atividades celulares (SCHOFFL et al., 1998).

A resposta ao estresse térmico é usualmente transiente na natureza e ajuda a manter as funções celulares sob o curto período de exposição ao calor, tal como as horas diárias de alta temperatura, mas também pode conduzir a um aumento da termotolerância por um todo (SCHOFFL et al., 1998). Essa resposta é caracterizada por uma larga atenuação na atividade de transcrição e tradução, com exceção das proteínas de choque térmico (heat shock protein - HSPs), as quais acumulam de forma dose-dependente e parecem responder na maior parte pela termotolerância (QUEITSCH et al., 2000).

As HSPs auxiliam as células a suportar altas temperaturas, pois o estresse térmico faz com que muitas proteínas, que funcionam como enzimas ou componentes estruturais, tornem-se estendidas ou maldobradas, levando, assim, a perda da estrutura e da atividade enzimática. Tais

proteínas maldobradas, muitas vezes, agregam-se e se precipitam, criando sérios problemas dentro da célula. Assim, essas proteínas funcionam como chaperonas moleculares, as quais atuam num dobramento correto de proteínas maldobradas e agregadas para evitar a deformação destas, o que facilita o funcionamento adequado de células submetidas a temperaturas elevadas (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Uma gama de HSPs protegem as células contra a injúria causada pelo calor, tais como as HSPs 100 (que atuam na desagregação e/ou degradação de proteínas), as HSPs 90 (que ajudam no dobramento de outras proteínas e têm sua expressão aumentada em resposta ao calor, frio, salinidade, metais pesados, fitohormônios e transição entre luz e escuro), as HSPs 70 (as quais são responsáveis pelo dobramento de polipeptídeos recém sintetizados e pela importação e/ou translocação de precursores das proteínas), as HSPs 60 (que exercem um papel crucial ao auxiliarem uma ampla faixa de proteínas recém sintetizadas e translocadas a acharem suas formas naturais) e as HSPs menores (um grupo de proteínas com tamanho de 15 a 30kDa que têm a capacidade de unir proteínas denaturadas, prevenindo a agregação e facilitando a posterior recuperação dessas proteínas) (WANG et al., 2004).

Alguns estudos demonstram uma correlação entre a síntese de HSPs e a temotolerância (BETTANY, 1995; BURKE, 1998; BOWEN et al., 2002; YANG et al., 2003), sugerindo uma associação entre a produção dessas proteínas e a estabilização das estruturas (COLLINS, 1995).

2.1.4 Efeito do estresse hídrico

O estresse hídrico tem a baixa disponibilidade de água como fator de estresse, o qual causa grandes alterações fisiológicas e bioquímicas na planta já que a água participa de processos vitais das células vegetais.

Dessa forma, sob condições de deficiência hídrica, um dos primeiros efeitos biofísicos significativos é a redução na turgescência da célula e alterações nos processos fisiológicos dependentes do turgor como o crescimento celular (TAIZ & ZEIGER, 2004). Com o aumento da severidade do déficit hídrico, a fotossíntese e a transpiração são atingidas devido, principalmente, ao fechamento dos estômatos e ao bloqueio da difusão de dióxido de carbono (CO₂) (KUMAR et al., 1994), bem como a redução do conteúdo de clorofila em função da desintegração de membranas causado pelo estresse oxidativo em espécies menos tolerantes (MORAN et al., 1994).

Além disso, com a perda do turgor, ocorre uma diminuição do volume celular, um aumento progressivo na concentração do citossol e desidratação do protoplasto (LARCHER,

2004) devido ao fato de uma célula não ser capaz de retirar água do ambiente a menos que o potencial hídrico nesta seja menor que o do ambiente ao redor, devendo estabelecer um gradiente no potencial hídrico para que a água flua do exterior para a célula (BUCHANAN et al., 2002).

Assim, para extrair a água mais firmemente retida no ambiente, as células acionam um mecanismo denominado ajuste osmótico, que é o processo pelo qual o potencial hídrico pode ser diminuído sem que haja decréscimo no turgor ou no volume celular através da acumulação de solutos compatíveis (ou osmólitos compatíveis), que são compostos orgânicos comumente sintetizados pela célula e que não interferem nas funções das enzimas (TAIZ & ZEIGER, 2004).

O caráter orgânico das moléculas osmóticas provavelmente reflete na toxidez potencial de solutos inorgânicos concentrados. Muitos íons encontrados em células afetam adversamente o processo metabólico quando presentes em alta concentração, possivelmente pela união e alteração das propriedades de cofatores, substratos, membranas e enzimas. Além disso, muitos íons podem entrar na concha de hidratação das proteínas e promover sua desnaturação. Já os solutos compatíveis tendem a ter sua carga neutralizada no pH fisiológico e são excluídos da concha de hidratação das macromoléculas (BUCHANAN et al., 2000) (Figura 1).

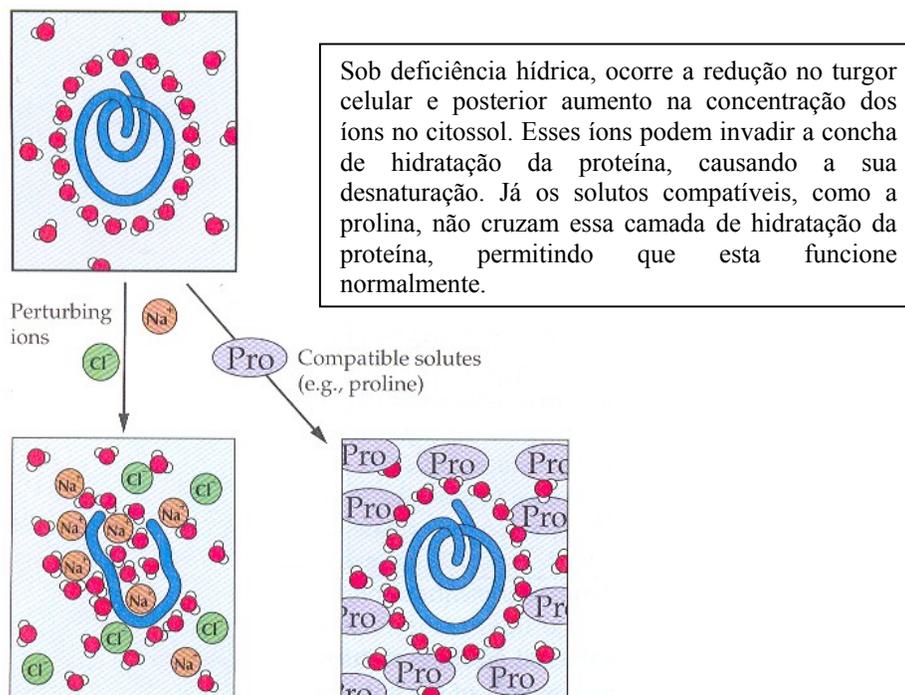


Figura 1 – Efeito da prolina sob a concha de hidratação de proteínas sob condições de estresse (BUCHANAN et al., 2000)

Todos esses ajustes no metabolismo visam manter um potencial de turgescência alto nas células vegetais, o que pode trazer como consequência a reabertura dos estômatos, a expansão foliar, a transpiração e a fotossíntese funcionando por mais tempo (WANG et al., 1995).

Um dos solutos compatíveis alterados é a prolina, que é um aminoácido acumulado mesmo na ausência de estresse abiótico e sintetizado a partir do glutamato ou da ornitina (via menos conhecida) através da enzima P5CS (Δ^1 -Pirrolina-5-carboxilato sintetase) (LEHNINGER, 1995).

No entanto, em condições de estresse abiótico, a via de acumulação da prolina é completamente diferente daquelas operantes (STINES et al., 1999), como foi evidenciado em dois genótipos de grama verde submetidos ao estresse salino que tiveram um aumento na expressão da pirrolina-5-carboxilato redutase e da γ -glutamil quinase (enzimas envolvidas na síntese de prolina), e da inibição da atividade da prolina oxidase (MISRA & GUPTA, 2005). Isso pode gerar um aumento na concentração deste aminoácido notoriamente (NOLTE et al., 1997), promovendo a osmorregulação e estabilização das proteínas e membranas durante o estresse.

Muitos estudos evidenciaram o acúmulo da prolina em diversas espécies quando estas foram sujeitas a diferentes fatores de estresse (PATNAIK & DEBATA, 1997; BAJJI et al., 2000; GILBON et al., 2000; SANTOS et al., 2000; LUTTS et al., 2004; CLAUSSEN, 2005; LACERDA et al., 2005).

Por outro lado, a prolina pode também atuar na degradação de radicais livres (HONG et al., 2000), e funcionar como uma fonte de nitrogênio da célula, compondo o principal estoque energético após o estado de estresse (BRURGIÈRE et al., 1999).

Além disso, ocorre também o acúmulo de outras substâncias como os açúcares solúveis que são os maiores solutos orgânicos e estão envolvidos no ajuste osmótico quando a planta está sob condições de deficiência hídrica, sendo acumulados em vacúolos (THOMAS, 1997).

Os açúcares solúveis geralmente avaliados em estudos de estresse abiótico são a sacarose, a frutose e a glicose (PELAH et al., 1997), bem como os açúcares alcoólicos. Porém existem muitos outros açúcares não contemplados nessas investigações, como os da parede celular.

A parede celular é composta por blocos de polissacarídeos que se ligam covalentemente em várias posições gerando uma armação estrutural. E os açúcares mais comuns na parede das células dos vegetais são (Figura 2): glicose, ramnose, galactose, ácido galacturônico, ácido glucorônico, xilose, arabinose, manose, ácido manurônico e fucose (BUCHANAN et al., 2000).

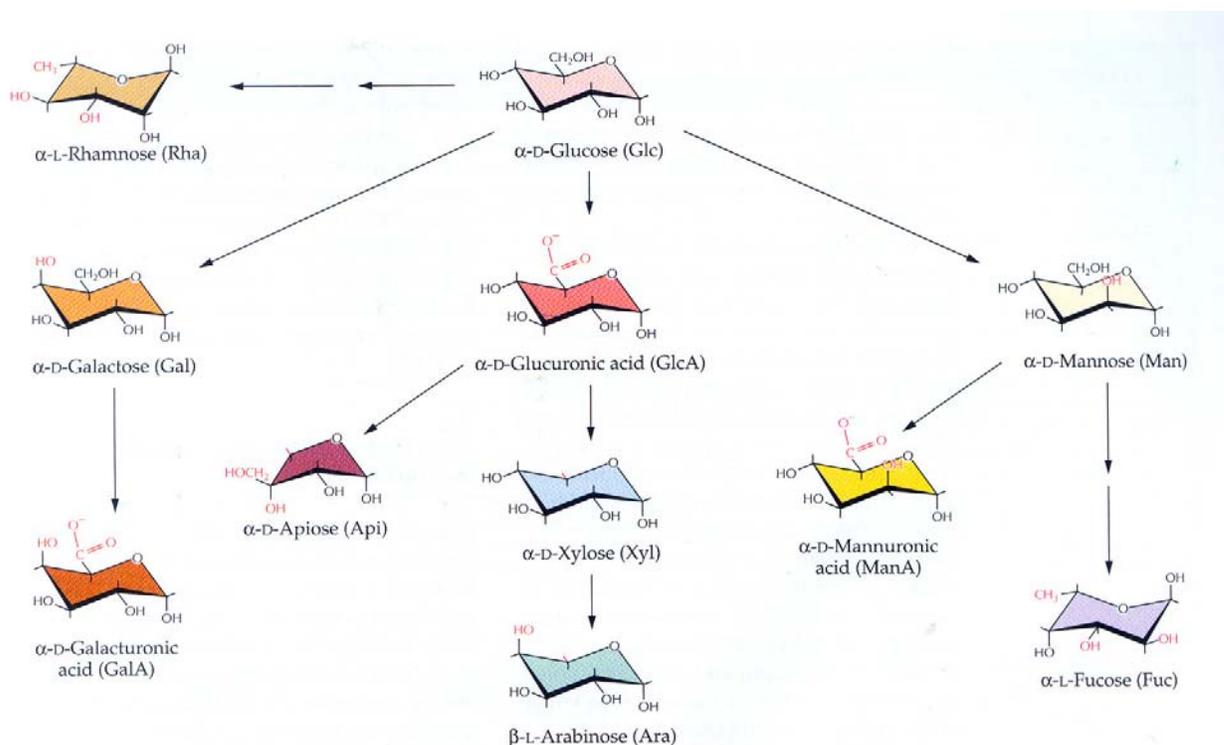


Figura 2 – Carboidratos comuns na parede celular das plantas e suas interconversões (BUCHANAN et al., 2000)

Embora muitos estudos relatem que a deficiência hídrica induz mudanças na composição da parede celular (IRAKI et al., 1989 apud PIRO et al., 2003; SAKURAI et al., 1987 apud PIRO et al., 2003; WAKABAYASHI et al., 1997 apud WAKABAYASHI et al., 2005; CHEN et al., 2005), pouco é conhecido sobre a biossíntese dos polissacarídeos desta durante o período de estresse hídrico. Isso é particularmente importante, pois a síntese, transporte e incorporação de novos polissacarídeos sintetizados na parede celular certamente modificam as propriedades desta e conseqüentemente a sua susceptibilidade a ação dos agentes degradantes (PIRO et al., 2003).

Além disso, modificações bioquímicas da parede celular, tais como mudanças no tamanho molecular e quantidade de polissacarídeos, podem possivelmente estar envolvidas na regulação da extensibilidade desta. Alterações da massa molecular dos polissacarídeos e extensibilidade da parede celular em resposta a vários estresses ambientais têm sido reportadas em alguns materiais vegetais (HOSON, 1998; HOSSAIN et al., 2005).

2.1.5 Interação do estresse hídrico e térmico

A tolerância cruzada ou “cross-tolerance” é um fenômeno que se baseia na existência de um sistema de defesa comum no combate ao estresse e postula que um fator de estresse particular

pode induzir tolerância nas plantas a um subsequente estresse que seja diferente do primeiro (RIZHSKY et al., 2002). Em alguns casos, os fenótipos tolerantes podem mesmo transcender a barreira do estresse abiótico e biótico. Como por exemplo, exposição a doses não letais de ozônio induziu tolerância ao fitopatógeno virulento *Pseudomonas syringae* em *Arabidopsis* e ao vírus do mosaico do tabaco em tabaco (Figura 3) (BOWLER & FLUHR, 2000).

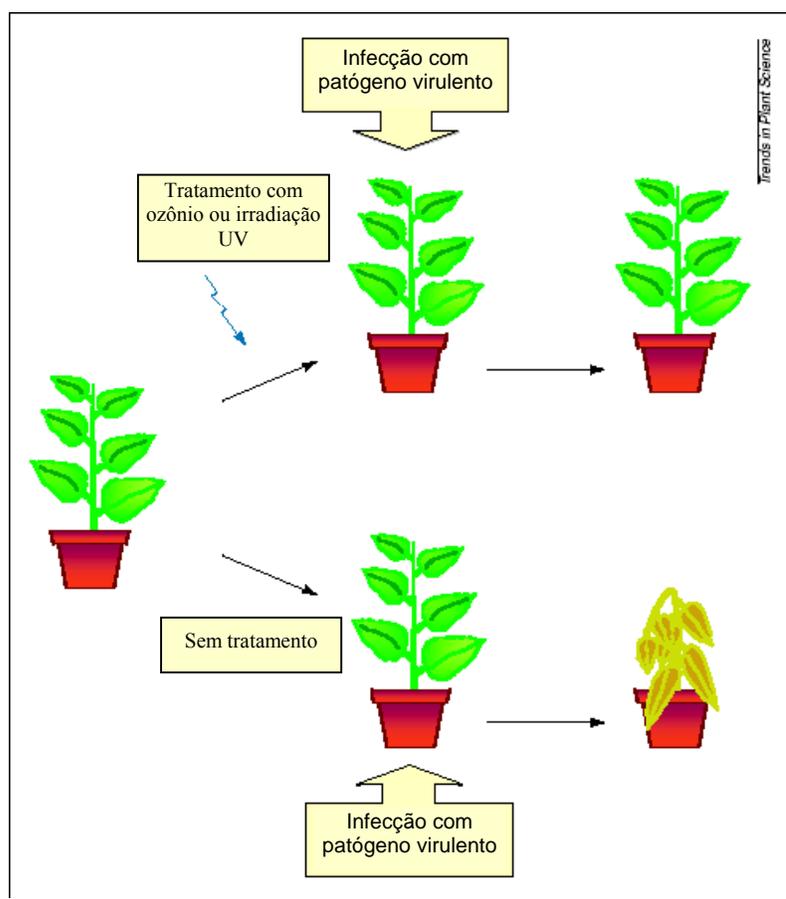


Figura 3 - O fenômeno de tolerância cruzada, onde pré-tratamentos de plantas com doses sub-letais de ozônio ou de irradiação ultravioleta (UV) podem conferir tolerância ao patógeno virulento. A planta que não recebeu esse pré-tratamento pode morrer

Raramente na natureza, a planta está sujeita a um fator de estresse sozinho e sem a influência de outros fenômenos. Frequentemente, múltiplos estresses estão envolvidos (como por exemplo, em uma combinação inexorável entre forte radiação, superaquecimento e seca em habitats abertos). Essa série de situações estressantes pode reforçar, diminuir, mascarar ou mesmo, reverter a resposta da planta a um simples fator de estresse (LARCHER, 2004).

Assim, a tolerância adquirida ao estresse é resultado de vários mecanismos que agem de maneira coordenada ou sinergicamente para prevenir danos celulares e restabelecer a

homeostase celular, tais como os osmólitos estudados em *E. coli* (glicina betaína, glicerina, prolina e trealose) que podem também atuar como chaperonas químicas pelo aumento na estabilidade de proteínas e pelo redobramento de polipeptídeos denaturados, sugerindo que as células controlam a estabilidade das suas proteínas, bem como a recuperação das danificadas através da regulação dos níveis internos de diferentes solutos compatíveis (WANG et al., 2004).

Durante a seca, as plantas são afetadas por dois diferentes fatores físicos – deficiência hídrica e alta temperatura. A resposta da planta à seca começa com alguns sinais de estresse que causam várias mudanças fisiológicas (KUZNETSOV et al., 1999), como supressão da fotossíntese, aumento da respiração, indução de grande número de genes de defesa, incluindo genes induzidos durante a defesa contra patógenos, e mudanças nos genes envolvidos no metabolismo de açúcares, bem como alterações na expressão de HSPs. Essas mudanças sugerem fortemente que a combinação de deficiência hídrica e choque térmico resulta na ativação de um programa genético único que é diferente daquele ativado durante o estresse hídrico ou térmico (RIZHSKY et al., 2002).

Recentemente, descobriu-se que proteínas do estresse são sintetizadas em resposta a diferentes fatores ambientais (BRAY, 1993), tais como dois polipeptídios (70 e 80 kDa) que são produzidos em resposta à deficiência hídrica, os quais são similares às HSPs sintetizadas em resposta ao estresse térmico. Isso nos mostra que a adaptação da planta à seca do solo é acompanhada pela herança de sua resistência ao déficit hídrico e à alta temperatura (KUZNETSOV et al., 1992).

Dessa forma, tratamentos preliminares utilizando alta temperatura podem aumentar a resistência a um subsequente estresse por deficiência hídrica (KUZNETSOV et al., 1999), ao aumentar o acúmulo de solutos orgânicos (açúcares e aminoácidos) como mecanismo de proteção da célula na osmorregulação (KUZNETSOV & SHEVYAKOVA, 1999).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Material vegetal

Este estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia das Árvores (LAFISA) do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP.

Assim, para iniciar a experimentação, foram utilizadas sementes de *Eucalyptus urophylla* fornecidas pelo Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais (IPEF), catalogadas como T10B71, lote AN578 e coletadas da população base de Anhembi, SP.

2.2.2 Desinfestação, inoculação e obtenção dos explantes (modificado de ARRUDA et al., 2001)

O processo de desinfestação iniciou-se na lavagem das sementes em água corrente e detergente neutro. Após este procedimento, essas foram imersas sob agitação durante trinta minutos em solução de hipoclorito de sódio manipulado (com 3% de cloro ativo), contendo duas gotas de Tween 20 para cada 100ml de solução.

Em seguida, dentro da câmara de fluxo laminar, as sementes passaram por lavagem em água deionizada autoclavada por três vezes e, posteriormente, foram transferidas para frascos esterilizados contendo meio N7 (SIMOLA, 1985; Tabela 1) para germinação.

Em cada frasco, foram acondicionadas aproximadamente trinta sementes, as quais ficaram sob condições constantes de luz ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) e temperatura ($26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), com fotoperíodo de 12 horas.

Após quatro dias, as sementes germinaram e depois de quinze dias, os hipocótilos das plântulas (explantes definidos – Figura 4) foram excisados, desprezando-se as raízes e a inserção dos cotilédones, e transferidos para frascos com meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985; Tabela 1) suplementado com $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Picloram, para indução de calos.



Figura 4 – Plântulas de *Eucalyptus urophylla* aos quinze dias após a germinação em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) sólido

Tabela 1 - Composição do meio N7 (SIMOLA, 1985)

MACRONUTRIENTES	mg.L⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	463,0
KNO ₃	2830,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	185,0
KH ₂ PO ₄	399,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	166,0
MICRONUTRIENTES	mg.L⁻¹
ETDA Férrico	50,0
MnSO ₄ .4H ₂ O	16,9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,59
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,2505
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,25
VITAMINAS E AMINOÁCIDOS	mg.L⁻¹
Ácido Nicotínico	0,5
Tiamina HCl	0,1
Piridoxina HCl	0,5
Glicina	2,0
Meso-Inositol	100,0
OUTROS	mg.L⁻¹
Caseína	1,0
Sacarose	20,0
Ágar	5,0

Decorrido seis subcultivos (120 dias), os calos foram selecionados conforme o item 3 abaixo.

2.2.3 Seleção de linhagens celulares

Após 120 dias do início da calogênese (Figura 5), a população base da experimentação estava formada e era composta por 175 frascos (com quatro calos cada um), os quais, ao final de um subcultivo (que era de 20 dias), apresentavam um rendimento de 1800mg cada um.

Assim, para a realização da experimentação, parte do material vegetal foi transferida para frascos com 40ml de meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985; Tabela 1) líquido suplementado com 5mg.L^{-1} de Picloram, e no caso dos tratamentos de deficiência hídrica (tratamentos 2 a 6; Tabela 2), com 200mg.L^{-1} de polietilenoglicol (PEG 6000). Os frascos utilizados apresentavam uma manta acrílica que suportava o material vegetal e impedia a imersão deste no meio de cultura, favorecendo a sua oxigenação (Figura 6).

Logo após a transferência para o meio líquido, os frascos foram submetidos a diferentes níveis de temperatura (Tabela 2) em BOD por duas horas (SOUZA, 2001) e cultivados na sala de crescimento durante 20 dias em condições constantes de luz ($50\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ PAR) e temperatura ($26 \pm 2\ ^\circ\text{C}$), com fotoperíodo de 12 horas.

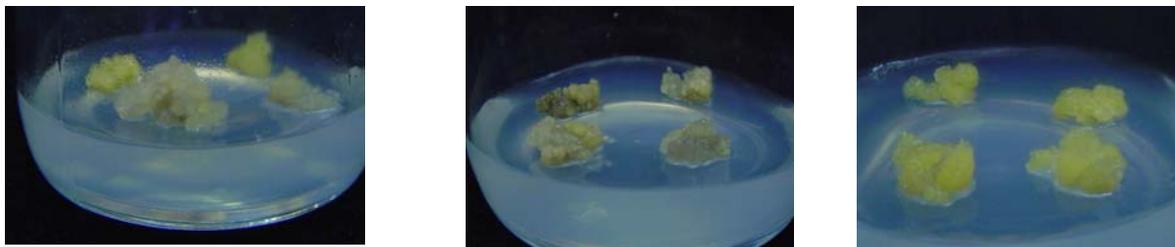


Figura 5 - Calos de *Eucalyptus urophylla* com 120 dias em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) sólido suplementado com 5mg.L^{-1} de Picloram

Tabela 2 - Descritivo dos tratamentos realizados

Tratamentos	Descrição
1	Calos submetidos à 25°C por duas horas em meio de cultura N7 sem PEG
2	Calos submetidos à 25°C por duas horas em meio de cultura N7 com 20% PEG (6000)
3	Calos submetidos à 30°C por duas horas em meio de cultura N7 com 20% PEG (6000)
4	Calos submetidos à 35°C por duas horas em meio de cultura N7 com 20% PEG (6000)
5	Calos submetidos à 40°C por duas horas em meio de cultura N7 com 20% PEG (6000)
6	Calos submetidos à 45°C por duas horas em meio de cultura N7 com 20% PEG (6000)



Figura 6 – Calos de *Eucalyptus urophylla* em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) líquido, com manta acrílica, suplementado com 200mg.L⁻¹ de polietilenoglicol (PEG 6000) e com 5mgL⁻¹ de Picloram logo após o tratamento de temperatura

Decorrido o período estipulado, 150 frascos (25 frascos de cada tratamento) foram avaliados segundo o item 2.2.4 e o restante (150 frascos) foi transferido para meio de cultura sólido N7 suplementado com 5 mg L⁻¹ de Picloram (SIMOLA, 1985; Tabela 1) para se recuperar.

Depois de quatro meses, parte dos calos que sobreviveram à primeira seleção (acima descritos) foi transferida para meio líquido N7 para avaliar a recuperação das linhagens celulares, e o restante foi novamente submetido à seleção detalhada na tabela 2, onde cada tratamento passou pelas mesmas condições de estresse sofridas anteriormente.

Após 20 dias, tanto os frascos submetidos à segunda pressão de seleção como os destinados a verificar a capacidade de recuperação foram avaliados segundo o item 2.2.4.

Para cada tratamento realizado em cada fase de experimentação (primeira seleção, recuperação e segunda seleção), foram feitas 20 repetições com 4 calos cada uma (4 repetições para cada variável avaliada; item 2.2.4). Na primeira seleção, o peso médio do material vegetal

transferido para cada frasco era de 487mg. Já no período de recuperação e na segunda seleção, cada repetição tinha, em média, 911mg de material vegetal inicialmente.

Toda a experimentação se resume ao seguinte esquema (Figura 7):

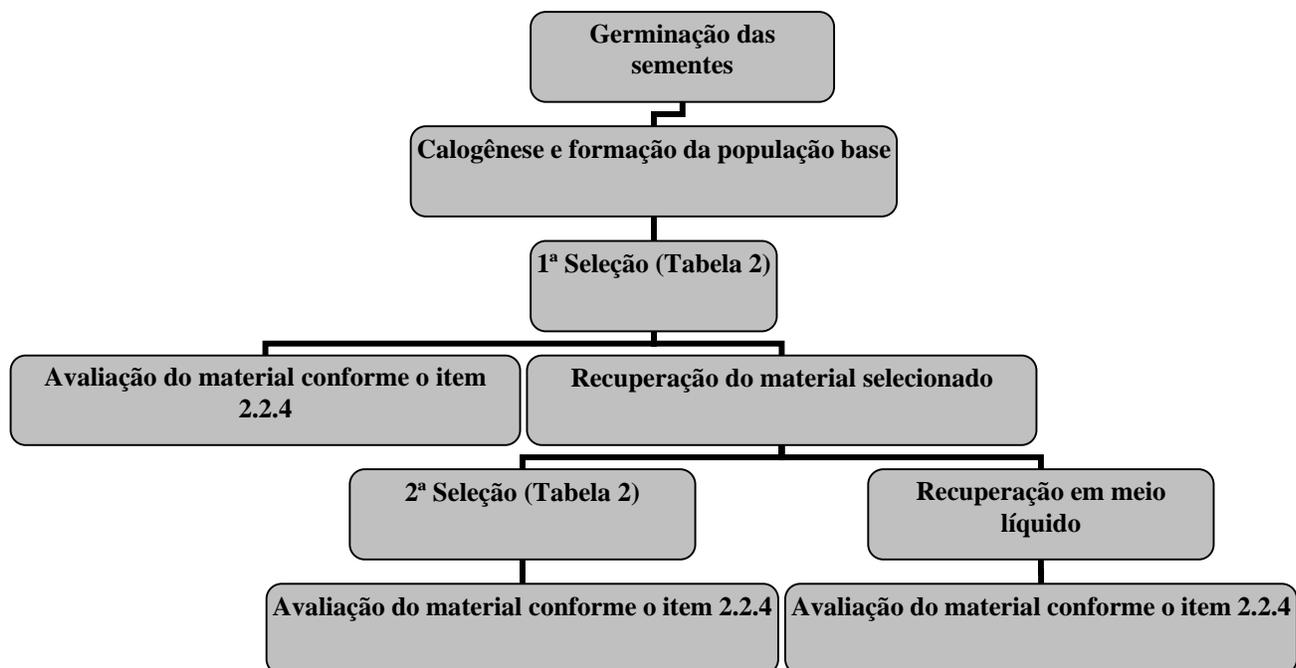


Figura 7 – Panorama geral da experimentação realizada em calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos à deficiência hídrica e ao estresse térmico

2.2.4 Avaliação do material selecionado

O material sobrevivente, após as duas seleções e ao período de recuperação, foi avaliado quanto ao crescimento (peso fresco e peso seco) e às características bioquímicas (através da quantificação do teor de prolina, de proteínas totais solúveis e de carboidratos não-estruturais solúveis).

Para cada variável analisada, foram utilizadas quatro repetições (com quatro calos) de cada tratamento.

2.2.4.1 Determinação de peso fresco e peso seco

Decorrido cada período de seleção, quatro frascos eram aleatoriamente escolhidos para a determinação do peso fresco e seco. Para isso, os calos foram colocados em folhas de papel toalha, para que fossem absorvidos os resquícios de meio de cultura, e pesados em balança analítica. Em seguida, o material foi submetido ao processo de secagem em estufa a uma temperatura de 60°C por um período de 48 horas ou até que se atingisse uma massa seca constante e pesada em balança analítica.

Após a obtenção desses dados, a taxa de crescimento relativa (TCR) foi obtida através da seguinte equação modificada do trabalho de Hunt (1982):

$$TCR = \frac{\ln PMVS(X_n) - (X_0) \times 100}{T(X_n)}$$

Onde: In = Logaritmo Neperiano; PMVS (Xn) = massa da matéria seca média tomada ao final de cada amostragem; PMVS (X₀) = massa vegetal seca média tomada no início da instalação do experimento e T(Xn) = Tempo de cultivo (20 dias).

2.2.4.2 Quantificação do teor de carboidratos não-estruturais solúveis (modificado de PELAH et al., 1997)

Os açúcares solúveis foram extraídos através da maceração dos calos em etanol 80% e sua posterior filtração. Após a evaporação total do sobrenadante em estufa à 50°C, os açúcares foram ressuspensos em 25ml de água destilada, deionizada e filtrada em membrana Milipore com 47mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade, agitados por 10 minutos no ultra-som e filtrados em membrana Milipore com 25 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade. A separação dos carboidratos ocorreu em HPLC (Shimatzu LC 10 A), o qual usava uma coluna HPX87H e estava acoplado a um detector de refração RID-10^a. Nesse, foi determinado o teor de glicose, poliose (composto por xilose e outros carboidratos não identificados), ácido glucorônico, celobiose e arabinose em cada repetição.

2.2.4.3 Quantificação do teor de prolina (BATES et al., 1973)

A prolina foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Bates et al (1973), no qual a extração deste aminoácido resultou da maceração de 300-500mg do material vegetal fresco (M.V.F.) em 10ml de solução 3% de ácido sulfossalicílico.

Em seguida, ocorreu a filtração desse extrato, obtendo-se um líquido que serviu de matéria-prima para a análise.

Então, em um tubo de ensaio adicionou-se 1ml do extrato obtido, 1 ml de ácido acético glacial e 1ml da solução de ninidrina ácida, os quais foram levados por uma hora em banho-maria. Decorrido o tempo, os tubos foram submetidos a um banho de gelo. A leitura dessa solução foi feita em espectrofotômetro em absorvância de 520nm e cada repetição foi lida em quadruplicata.

2.2.4.4 Quantificação de proteínas solúveis (BRADFORD, 1976)

Amostras de calos, com 300-500mg, foram maceradas em solução de extração contendo 4ml de tampão Tris-HCl pH 6,8, 1,6ml de 2-mercaptoetanol, 6,4ml de SDS 10%, 6,4ml de glicerol, 3,2ml de DMSO, 10,4ml de água deionizada e uma pitada de PVP.

Após este procedimento, o material vegetal permaneceu por 1 hora em reação à temperatura ambiente e, em seguida, a mistura foi aquecida à 100°C durante três minutos.

Depois do resfriamento, as amostras foram centrifugadas à 12000rpm por 50s para se obter o extrato bruto, sendo o sobrenadante utilizado para quantificar o teor de proteínas totais solúveis.

Após a reação com o corante de Bradford (BRADFORD, 1976), as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro com absorvância de 595nm e lidas em quadruplicata para as quatro repetições de cada tratamento avaliado.

2.2.5 Análise estatística

Todos os resultados obtidos durante a experimentação foram avaliados pela análise fatorial utilizando técnicas de componentes principais (PCA) e pela comparação de médias de acordo com a Análise de Variância (ANOVA) e LDS (Least Significant Difference) utilizando o programa estatístico SPSS.

2.3 Resultados

2.3.1 Considerações gerais

Quanto à avaliação visual dos calos nos diversos tratamentos, verifica-se que houve diferença entre o tratamento 1 (testemunha) e os demais (T2 a T6) na primeira (Figura 8) e

segunda seleção (Figura 10) quanto à coloração, na qual o tratamento 1 apresentou coloração voltada mais para o amarelo claro e os demais para amarelo escuro, bem como à oxidação, sendo que nesta houve uma necrose basal (na interface de contato do calo com o meio de cultura) somente nos tratamentos submetidos à deficiência hídrica. Porém entre os tratamentos 2 ao 6, não se observou nenhuma diferença. Já na etapa de recuperação, não houve diferença entre os tratamentos quanto a coloração e oxidação (Figura 9).

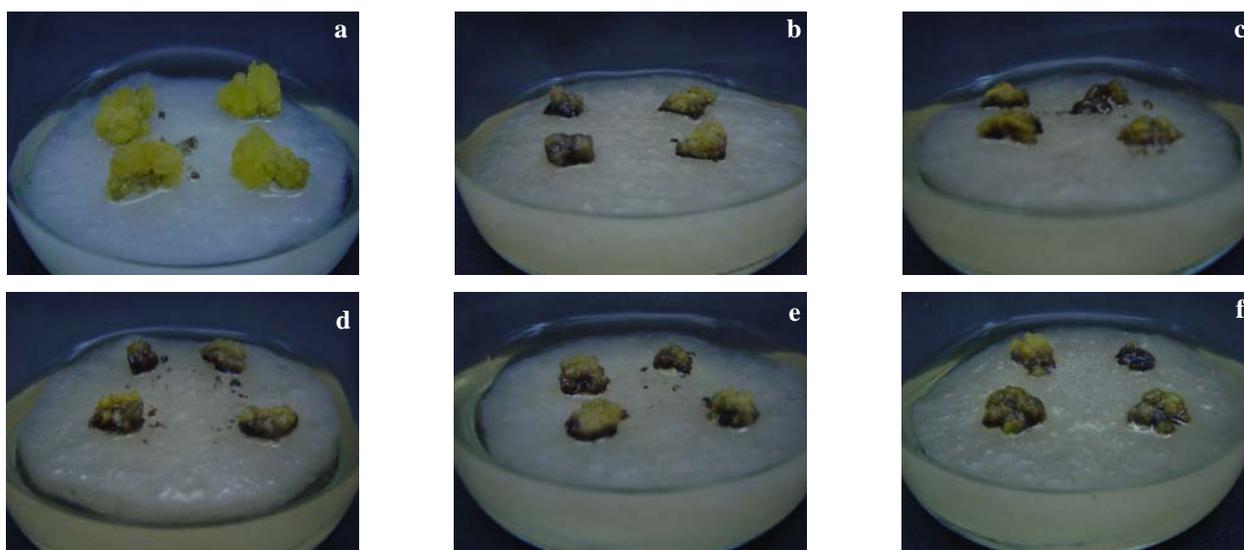


Figura 8 - Calos de *Eucalyptus urophylla* após vinte dias de cultivo em meio líquido com deficiência hídrica para primeira seleção, apoiados em manta acrílica

Onde: a) tratamento 1 (testemunha 1 – calos submetidos à 25°C por duas horas em meio sem PEG); b) tratamento 2 (testemunha 2 – calos submetidos à 25°C por duas horas em meio com PEG); c) tratamento 3 (calos submetidos à 30°C por duas horas em meio com PEG); d) tratamento 4 (calos submetidos à 35°C por duas horas em meio com PEG); e) tratamento 5 (calos submetidos à 40°C por duas horas em meio com PEG); f) tratamento 6 (calos submetidos à 45°C por duas horas em meio com PEG)

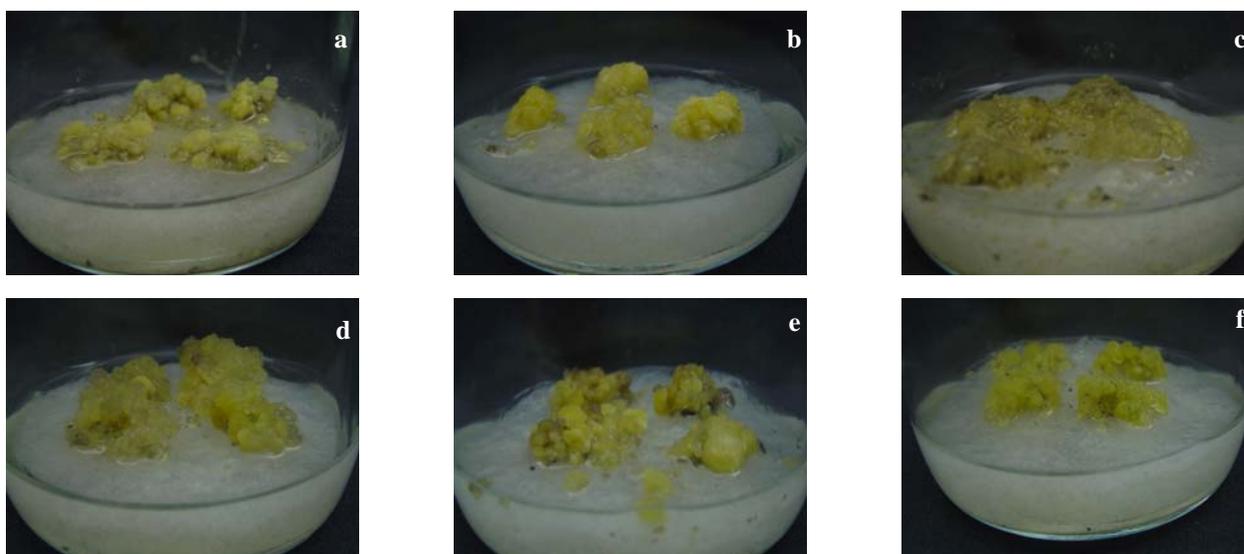


Figura 9 - Calos de *Eucalyptus urophylla* após vinte dias de cultivo em meio N7 líquido para recuperação, apoiados em manta acrílica

Onde: a) tratamento 1 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio sem PEG); b) tratamento 2 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio com PEG); c) tratamento 3 (calos submetidos à 30°C por duas horas em meio com PEG); d) tratamento 4 (calos submetidos à 35°C por duas horas em meio com PEG); e) tratamento 5 (calos submetidos à 40°C por duas horas em meio com PEG); f) tratamento 6 (calos submetidos à 45°C por duas horas em meio com PEG)

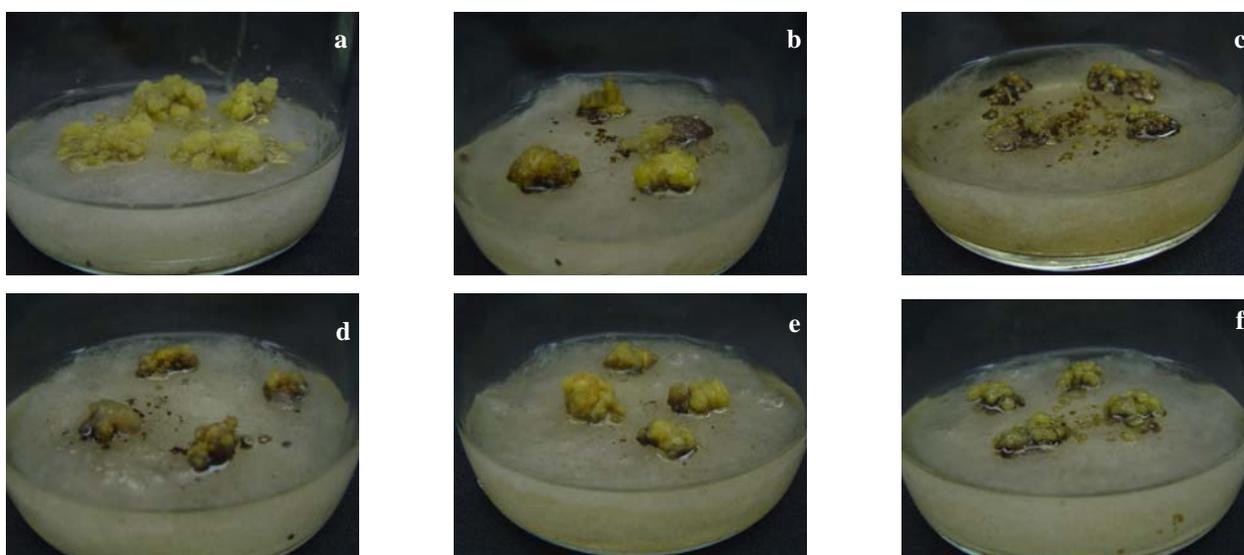


Figura 10 - Calos de *Eucalyptus urophylla* após vinte dias de cultivo em meio líquido com deficiência hídrica para segunda seleção, apoiados em manta acrílica

Onde: a) tratamento 1 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio sem PEG); b) tratamento 2 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio com PEG); c) tratamento 3 (calos submetidos à 30°C por duas horas em meio com PEG); d) tratamento 4 (calos submetidos à 35°C por duas horas em meio com PEG); e) tratamento 5 (calos submetidos à 40°C por duas horas em meio com PEG); f) tratamento 6 (calos submetidos à 45°C por duas horas em meio com PEG)

2.3.2 Crescimento relativo dos calos

Quanto ao crescimento relativo, verifica-se que, durante o período de experimentação, os calos de todos os tratamentos acumularam matéria seca. Isso aponta que as condições de estresse não afetaram o crescimento das células e, no caso dos tratamentos 2 ao 5, esse estado contribuiu para o aumento na produção de massa seca (Figura 11A; Anexo A).

Durante a primeira seleção, todos os tratamentos estressados acumularam matéria seca de igual forma. Já no período de recuperação, o tratamento 4 e 5 apresentaram elevado crescimento quando comparados com os demais, porém todos mantiveram o desenvolvimento obtido na etapa anterior quando observados isoladamente. Na segunda seleção, os tratamentos 2 ao 5 atingiram uma elevada taxa de crescimento, enquanto o tratamento 6, bem como o controle (tratamento 1) mantiveram os índices obtidos na primeira seleção e na fase recuperação.

Isso indica que apesar da deficiência hídrica, o crescimento dos calos não foi afetado, pois durante a primeira fase de seleção, o crescimento elevou-se nessas linhagens quando comparadas com o seu estado inicial.

Além disso, não houve alterações na capacidade de recuperação destes após o estresse, pois, no período estudado, os calos apresentaram o mesmo crescimento obtido durante a primeira fase de seleção, porém acumularam mais matéria seca na segunda exposição à deficiência hídrica, como no caso dos tratamentos 4 e 5, demonstrando que nenhum dano que comprometesse as células ocorreu.

Em relação à temperatura alta, a taxa de crescimento não foi influenciada por esta na primeira seleção e na fase de recuperação. Porém, na segunda exposição à deficiência hídrica, somente o tratamento 6 apresentou uma estabilização no crescimento, não diferindo das fases anteriores (Figura 11B; Anexo A). Isso demonstra, talvez, que a temperatura tenha se tornado um fator de estresse que influencia negativamente o crescimento desses calos.

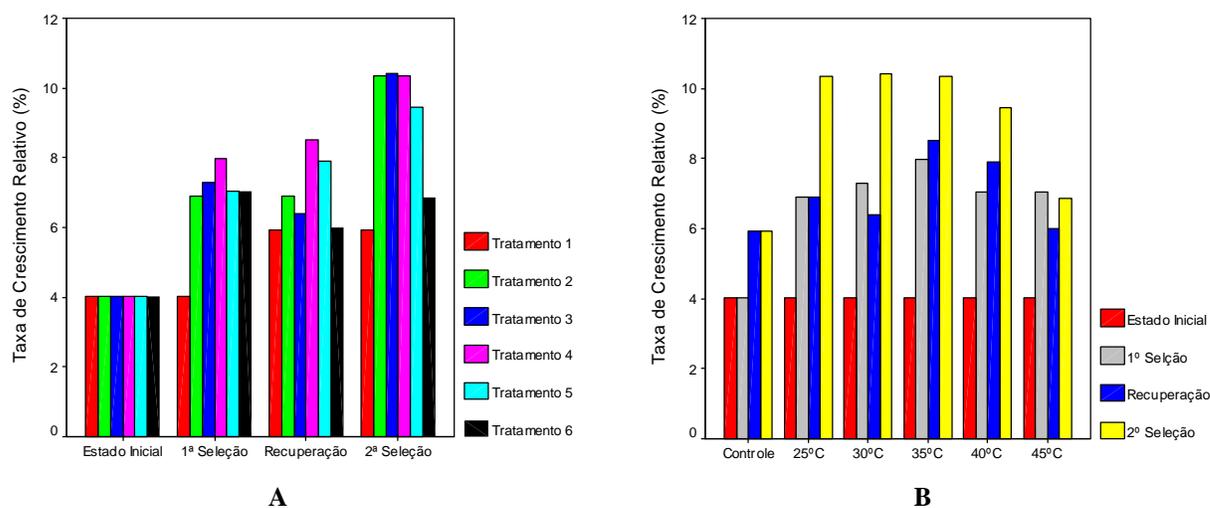


Figura 11 – Taxa de crescimento relativo nos calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos aos estresses hídrico e térmico em diferentes fases de seleção (A) (estado inicial, 1ª seleção, recuperação e 2ª seleção) e sob variações de temperatura (B). Para visualizar as comparações de médias, ver anexo A

Onde: tratamento 1 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio sem PEG); tratamento 2 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 3 (calos submetidos à 30°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 4 (calos submetidos à 35°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 5 (calos submetidos à 40°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 6 (calos submetidos à 45°C por duas horas em meio com PEG).

2.3.3 Avaliação do tratamento 1

O tratamento 1 era composto por calos que não passaram por nenhum tipo de estresse avaliado. Pois, durante todo o período de experimentação, esses foram mantidos em condições normais de cultura (meio N7 sem agente estressor, os quais ficaram sob condições constantes de luz e temperatura com fotoperíodo de 12 horas, descritos no item 2.2.2).

Assim, esses calos caracterizavam a população base do experimento nas diferentes etapas de seleção (estado inicial, primeira seleção, recuperação e segunda seleção).

Dessa forma, o teor de prolina desses calos variou entre 362 a 536 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de material vegetal fresco (M.V.F.) (Figura 12a), o teor de proteínas solúveis totais entre 14 a 15 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F. (Figura 12b), o teor de ácido glucorônico entre 5 a 14 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F. (Figura 12c), o teor de celobiose entre 7 a 19 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F. (Figura 12d), o teor de glicose de 3 a 6 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F. (Figura 12e) e o teor de poliose entre 10 a 17 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F. (Figura 12f).

Dessas variáveis acima relatadas, somente o teor de glicose não apresentou diferenças estatísticas entre as duas primeiras etapas (estado inicial antes do estresse e primeira seleção) e as duas últimas (recuperação e segundo estresse).

Esses dados demonstram que mesmo não estando em condições de estresse, a população apresenta flutuações dentre os parâmetros avaliados.

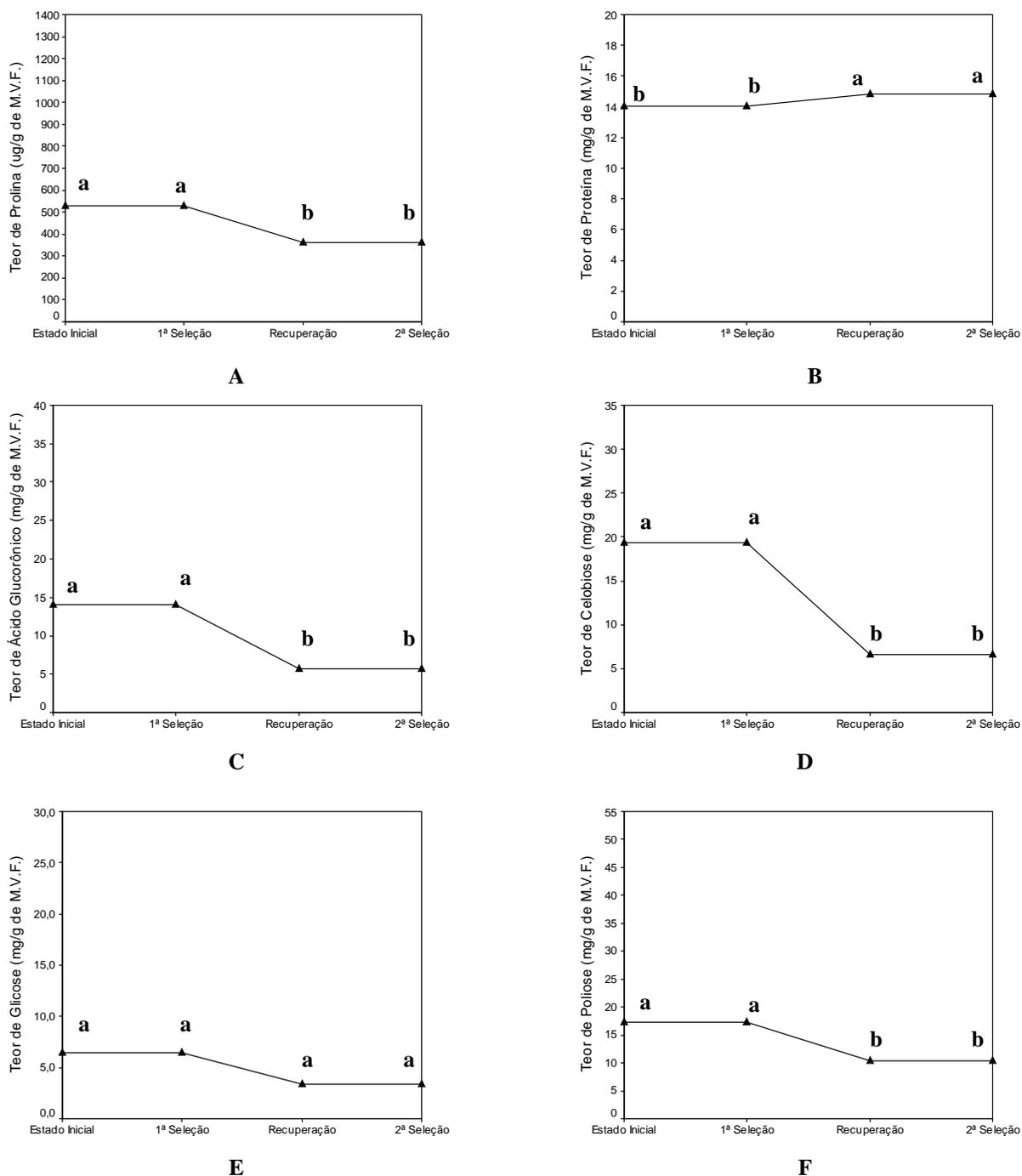


Figura 12 - Parâmetros bioquímicos do tratamento 1 ao final das diferentes fases de seleção (estado inicial, primeira seleção, recuperação e segunda seleção) de calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos à 25°C por duas horas em BOD e em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) por 20 dias

Onde: A) Teor de Prolina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de Material Vegetal Fresco); B) Teor de Proteína Solúveis Totais ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F.); C) Teor de Ácido Glucurônico ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F.); D) Teor de Celobiose ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F.), E) Teor de Glicose ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F.); F) Teor de Poliose ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F.). Letras iguais para cada tratamento nos diferentes períodos não apresentam diferença pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade

2.3.4 Avaliação do tratamento 2

No tratamento 2, os calos foram submetidos somente à deficiência hídrica e alteraram o teor de prolina, proteína, ácido glucorônico, glicose e poliose frente as diferentes etapas de seleção. Já o teor de celobiose permaneceu estável nesse período (Figura 13d).

Quanto ao teor de prolina, houve uma grande produção desse aminoácido durante a primeira seleção, a qual diferiu estatisticamente de todas as outras etapas. Após isso, o teor de prolina retornou ao nível inicial durante o período de recuperação e, ao ser exposto novamente ao agente estressor, ocorreu um acréscimo desse aminoácido, mas não da mesma forma que ocorreu durante a primeira seleção (Figura 13a).

Já as proteínas solúveis totais apresentaram um aumento no seu teor durante a primeira seleção e o período de recuperação. Porém, durante a segunda seleção, houve uma queda nesse, retornando ao estado inicial (antes do estresse) (Figura 13b).

Em relação ao teor de ácido glucorônico, houve um acúmulo deste durante a primeira seleção, a qual se normalizou no período de recuperação e segunda seleção, ou seja, retornou ao estado inicial (Figura 13c).

Os teores de glicose e poliose apresentaram respostas semelhantes, nos quais houve um acréscimo no teor desses açúcares durante a primeira seleção, sendo que, após a retirada do agente estressor, os níveis de glicose (Figura 13e) e poliose (Figura 13f) diminuíram e com a segunda seleção, subiram novamente. Porém, tanto o período de recuperação como a segunda seleção não diferiram estatisticamente do teor desses açúcares no estado inicial.

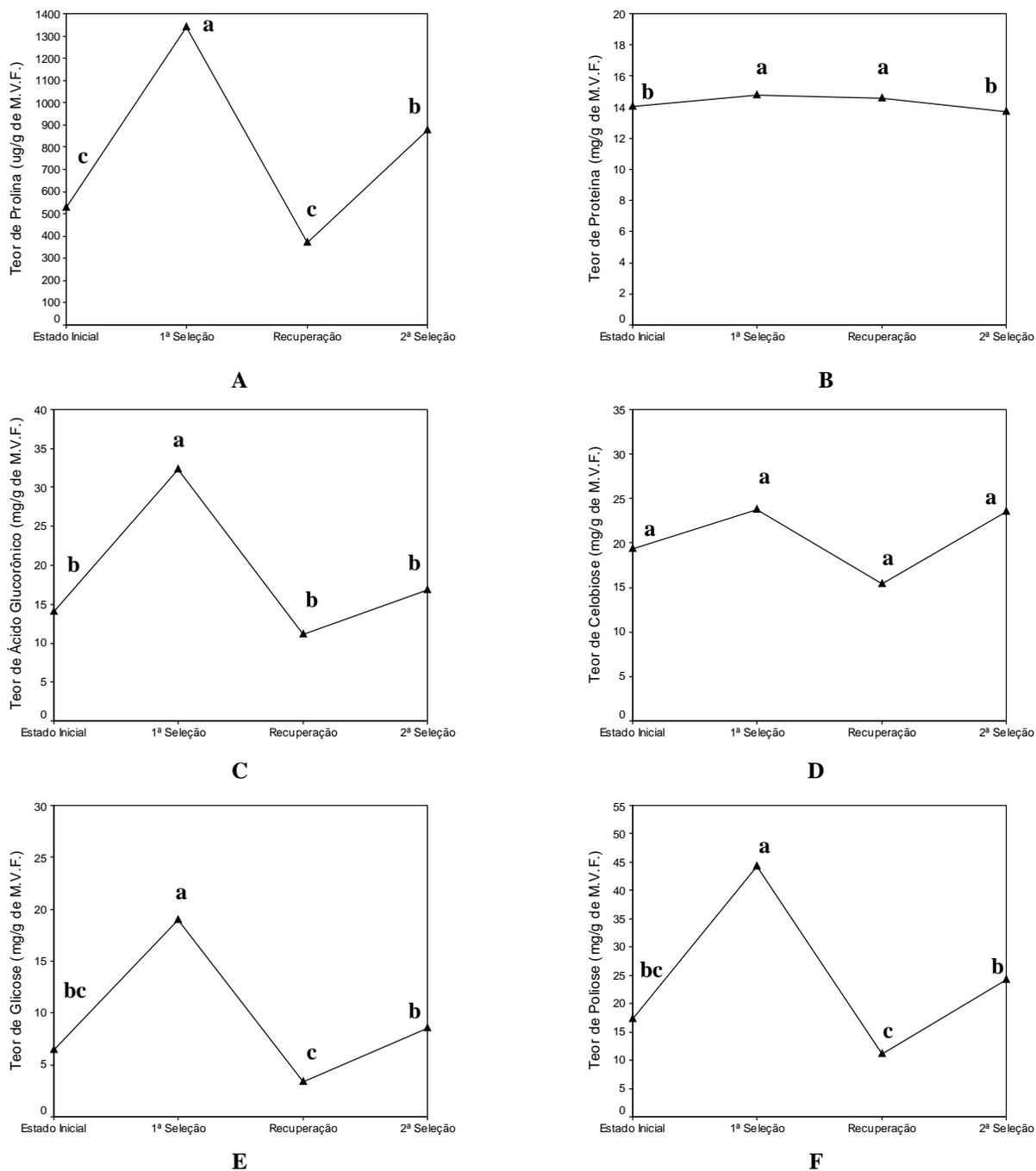


Figura 13 - Parâmetros bioquímicos do tratamento 2 ao final das diferentes fases de seleção (estado inicial, primeira seleção, recuperação e segunda seleção) de calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos à 25°C por duas horas em BOD e em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) suplementados com 20% de PEG 6000 por 20 dias

Onde: A) Teor de Prolina ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de Material Vegetal Fresco); B) Teor de Proteína Solúveis Totais (mg.g^{-1} de M.V.F.); C) Teor de Ácido Glucurônico (mg.g^{-1} de M.V.F.); D) Teor de Celobiose (mg.g^{-1} de M.V.F.), E) Teor de Glicose (mg.g^{-1} de M.V.F.); F) Teor de Poliose (mg.g^{-1} de M.V.F.). Letras iguais para cada tratamento nos diferentes períodos não apresentam diferenças significativas pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade

2.3.5 Avaliação do tratamento 3

No tratamento 3, os calos foram submetidos à deficiência hídrica e a um estresse térmico de 30°C por duas horas. Nesse, o material vegetal permaneceu estável quanto ao teor de prolina, proteína, ácido glucorônico, celobiose.

Em relação ao teor de prolina, não houve alteração significativa neste durante toda a etapa de seleção (Figura 14a).

Já as proteínas solúveis totais apresentaram um aumento no seu teor durante a primeira seleção, porém, durante a recuperação e a segunda seleção, houve uma queda nesse, retornando ao estado inicial (antes do estresse) (Figura 14b).

Quanto ao teor de ácido glucorônico, houve um acúmulo deste durante a primeira seleção e a recuperação, a qual retornou ao estado inicial na segunda seleção (Figura 14c).

Além disso, o teor de celobiose permaneceu estável durante a primeira seleção e recuperação (não diferindo estatisticamente do estado inicial) e, durante a segunda seleção, apresentou uma redução significativa na sua quantidade (Figura 14d).

Os teores de glicose e poliose apresentaram respostas semelhantes, nos quais houve um acréscimo no teor desses açúcares durante a primeira seleção, sendo que, após a retirada do agente estressor, os níveis de glicose (Figura 14e) e poliose (Figura 14f) diminuíram e permaneceram dessa forma durante a segunda seleção.

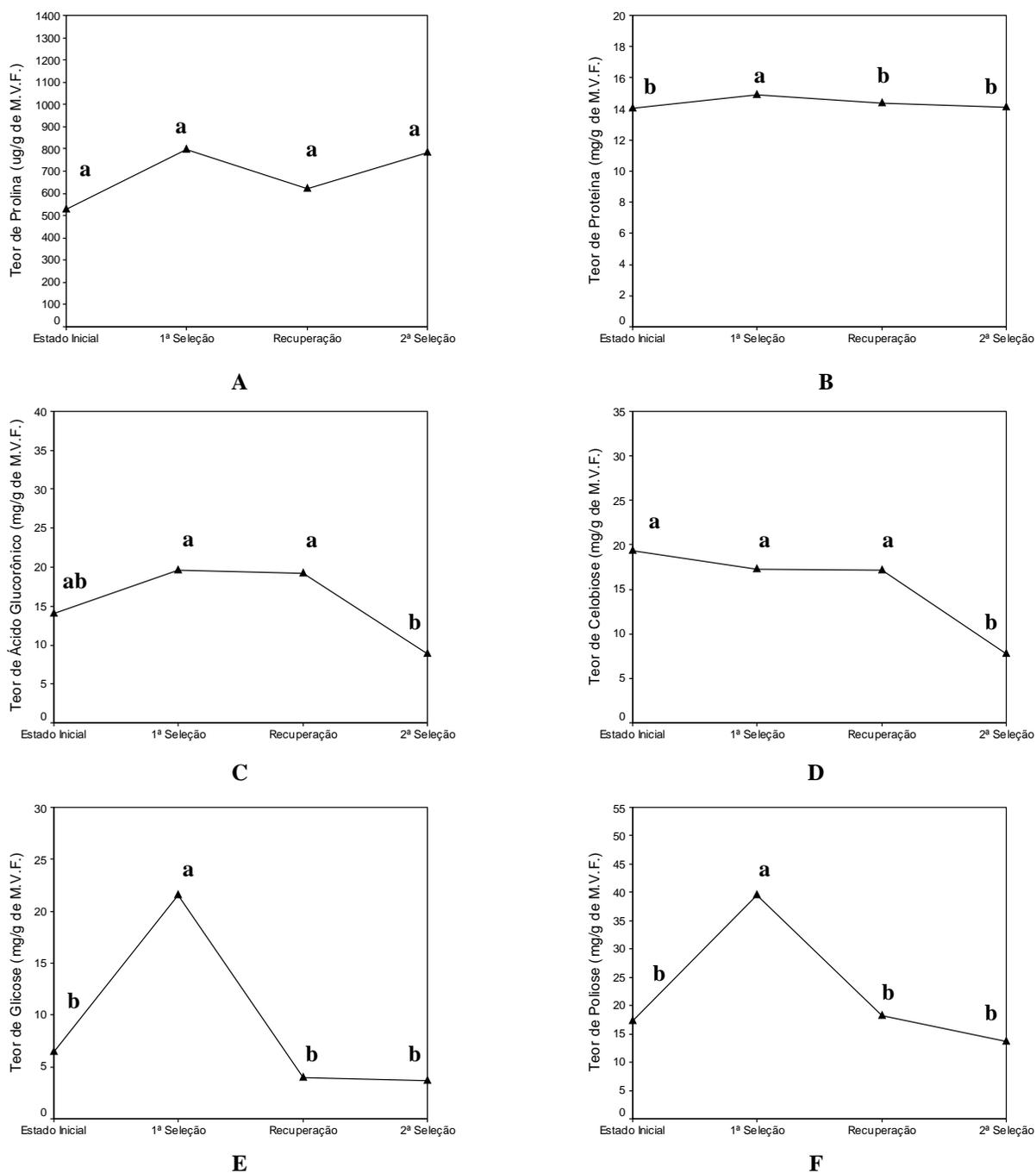


Figura 14 - Parâmetros bioquímicos do tratamento 3 ao final das diferentes fases de seleção (estado inicial, primeira seleção, recuperação e segunda seleção) de calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos à 30°C por duas horas em BOD e em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) suplementados com 20% de PEG 6000 por 20 dias

Onde: A) Teor de Prolina (µg.g-1 de Material Vegetal Fresco); B) Teor de Proteína Solúveis Totais (mg.g-1 de M.V.F.); C) Teor de Ácido Glucurônico (mg.g-1 de M.V.F.); D) Teor de Celobiose (mg.g-1 de M.V.F.); E) Teor de Glicose (mg.g-1 de M.V.F.); F) Teor de Poliose (mg.g-1 de M.V.F.). Letras iguais para cada tratamento nos diferentes períodos não apresentam diferenças significativas pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade

2.3.6 Avaliação do tratamento 4

No tratamento 4, os calos foram submetidos à deficiência hídrica e a um estresse térmico de 35°C por duas horas. Nesse, todas as variáveis alteraram conforme a etapa de seleção.

Quanto ao teor de prolina, houve um aumento desse aminoácido durante a primeira seleção, o qual não se manteve durante o período de recuperação e na segunda seleção (Figura 15a).

Já as proteínas solúveis totais apresentaram um aumento no seu teor durante a primeira e a segunda seleção, porém, durante a recuperação houve uma queda nesse, não diferindo estatisticamente do estado inicial (Figura 15b).

Os teores de ácido glucorônico (Figura 15c), celobiose (Figura 15d), glicose (Figura 15e) e poliose (Figura 15f) apresentaram respostas semelhantes, nos quais houve um acréscimo no teor desses açúcares durante a primeira seleção, sendo que, após a retirada do agente estressor, os níveis desses diminuíram e permaneceram dessa forma durante a segunda seleção.

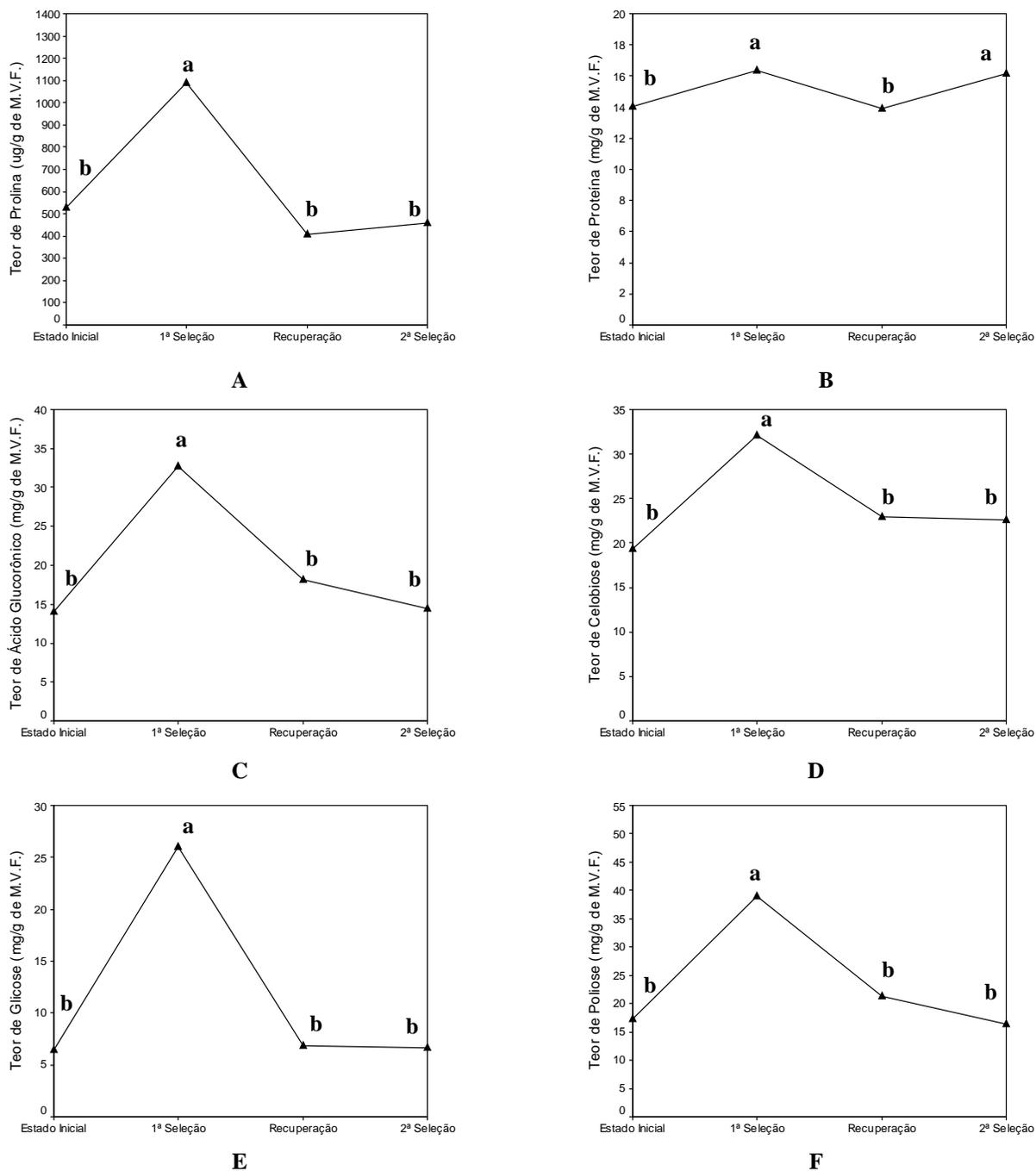


Figura 15 - Parâmetros bioquímicos do tratamento 2 ao final das diferentes fases de seleção (estado inicial, primeira seleção, recuperação e segunda seleção) de calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos à 35°C por duas horas em BOD e em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) suplementados com 20% de PEG 6000 por 20 dias

Onde: A) Teor de Prolina (µg.g-1 de Material Vegetal Fresco); B) Teor de Proteína Solúveis Totais (mg.g-1 de M.V.F.); C) Teor de Ácido Glucurônico (mg.g-1 de M.V.F.); D) Teor de Celobiose (mg.g-1 de M.V.F.); E) Teor de Glicose (mg.g-1 de M.V.F.); F) Teor de Poliose (mg.g-1 de M.V.F.). Letras iguais para cada tratamento nos diferentes períodos não apresentam diferenças significativas pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade

2.3.7 Avaliação do tratamento 5

No tratamento 5, os calos foram submetidos à deficiência hídrica e a um estresse térmico de 40°C por duas horas. Nesse, todas as variáveis alteraram conforme a etapa de seleção.

Em relação a prolina, o teor desse aminoácido não diferiu estatisticamente do estado inicial durante a primeira seleção e a recuperação. Porém, na segunda seleção houve um acúmulo de prolina (Figura 16a).

Já as proteínas solúveis totais apresentaram um aumento na sua quantidade durante a primeira e a segunda seleção, porém, durante a recuperação houve uma queda no seu teor, não diferindo estatisticamente do estado inicial (Figura 16b).

Os teores de ácido glucorônico (Figura 16c), celobiose (Figura 16d), glicose (Figura 16e) e poliose (Figura 16f) apresentaram respostas semelhantes, nos quais houve um acréscimo no teor desses açúcares durante a primeira seleção, sendo que, após a retirada do agente estressor, os níveis desses diminuíram e permaneceram dessa forma durante a segunda seleção.

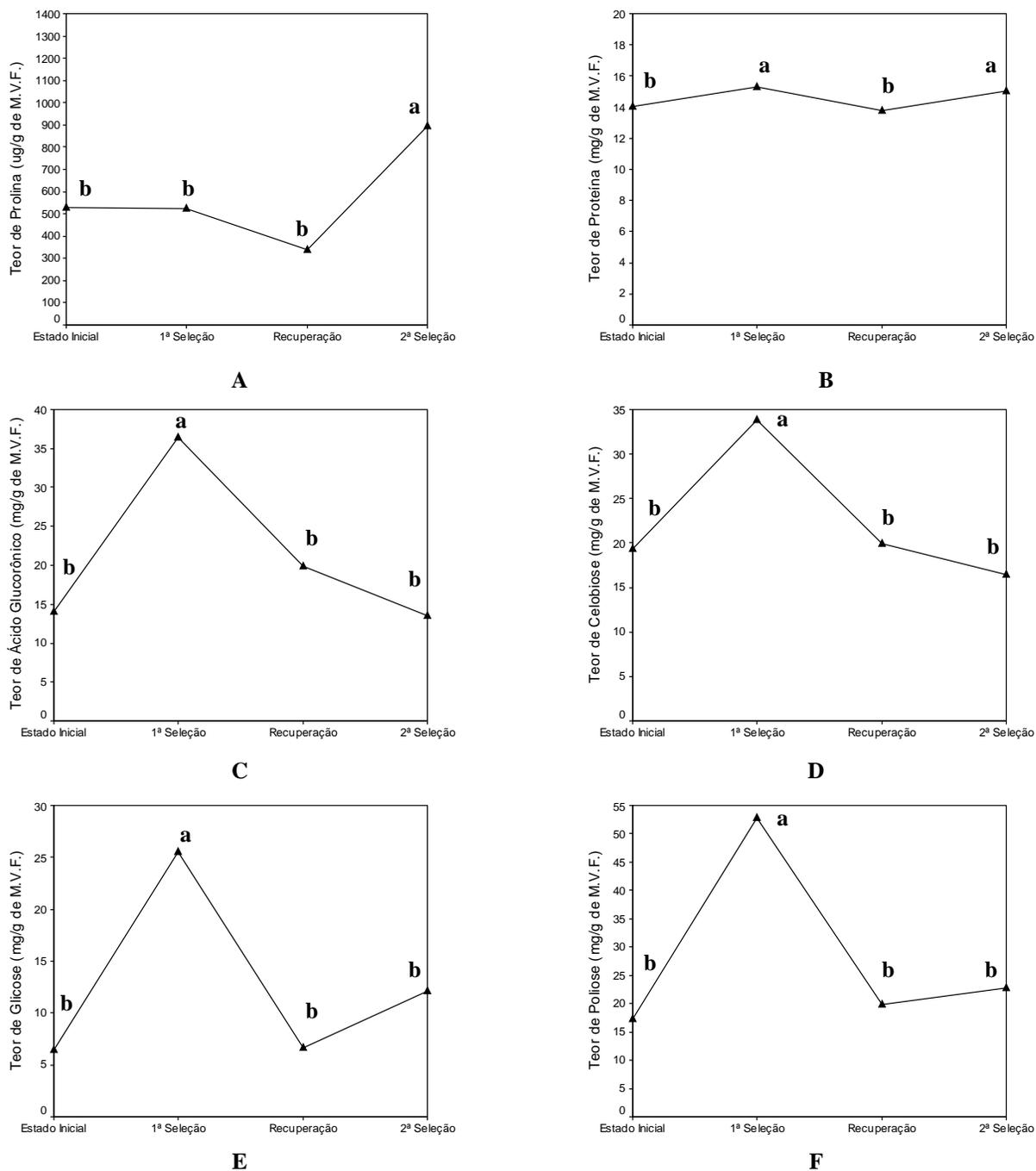


Figura 16 - Parâmetros bioquímicos do tratamento 5 ao final das diferentes fases de seleção (estado inicial, primeira seleção, recuperação e segunda seleção) de calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos à 40°C por duas horas em BOD e em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) suplementados com 20% de PEG 6000 por 20 dias

Onde: A) Teor de Prolina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de Material Vegetal Fresco); B) Teor de Proteína Solúveis Totais ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F.); C) Teor de Ácido Glucurônico ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F.); D) Teor de Celobiose ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F.); E) Teor de Glicose ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F.); F) Teor de Poliose ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F.). Letras iguais para cada tratamento nos diferentes períodos não apresentam diferenças significativas pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade

2.3.8 Avaliação do tratamento 6

No tratamento 6, os calos foram submetidos à deficiência hídrica e a um estresse térmico de 45°C por duas horas. Nesse, somente a celobiose não se alterou no decorrer do experimento (Figura 17d).

Quanto ao teor de prolina, houve um aumento desse aminoácido durante a primeira seleção, o qual não se manteve durante o período de recuperação e na segunda seleção (Figura 17a).

Já as proteínas solúveis totais apresentaram um aumento no seu teor durante a primeira e a segunda seleção, porém o acúmulo da segunda seleção foi menor que o da primeira, diferindo estatisticamente entre si. No período de recuperação houve uma queda no teor de proteínas, retornando ao estado inicial (antes do estresse) (Figura 17b).

Em relação ao teor de ácido glucorônico, houve um acúmulo deste durante a primeira seleção, o qual se normalizou no período de recuperação e segunda seleção, ou seja, retornou ao estado inicial (Figura 17c).

Os teores de glicose e poliose apresentaram respostas semelhantes, nos quais houve um acréscimo no teor desses açúcares durante a primeira seleção, sendo que, após a retirada do agente estressor, os níveis de glicose (Figura 17e) e poliose (Figura 17f) diminuíram. Com a segunda seleção, os teores subiram novamente, os quais não diferiram estatisticamente do estado inicial.

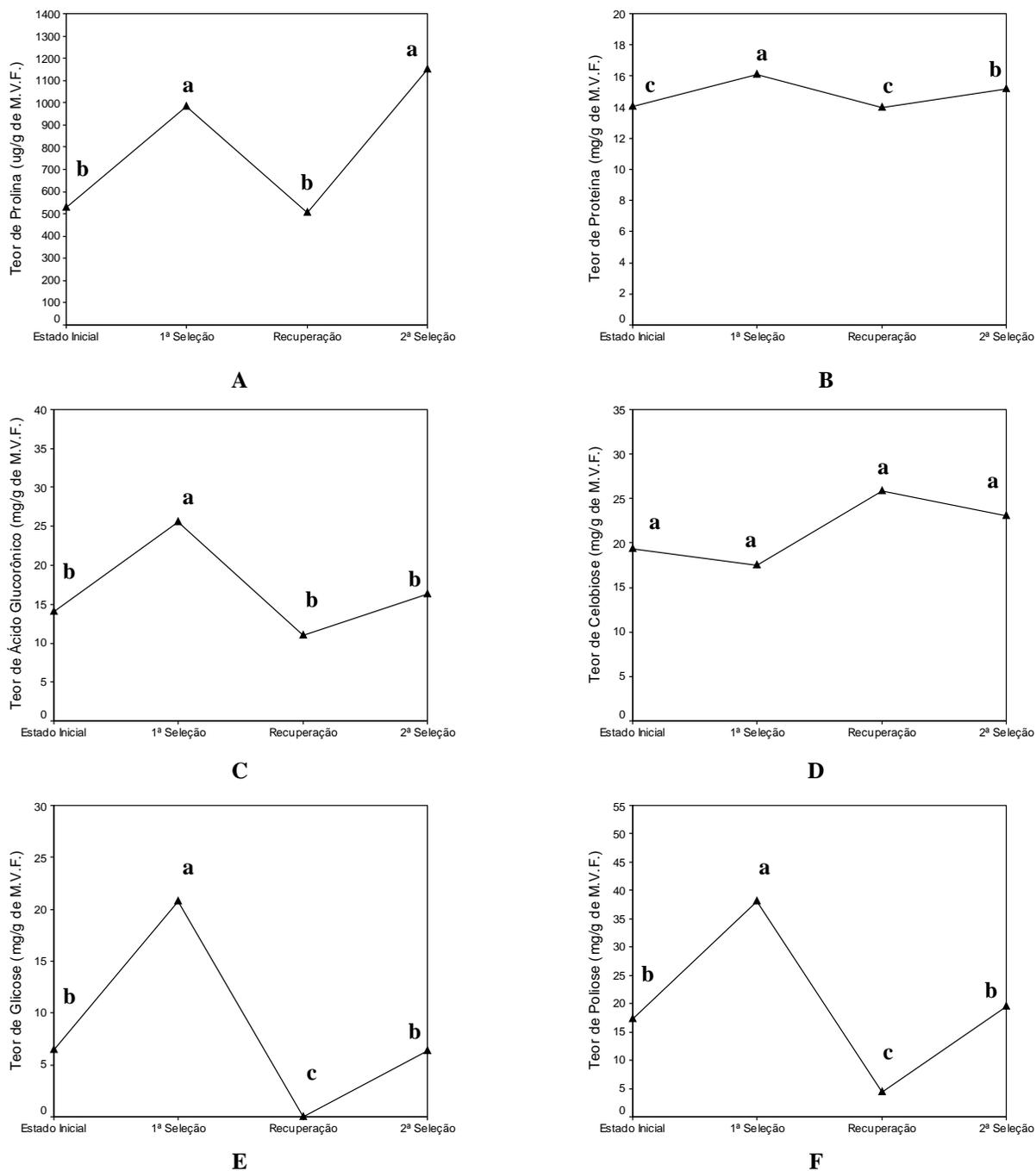


Figura 17 - Parâmetros bioquímicos do tratamento 6 ao final das diferentes fases de seleção (estado inicial, primeira seleção, recuperação e segunda seleção) de calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos à 45°C por duas horas em BOD e em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) suplementados com 20% de PEG 6000 por 20 dias

Onde: A) Teor de Prolina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de Material Vegetal Fresco); B) Teor de Proteína Solúveis Totais ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F.); C) Teor de Ácido Glucurônico ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F.); D) Teor de Celobiose ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F.); E) Teor de Glicose ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F.); F) Teor de Poliose ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de M.V.F.). Letras iguais para cada tratamento nos diferentes períodos não apresentam diferenças significativas pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade

2.3.9 Teor de prolina

Quanto ao teor de prolina, os calos estudados responderam a deficiência hídrica acumulando esse aminoácido durante a primeira e a segunda seleção, sendo que após a retirada desse fator de estresse (fase de recuperação), as células reduziram o teor deste (Figura 18A; Anexo A). Somente os tratamentos 3 e 5 mantiveram estáveis os teores de prolina desde o estado inicial (antes do estresse térmico e hídrico) até o período de recuperação. Já durante a segunda seleção, o tratamento 3 permaneceu estável, mas o tratamento 5 acumulou esse aminoácido (Figura 18B; Anexo A). Essa informação demonstra que, para tolerar a deficiência hídrica, não foi necessário acumular prolina no tratamento 5 até a fase de recuperação e no tratamento 3 por toda a experimentação.

Ao contrário destes, o tratamento 2 apresentou o maior teor de prolina, não diferindo estatisticamente somente do tratamento 4 na primeira seleção (Figura 18A e 18B; Anexo A). Isso indica que sem o tratamento com temperatura acima de 25°C, os calos deste precisaram acumular mais solutos compatíveis para tolerar a deficiência hídrica, pois não contava com as proteínas de choque térmico para auxiliar na regulação osmótica como ocorreu nos tratamentos 3, 4, 5 e 6 (Figura 18A; Anexo A).

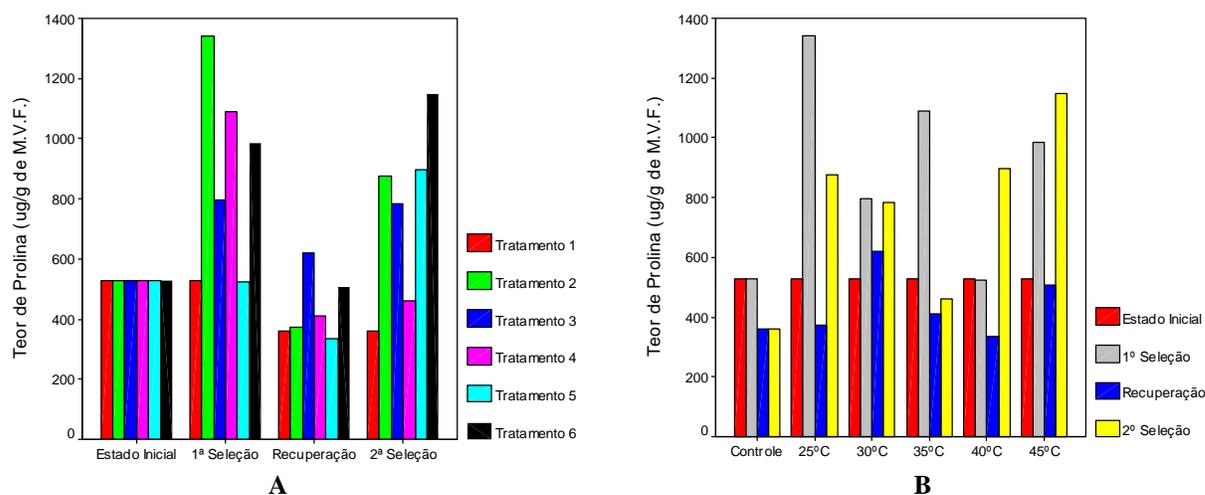


Figura 18 – Teor de prolina nos calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos aos estresses hídrico e térmico nas diferentes fases de seleção (A) (estado inicial, 1ª seleção, recuperação e 2ª seleção) e sob variações de temperatura (B). Para visualizar as comparações de médias, ver anexo A

Onde: tratamento 1 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio sem PEG); tratamento 2 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 3 (calos submetidos à 30°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 4 (calos submetidos à 35°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 5 (calos submetidos à 40°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 6 (calos submetidos à 45°C por duas horas em meio com PEG).

2.3.10 Teor de proteínas totais solúveis

Em relação às proteínas totais solúveis, os tratamentos 2 ao 6 elevaram seus teores dessa variável sob condições de deficiência hídrica (Figura 19A; Anexo A), porém nos tratamentos 4, 5 e 6 o acúmulo de proteína foi maior, diferindo estatisticamente dos outros (Figura 19B; Anexo A).

Durante a fase de recuperação, esses mesmos tratamentos apresentaram baixo teor de proteínas totais solúveis.

Já os tratamentos 2 e 3 não diferiram entre si durante toda a experimentação, apresentando baixos teores de proteína neste período quando comparados com os outros; só respondendo positivamente ao estresse na primeira seleção.

Além disso, o aumento da temperatura nos pré-tratamentos ocasionou numa elevação no teor de proteína, principalmente nos tratamentos 4 a 6 durante as duas seleções. Porém, o acúmulo no T4 foi da mesma ordem de grandeza durante as duas exposições à deficiência hídrica (Figura 19B; Anexo A).

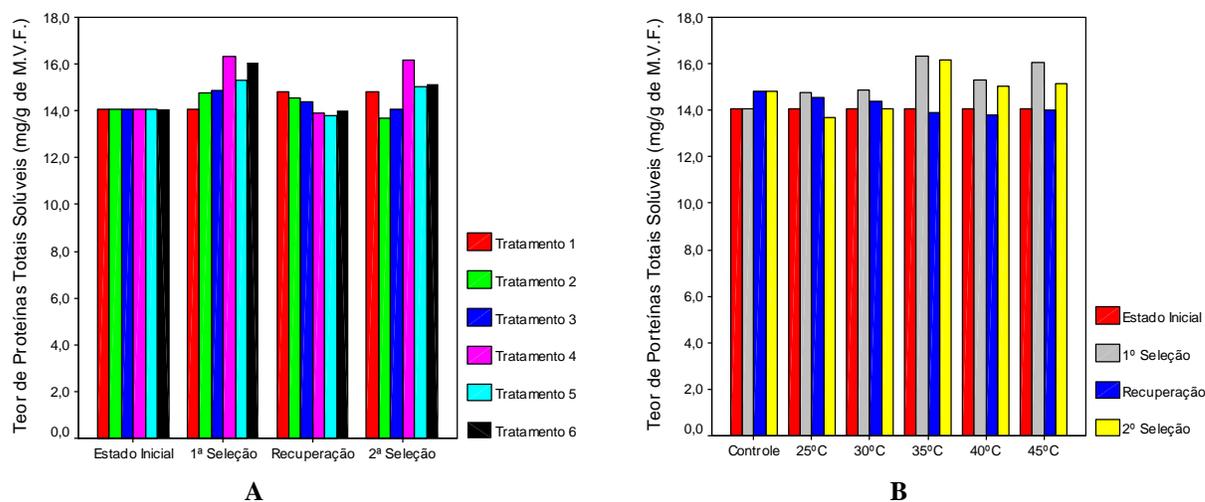


Figura 19 – Teor de proteínas totais solúveis nos calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos aos estresses hídrico e térmico nas diferentes fases de seleção (A) (estado inicial, 1ª seleção, recuperação e 2ª seleção) e sob variações de temperatura (B). Para visualizar as comparações de médias, ver anexo A

Onde: tratamento 1 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio sem PEG); tratamento 2 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 3 (calos submetidos à 30°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 4 (calos submetidos à 35°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 5 (calos submetidos à 40°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 6 (calos submetidos à 45°C por duas horas em meio com PEG).

2.3.11 Teor de Açúcares não-estruturais solúveis

2.3.11.1 Teor de ácido glucorônico

Durante a primeira seleção, os calos dos tratamentos 2, 4, 5 e 6 responderam à deficiência hídrica acumulando ácido glucorônico. Assim que o fator de estresse foi retirado, houve uma redução no teor desse açúcar ácido, o qual se assemelhou a quantidade apresentada no estado inicial (antes do estresse), permanecendo estável nas fases seguintes (período de recuperação e segunda seleção) (Figura 20A; Anexo A).

Porém, os tratamentos 2, 4 e 5 foram os que mais acumularam o ácido glucorônico na primeira seleção (Figura 20A e 20B; Anexo A).

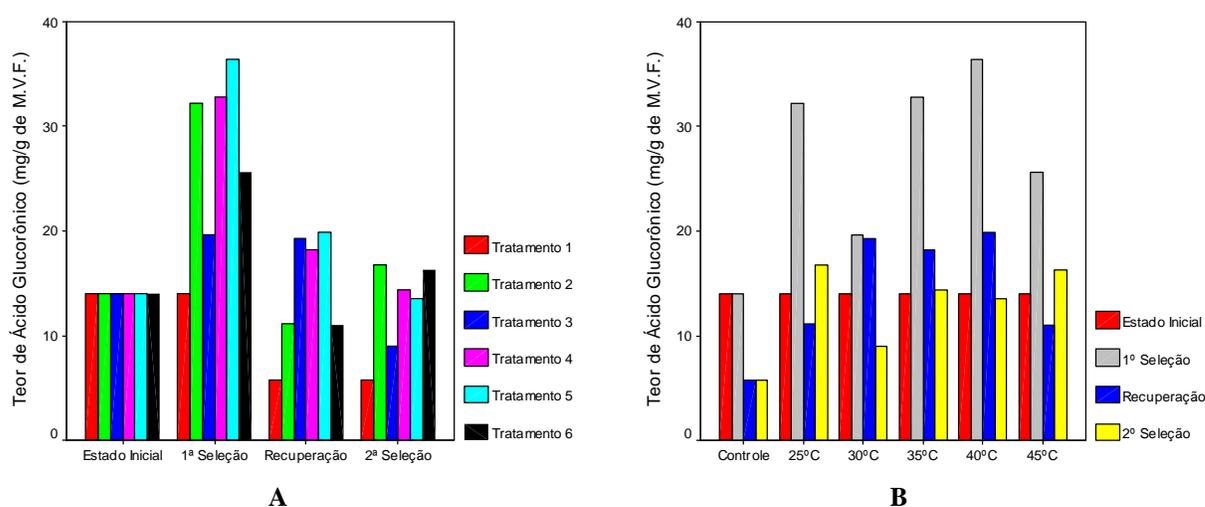


Figura 20 – Teor de ácido glucorônico nos calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos aos estresses hídrico e térmico nas diferentes fases de seleção (A) (estado inicial, 1ª seleção, recuperação e 2ª seleção) e sob variações de temperatura (B). Para visualizar as comparações de médias, ver anexo A

Onde: tratamento 1 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio sem PEG); tratamento 2 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 3 (calos submetidos à 30°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 4 (calos submetidos à 35°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 5 (calos submetidos à 40°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 6 (calos submetidos à 45°C por duas horas em meio com PEG).

2.3.11.2 Teor de celobiose

Em relação a celobiose, houve um acúmulo deste carboidrato na primeira seleção nos tratamentos 4 e 5, mas esse acréscimo não apresentou diferenças estatísticas entre as diferentes fases nesses tratamentos. Após isso, a quantidade interna desse açúcar foi reduzida e assim permaneceu estável na segunda seleção (Figura 21A; Anexo A).

Os tratamentos 2 e 6 não variaram o teor de celobiose durante a experimentação (Figura 21B; Anexo A).

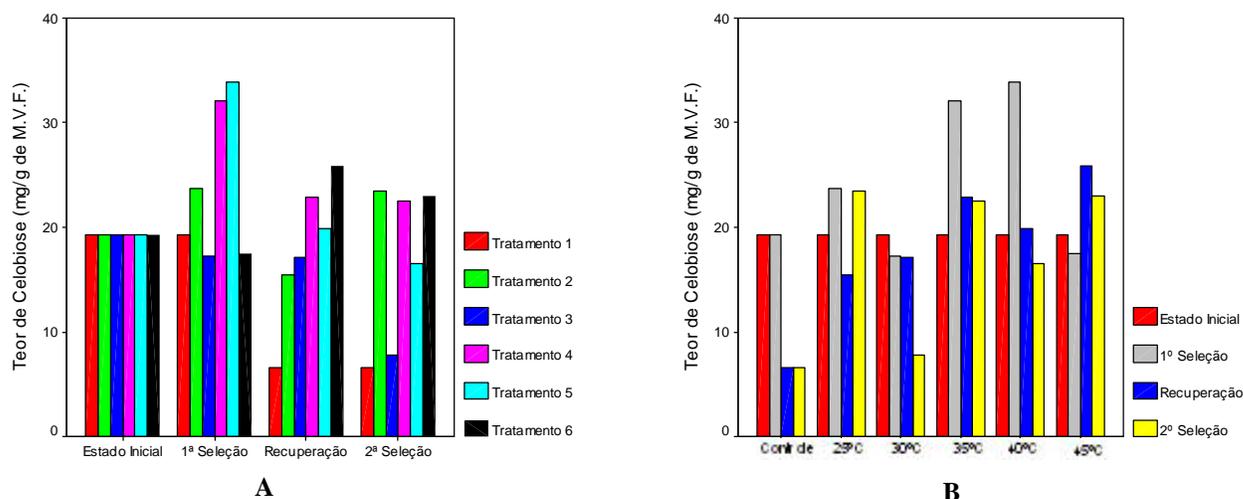


Figura 21 – Teor de celobiose nos calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos aos estresses hídrico e térmico nas diferentes fases de seleção (A) (estado inicial, 1ª seleção, recuperação e 2ª seleção) e sob variações de temperatura (B). Para visualizar as comparações de médias, ver anexo A

Onde: tratamento 1 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio sem PEG); tratamento 2 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 3 (calos submetidos à 30°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 4 (calos submetidos à 35°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 5 (calos submetidos à 40°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 6 (calos submetidos à 45°C por duas horas em meio com PEG).

2.3.11.3 Teor de glicose

A respeito do teor de glicose, os calos dos diferentes tratamentos acumularam esse carboidrato durante a primeira seleção, reduziram esse teor no período de recuperação e na segunda exposição à deficiência hídrica, houve o acúmulo de glicose somente nos tratamentos 2 e 6, os demais mantiveram os teores obtidos no estado inicial (Figura 22A; Anexo A).

Os tratamentos que apresentaram maior acúmulo de glicose foram os T4 e T5 na primeira exposição ao estresse hídrico, e os T2 e T5 na segunda seleção.

Além disso, com o aumento na temperatura dos pré-tratamentos, houve uma elevação gradual no teor de glicose até o tratamento 5 durante a primeira seleção. Porém, os calos do tratamento 6 apresentaram uma redução no teor de glicose, a qual não diferiu estatisticamente dos tratamentos 2 e 3 (Figura 22B; Anexo A).

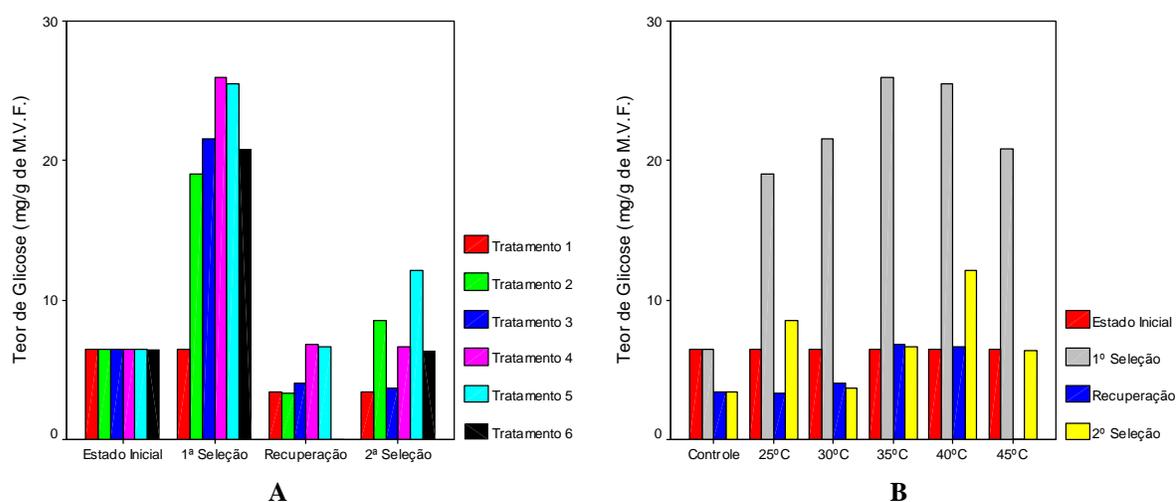


Figura 22 - Teor de glicose nos calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos aos estresses hídrico e térmico nas diferentes fases de seleção (A) (estado inicial, 1ª seleção, recuperação e 2ª seleção) e sob variações de temperatura (B). Para visualizar as comparações de médias, ver anexo A

Onde: tratamento 1 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio sem PEG); tratamento 2 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 3 (calos submetidos à 30°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 4 (calos submetidos à 35°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 5 (calos submetidos à 40°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 6 (calos submetidos à 45°C por duas horas em meio com PEG).

2.3.11.4 Teor de poliose

Os calos quanto o teor de poliose responderam praticamente da mesma forma que o teor de glicose avaliado. Houve um acúmulo na primeira seleção, uma redução desse teor durante o período de recuperação e novamente um aumento na quantidade interna desse soluto na segunda exposição à deficiência hídrica somente no tratamento 2 e 6 (Figura 23A; Anexo A).

Os tratamentos que apresentaram maior acúmulo de poliose foram os T2, T3 e T5 na primeira exposição ao estresse hídrico, e os T2, T5 e T6 na segunda seleção.

Além disso, com o aumento na temperatura dos pré-tratamentos, houve uma elevação somente no teor de glicose do tratamento 5 (Figura 23B; Anexo A).

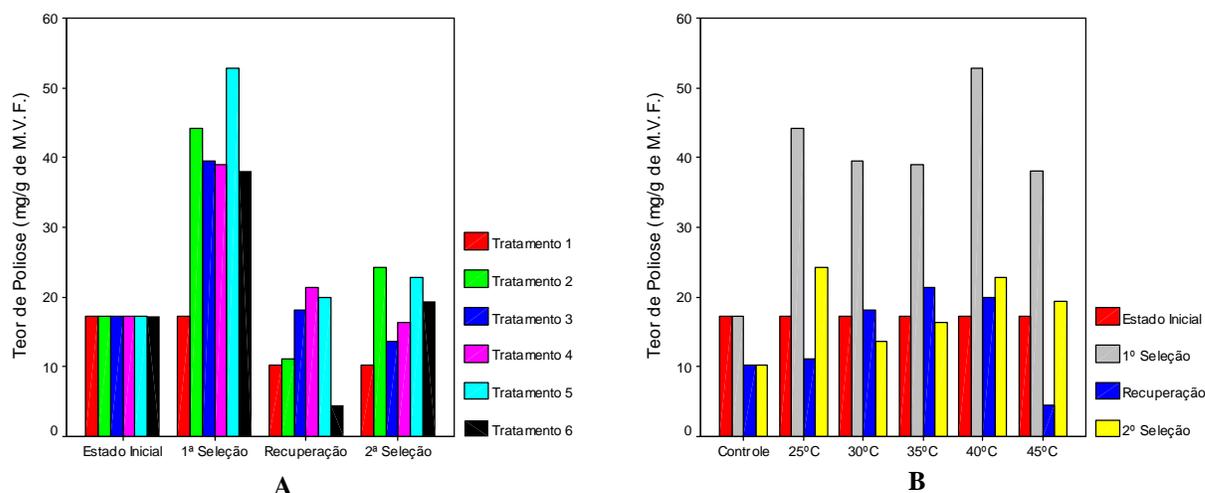


Figura 23 – Teor de poliose nos calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos aos estresses hídrico e térmico nas diferentes fases de seleção (A) (estado inicial, 1ª seleção, recuperação e 2ª seleção) e sob variações de temperatura (B). Para visualizar as comparações de médias, ver anexo A

Onde: tratamento 1 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio sem PEG); tratamento 2 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 3 (calos submetidos à 30°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 4 (calos submetidos à 35°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 5 (calos submetidos à 40°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 6 (calos submetidos à 45°C por duas horas em meio com PEG).

2.3.11.5 Teor de arabinose

Apesar de ter ocorrido um acúmulo de arabinose no tratamento 4 durante a fase de recuperação, não houve alterações significativas desse carboidrato nos calos submetidos aos diferentes tratamentos (Figura 24B; Anexo A) durante as fases de experimentação (Figura 24A).

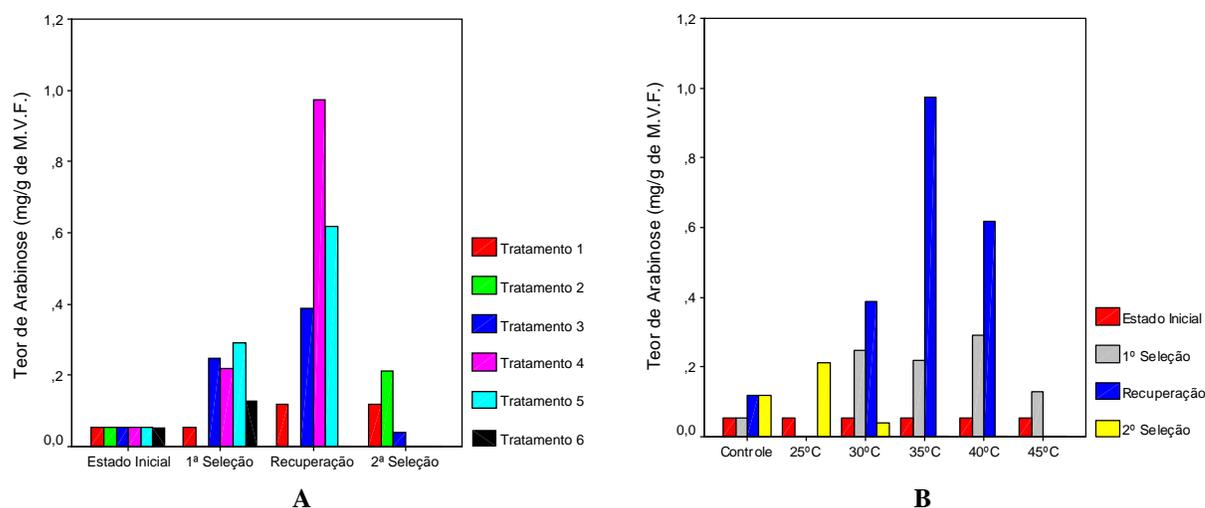


Figura 24 – Teor de arabinose nos calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos aos estresses hídrico e térmico nas diferentes fases de seleção (A) (estado inicial, 1ª seleção, recuperação e 2ª seleção) e sob variações de temperatura (B). Para visualizar as comparações de médias, ver anexo A

Onde: tratamento 1 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio sem PEG); tratamento 2 (calos submetidos à 25°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 3 (calos submetidos à 30°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 4 (calos submetidos à 35°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 5 (calos submetidos à 40°C por duas horas em meio com PEG); tratamento 6 (calos submetidos à 45°C por duas horas em meio com PEG).

2.3.12 Análise fatorial por componentes principais

Mesmo tendo ocorrido diferenças em cada variável, ao analisarmos as variáveis em conjunto por tratamento, verifica-se que não há diferenças entre elas na análise fatorial por componentes principais, pois todos os tratamentos estão agrupados em um só componente principal. Isso demonstra que, apesar das diferenças significativas apresentadas em cada variável analisada, esses ruídos foram tamponados pelo sistema, ou seja, as perturbações geradas pelos fatores de estresse foram incorporadas pela célula, não alterando o seu funcionamento macroscópico. Isso explica o fato de não ter ocorrido interferências no crescimento dos calos.

2.4 Discussão

2.4.1 Crescimento relativo dos calos

Apesar dos calos terem sido submetidos às condições de desenvolvimento estressantes, eles não cessaram o seu crescimento quando em deficiência hídrica. Isso indica que, de alguma forma, as células tamponaram as perturbações decorrentes desse fator de estresse, permitindo que seu funcionamento macroscópico não fosse afetado. Pois um dos primeiros efeitos biofísicos significativos da deficiência hídrica é a redução na turgescência da célula e alterações nos processos fisiológicos dependentes do turgor como o crescimento celular (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Além disso, os calos estressados acumularam mais matéria seca que o controle (tratamento 1) principalmente na primeira e na segunda seleção, sendo isso também observado por Lutts e colaboradores (2004) em calos de trigo em deficiência hídrica.

As propriedades de recuperação ao estresse dos calos estudados também não foram danificadas, pois todos os tratamentos mantiveram o crescimento obtido durante a primeira seleção. Esse mesmo resultado foi verificado em calos de trigo submetidos ao estresse hídrico temporário que foram capazes de se recuperar dentro dois dias, pois os efeitos fisiológicos do PEG durante 30 dias de exposição, bem como o decréscimo no teor de água ou no conteúdo de K^+ , não tiveram impactos nas habilidades de recuperação (LUTTS et al., 2004).

2.4.2 Ajuste osmótico

Para manter esse crescimento, alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares podem ocorrer nas células (SCHILICHTING & SMITH, 2002). Uma maneira comum de suportar a

deficiência hídrica é através do aumento em cadeia no número de partículas existentes na célula da planta (BUCHANAN et al., 2000).

Quanto a isso, durante as fases de seleção e recuperação, os calos nos diferentes tratamentos acumularam esses solutos compatíveis, mas o tratamento 3 permaneceu estável frente as variações ambientais em que foi submetido em relação às variáveis analisadas (Figura 18B a 21B, 23B e 24B), com exceção do teor de glicose (Figura 22B). Isso permite que três hipóteses sejam levantadas: 1) as condições de deficiência hídrica não eram estressantes; 2) os calos desse tratamento não responderam à deficiência hídrica, ou seja, a informação vinda do ambiente foi ignorada e esses continuaram realizando suas atividades celulares, utilizando os recursos ainda disponíveis até que se acabe; 3) o tratamento de 2 horas em 30°C permitiu que essas células ativassem uma via metabólica que acumulassem um osmólito ou um conjunto deles que as ajudasse a manter suas funções.

A primeira hipótese pode ser descartada ao avaliarmos todos os outros tratamentos submetidos à deficiência hídrica, principalmente o tratamento 2, o qual só foi submetido a esse fator de estresse. Pois os calos desses alteraram todo o seu metabolismo, acumulando solutos para sobreviverem a essa condição de estresse hídrico (Figura 13 a 17 ou 18B a 24B), a qual provavelmente exigiu essa resposta.

A segunda alternativa pode não ser a mais adequada, pois houve um acúmulo de glicose durante a primeira seleção (Figura 14), ou seja, as células receberam a informação e conforme a necessidade, determinadas vias metabólicas foram acionadas. E, talvez neste caso, os calos só precisaram de um aumento no teor de glicose para sobreviver a essas condições de estresse.

Além disso, dentre as vias catalíticas das células, o acúmulo de glicose é um dos mais importantes, pois esse carboidrato é precursor de uma infinidade de componentes celulares tais como outros carboidratos, aminoácidos, bases nucleotídicas e conseqüentemente proteínas, ácidos graxos, esteróis, entre outros (LEHNINGER, 1995). Assim, um aumento no teor desse açúcar pode gerar muitas alterações metabólicas.

Porém, é importante ressaltar que outros solutos podem ter sido acumulados, os quais não foram contemplados neste estudo.

Já a terceira suposição é a mais provável de ter ocorrido, pois houve alteração no teor de glicose, a qual pode gerar tantos outros solutos (LEHNINGER, 1995); os calos mantiveram seu crescimento em ambiente com deficiência hídrica, o qual é extremamente afetado em células não

tolerantes (TAIZ & ZEIGER, 2004); e após a retirada desse fator de estresse, houve desenvolvimento desses, demonstrando que o estresse sofrido não danificou a estrutura celular, ou seja, os ajustes realizados foram suficientes.

Essa terceira hipótese está embasada numa teoria bastante difundida e bem aceita atualmente entre os fisiologistas que é a teoria da tolerância cruzada, a qual se baseia na existência de um sistema de defesa comum no combate ao estresse e postula que um fator de estresse particular pode induzir tolerância nas plantas a um subsequente estresse que é diferente do primeiro (RIZHSKY et al., 2002). E corrobora as informações levantadas por Kuznetsov e colaboradores (1999) na quais se verificou que tratamentos preliminares com temperatura alta podem aumentar a tolerância em condições de estresse posteriores como a deficiência hídrica em algodão.

Além disso, verificou-se que o tratamento com temperatura alta antes da submissão a deficiência hídrica (T3 ao T6) pode ter poupado as células de terem que gastar energia na catabolização de prolina, pois os tratamentos 3 ao 6 apresentaram valores inferiores quanto ao teor de prolina que o tratamento que não foi submetido a esse fator de estresse (T2). Talvez a redução no acúmulo desse aminoácido esteja ligada ao aumento na produção de proteína total solúvel observado em alguns desses tratamentos, principalmente na primeira seleção (Figura 19). Isso indica que realmente pode ter ocorrido um aumento na tolerância dos calos a deficiência hídrica quando submetidos à temperatura alta anteriormente (RIZHSKY et al., 2002).

Quanto às formas de resposta, observou-se que as células podem utilizar diferentes vias metabólicas para responder as perturbações do ambiente, pois no tratamento 5, durante a primeira seleção, as linhagens celulares deste elevaram os teores de proteínas e de todos os açúcares determinados, menos de prolina e isso foi suficiente para tamponar os efeitos do estresse hídrico. Já nos outros tratamentos (com exceção do tratamento 3), todas as variáveis analisadas foram alteradas para responder às condições de estresse.

Em relação aos açúcares avaliados, houve um aumento considerável de ácido glucurônico, celobiose, glicose e poliose em condições de estresse, observado na maioria dos tratamentos que foram submetidos à deficiência hídrica.

Todos esses carboidratos influenciam nas propriedades de movimentação da matriz da parede celular, a qual é importante para a proteção das células contra a dissecação (PIRO et al., 2003). Assim, essa síntese de compostos fibrosos da parede celular (pois os açúcares

determinados compõem a hemicelulose) pode induzir no apoplasto a formação de um gel polimérico capaz de fixar íons, e reter quantidades consistentes de água. Esse processo pode contribuir eficientemente para o ajuste osmótico do compartimento simplástico além da supersíntese de solutos orgânicos compatíveis específicos (LUTTS et al., 2004).

Dessa forma, pode-se dizer que o teor de ácido glucorônico e poliose, talvez, possam ser usados como parâmetros indicativos de resposta ao estresse em plantas tal como a prolina e a glicose.

Outro fato interessante é que a maioria dos calos avaliados acumula carboidratos na primeira seleção e depois retornam ao teor apresentado no estado inicial (antes do estresse), principalmente nos tratamentos 4 e 5. Talvez esses açúcares tenham sido incorporados à parede celular, como foi observado por Hossain e colaboradores (2005), espessando-a de forma a evitar a perda de água e aumentar a retenção desta; ou podem ter sido usados na produção de outros compostos não avaliados.

Portanto, com as informações relatadas, é tentador especular que um dos caminhos para aumentar a tolerância das plantas ao estresse hídrico pode ser encontrado através de uma super-expressão de genes relacionados à síntese de polissacarídeos da matriz e em particular àqueles polímeros que conferem a capacidade de manter a água na parede celular (PIRO et al., 2003).

De qualquer forma, o comportamento apresentado por todos os tratamentos submetidos às condições de estresse frente à segunda seleção indica que essas linhagens, especialmente a do tratamento 4, provavelmente adquiriram tolerância a essas condições de estresse hídrico. Pois esses calos não acumularam tanto solutos compatíveis (na maioria deles houve aumento na produção de prolina e proteína, poucos acumularam açúcares) e aumentaram a produção de massa seca (Figura 11).

Porém mais estudos nessa área devem ser realizados principalmente em relação aos açúcares que compõe a parede celular e sua provável influência na regulação osmótica das células em condições de estresse.

3 CONCLUSÃO

Com base nos dados apresentados, conclui-se que:

- tratamentos com alta temperatura logo antes do estresse por deficiência hídrica aumentam a tolerância de calos de *Eucalyptus urophylla* ao segundo fator de estresse;
- os calos selecionados apresentam tolerância à deficiência hídrica;

- o teor de ácido glucorônico e poliose podem ser usados como indicativos de condições de estresse como a prolina e a glicose;
- as linhagens selecionadas apresentam variações quanto o mecanismo de resposta, mas todas são tolerantes à deficiência hídrica, sendo o tratamento 4 o mais tolerante deles por possuir maior plasticidade.

REFERÊNCIA

ARRUDA, S.C.C.; SOUZA, G.M.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A.N. Anatomical and biochemical characterization of calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis in vitro. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, NL, v. 63, n. 2, p. 143-154, 2001.

BAJJI, M.; LUTTS, S.; KINET, J.M. Physiological changes after exposure to and recovery from polyethylene glycol-induced water deficit in callus culture issued from durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars differing in drought resistance. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, DE, v. 156, p. 75-83, 2000.

BARB, A.W.; PHARR, D.M.; WILLIAMSON, J.D. A *Nicotiana tabacum* cell culture selected for accelerated growth on mannose has increased expression of phosphomannose isomerase. **Plant Science**, Limerick, IE, v. 165, n. 3, p. 639-648, sept. 2003.

BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, Stuttgart, The Hague, NL, v. 39, p. 205-207, 1973.

BETTANY, A.J. Stress responses in cell culture of *Lolium temulentum*. II. Induction of thermotolerance and associates changes in gene expression. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, DE, v. 146, p. 183-189, 1995.

BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture: theory and practice**, a revised edition. Amsterdam: Elsevier, 1996. 772p.

BOWEN, J.; LAY-YEE, M.; PLUMMER, K.; FERGUSON, I. The heat shock response is involved in thermotolerance in suspension-cultured apple fruit cells. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, DE, v. 159, n. 6, p. 599-606, june 2002.

BOWLER, C.; FLUHR, R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, GB, v.5, n.6, p. 241-246, june 2000.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, US, v. 172, p. 496-497, 1987.

BRAY, E.A . Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Washington, US, v. 103, n. 4, p. 1035-1040, aug. 1993.

BRURGIÈRE, N.; DUBOIS, F.; LIMAMI, A. M. ; LELANDRAIS, M. et al. Glutamine synthetase in the ploom plays a major role in controlling proline production. **The Plant Cell**, Rockville, US, v. 11, n. 10, p. 1995-2011, oct. 1999.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville, US.: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367 p.

BURKE, J.J. Characterization of acquired thermotolerance in soybean seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, FR, v. 36, n. 8, p.601-607, aug. 1998.

CHEN, Z.; HONG, X.; ZHANG, H.; WANG, Y.; LI, X.; ZHU, J.K.; GONG, Z. Disruption of the cellulose synthase gene, AtCesA8/IRX1, enhances drought and osmotic stress tolerance in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, GB, v. 43, n. 2, p. 273-283, july 2005.

CLAUSSEN, W. Proline as a measure of stress in tomato plants. **Plant Science**, Limerick, IE, v.168, n.1, p. 241-248, jan. 2005.

COLLINS, G.G. ; NIE, X. ; SALTVEIT, M.E. Heat shock proteins and chilling sensivity of mung bean hypocotyls. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, GB, v. 46, n. 288, p. 795-802, 1995.

GILBON, Y.; SULPICE, R.; LARHER, F. Proline accumulation in canola leaf discs subjected to osmotic stress is related to the loss of chlorophylls and the decrease of mitochondrial activity. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, DK, v. 110, n. 4, p. 469-476, dec. 2000.

GONZALES, R.A. Selection of plant cells for desirable characteristics. In: DIXON, R.A.; GONZALES, R.A. (Eds.). **Plant Cell Cultures – A practical approach.**, Oxford: IRL Press, 1994. p. 67-72.

GROVER, A et al. Taming abiotic stress in plant through genetic engineering: current strategies and perspective. **Plant Science**, Limerick, IE, v. 143, n. 1, p.101-111, may 1999.

HALDRUP, A.; NOERREMARK, M.; OKKELS, F.T. Plant selection principle based on xylose isomerase. **In Vitro Cell Developmental Biology – Plant**, Columbia, US, v.37, n. 2, p.114-119, mar. 2001.

HARDIE, D.G. Plant protein serine/threonine kinases: Classification and function. **Annu Rev Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, US, v. 50, p. 97-131, june 1999.

HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; HANDA, S. et al. Cellular mechanisms of tolerance to water stress. **HortScience**, Alexandria, US, v.19, p. 371-377, 1984.

HOSON, T. Apoplast as the site of response to environmental signals. **Journal of Plant Research**, Tokyo, JP, v. 111, p.167-177, 1998.

HOSSAIN, A.K.M.Z.; KOYAMA, H.; HARA, T. Growth and cell wall properties of two wheat cultivars differing in their sensitivity to aluminum stress. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, DE, 2005. In print.

HUNT, R. **Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis**. London: Edward Arnold, 1982. 254p.

KACPERSKA, A. Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, DK, v. 122, n. 2, p. 159-168, oct. 2004.

KÖNIGSHOFER, H.; LECHNER, S. Are polyamines involved in the synthesis of heat-shock proteins in cell suspension cultures of tobacco and alfalfa in response to high-temperature stress? **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, FR, v. 40, n. 1, p. 51-59, jan. 2002.

KUMAR, A., et al. Influence of water stress on photosynthesis, transpiration, water use efficiency and yield of *Brassica juncea* L. **Field Crop Research**, Amsterdam, NL, v. 37, n. 2p. 95-101, may 1994.

KUZNETSOV, V.V. et al. Stress protein and phytohormones during adaptation of *Cucumis sativus* L. plants to soil drought. **Doklady Akademii Nauk Sssr**, Leningrad, SU, v. 322, p. 204-207, 1992.

KUZNETSOV, V.V.; SHEVYAKOVA, N.I. Proline under stress: Biological role, metabolism and regulation. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, US, v. 46, p. 274-287, 1999.

KUZNETSOV, V.V.; RAKITIN, V.Y.; ZHOLKEVICH, V.N. Effect of preliminary heat-shock treatment on accumulation of osmolytes and drought resistance in cotton plants during water deficiency. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, DK, v. 107, n. 4, p.399-406, dec. 1999.

LACERDA, C.F.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M.A.; RUIZ, H.A. Changes in growth and solute concentration in sorghum leaves and roots during salt stress recovery. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, US, v. 54, n. 1, p. 69-76, aug. 2005.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. Trad.: Prado, C.H.B.A. São Carlos: RIMA, 2004. 531 p.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. Trad. SIMÕES, A.A.; LODI, W.R.N. 2.ed., São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p.

LUTTS, S.; ALMANSOURI, M.; KINET, J.M. Salinity and water stress have contrasting effect on the relationship between growth and cell viability during and after stress exposure en durum wheat callus. **Plant Science**, Limerick, IE, v. 167, n. 1, p. 9-18, july 2004.

MISRA, N.; GUPTA, A.K. Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. **Plant Science**, Limerick, IE, v. 169, n. 2, p. 331-339, aug. 2005.

MOHAMED, M.A.H.; HARRIS, P.J.C.; HENDERSON, J. In vitro selection and characterization of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*. **Plant Science**, Limerick, IE, v. 159, n. 2 p. 213-222, nov. 2000.

MORAN, J.; BECANA, M.; ITURBE-ORAETXE, I. et al. Drought induces oxidative stress in pea plants. **Planta**, Berlin, DE, v.194, p. 346-352, 1994.

NOLTE, H.D., et al. Proline accumulation and methylation to proline betaine in *Citrus*: Implications for genetic engineering of stress resistance. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, US, v. 122, p. 8-13, 1997.

PASTORI, G.M.; FOYER, C.H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of redox and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology**, Washington, US, v. 129, n. 2, p.460-468, june 2002.

PATNAIK, J.; DEBATA, B.K. In vitro selection of NaCl tolerant callus lines of *Cymbopogon martini* (Roxb.) Wats. **Plant Science**, Limerick, IE, v.124, n. 2, p. 203-210, may 1997.

PELAH, D.; WANG, W.; ALTMAN, A.; SHOSEYOV, O.; BARTELS, D. Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, DK, v. 99, n.1, p. 153-159, jan. 1997.

PIRO, G.; LEUCCI, M.R.; WALDRON, K.; DALESSANDRO, G. Exposure to water stress causes changes in the biosynthesis of cell wall polysaccharides in roots of wheat cultivars varying in drought tolerance. **Plant Science**, Limerick, IE, v. 165, n. 3, p.559-569, sept. 2003.

QUEITSCH, C.; HONG, S.W.; VIERLING, E.; LINDQUIST, S. Heat Shock Protein 101 Plays a Crucial Role in Thermotolerance in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, US, v. 12, n. 4, p. 479-492, april 2000.

RIZHSKY, L.; HONGJIAN, L.; MITTLER, R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. **Plant Physiology**, Whashington, US, v. 130, n. 3, p. 1143-1151, nov. 2002.

ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. In vitro selection and biochemical characterization of zinc and manganese adapted callus lines in *Brassica* spp. **Plant Science**, Limerick, IE, v. 146, n. 2, p. 89-100, aug. 1999.

SANTANDREA, G. et al A physiological characterization of Mn-tolerant tobacco plants selected by in vitro culture. **Plant Science**, Limerick, IE, v. 150, n. 1, p.163-170, jan. 2000.

SANTOS, C.L.V.; GOMES, S.; CALDEIRA, G. Comparative responses of *Helianthus annuus* plants and calli exposed to NaCl: II. Selection of stable salt tolerant calli cell lines and evaluation of osmotic adjustment and morphogenic capacity. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, DE, v.156, p.68-74, 2000.

SCHILICHTING, C.D.; SMITH, H. Phenotypic plasticity: linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes. **Evolutionary Ecology**, London, GB, v. 16, p. 189-211, 2002.

SCHOFFL, F.; PRANDL, R.; REINDL, A. Regulation of the heat-shock response. **Plant Physiology**, Whashington, US, v. 117, n. 4, p. 1135-1141, aug. 1998.

SIMOLA, L. K. Propagation of plantlets from leaf callus of *Betula pendula purpurea*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, NL, v. 26, n. 1, p. 77-85, may 1985.

SOUZA, G.M. Contribuição para um conceito sistêmico de estresse em plantas: intergração, hierarquia, estabilidade. 2001. 96p. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2001.

STINES, A.P.; NAYLOR, D.J.; HOJ, P.B. et al. Proline accumulation in development grapevine fruit occurs independently of changes in the levels of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase mRNA or protein. **Plant Physiology**, Whashington, US, v.120, n. 3, p. 923-931, July 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Trad. SANTARÉM, E.R. et al., 3.ed, Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAREGYAN, M.R.; MORTIMER, A.M.; PUTWAIN, P.D.; COLLIN, H.A. Selection for resistance to the herbicide imazethapyr in somaclones of soyabean. **Weed Research**, Oxford, GB, v. 41, n. 2, p.143-154, april 2001.

THOMAS, H. Drought resistance in plants, In: AMARJIT, S.D.; RANJIT, K.B. (eds.), **Mechanism of Enviromental Stress Resistance in Plants**, Harwood: Wiley-Liss, 1997. p. 1-42.

VALOIS, A.C.C.; SALOMÃO, A.N.; ALLEM, A.C. **Glossário de recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa-SPI, 1996. 62p.

WAKABAYASHI, K.; SOGA, K.; KAMISAKA, S.; HOSON, T. Changes in level of cell wall constituents in wheat seedlings grow under continuos hypergravity conditions. **Advances in Space Research**, Oxford, GB, 2005. In print.

WANG, Z.B. et al., Osmotic adjustment: Effect of water stress on carbohydrates in leaves, steams and roots of apple. **Australian Journal Plant Physiology**, Melbourne, AU, v. 22, p. 747-754, 1995.

WANG, C.; ZIEN, C.A.; AFILHILE, M.; WEILTI, R.; HILDEBRAND, D.F.; WANG, X. Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulations of jasmonic acid in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, US, v. 12, n. 11, p. 2237-2246, nov. 2000.

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, Oxford, GB, v. 9, n. 5, may 2004.

XIONG, L.; ZHU, J.K. Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, DK, v. 112, n. 2, p.152-166, june 2001.

XIONG, L.; ZHU, J.K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant Cell and Environment**, Oxford, GB, v. 25, n. 2, p. 131-139, feb. 2002.

XIONG, L.; SCHMAKER, K.S.; ZHU, J.K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **The Plant Cell**, Rockville, US, v. 14, p. S165-S183, may 2002.

YANG, Y.; ZENG, J.; GAO, C.; KRULL, U.J. Stabilization and re-activation of trapped enzyme by immobilized heat shock protein and molecular chaperones. **Biosensor and Bioelectronics**, Essex, GB, v. 18, n. 2-3, p.311-317, mar. 2003.

ANEXO

Anexo A – Média dos dados de cada variável observada em calos de *Eucalyptus urophylla* submetidos a deficiência hídrica e ao estresse térmico

Variável	Fase de Experimentação	Controle (T1)		25°C (T2)		30°C (T3)		35°C (T4)		40°C (T5)		45°C (T6)	
TCR (%)	Estado Inicial	4,49	Ba	4,49	Ca	4,49	Ca	4,49	Ca	4,49	Ca	4,49	Ba
TCR (%)	1ª Seleção	4,49	Ab	6,94	Ba	7,31	Ba	8,11	Ba	7,07	Ba	7,08	Aa
TCR (%)	Recuperação	6,03	Ac	7,01	Bbc	6,51	Bc	8,51	Ba	7,98	Bab	6,02	Ac
TCR (%)	2ª Seleção	6,03	Ab	10,35	Aa	10,63	Aa	10,40	Aa	9,53	Aa	7,38	Ab
Prolina (µg/g de M.V.F.)	Estado Inicial	526,30	Aa	526,30	Ca	526,30	Aa	526,30	Ba	526,30	Ba	526,30	Ba
Prolina (µg/g de M.V.F.)	1ª Seleção	526,30	Ad	1340,51	Aa	795,91	Acd	1090,97	Aab	524,99	Bd	983,54	Abc
Prolina (µg/g de M.V.F.)	Recuperação	362,39	Bb	372,17	Cb	621,76	Aa	409,27	Bb	336,39	Bb	506,31	Bab
Prolina (µg/g de M.V.F.)	2ª Seleção	362,39	Bc	876,46	Bab	785,59	Ab	460,84	Bc	895,37	Aab	1148,12	Aa
Proteína (mg/g de M.V.F.)	Estado Inicial	14,05	Ba	14,05	Ba	14,05	Ba	14,05	Ba	14,05	Ba	14,05	Ca
Proteína (mg/g de M.V.F.)	1ª Seleção	14,05	Bd	14,74	Ac	14,90	Abc	16,35	Aa	15,32	Ab	16,08	Aa
Proteína (mg/g de M.V.F.)	Recuperação	14,81	Aa	14,55	Aa	14,40	Bab	13,89	Bbc	13,80	Bc	14,00	Cbc
Proteína (mg/g de M.V.F.)	2ª Seleção	14,81	Ab	13,69	Bc	14,09	Bc	16,19	Aa	15,05	Ab	15,15	Bb
Ác. Glucorônico (mg/g de M.V.F.)	Estado Inicial	13,99	Aa	13,99	Ba	13,99	Aba	13,99	Ba	13,99	Ba	13,99	Ba
Ác. Glucorônico (mg/g de M.V.F.)	1ª Seleção	13,99	Ac	32,27	Aab	19,60	Abc	32,76	Aab	36,45	Aa	25,61	Aabc
Ác. Glucorônico (mg/g de M.V.F.)	Recuperação	5,74	Bc	11,10	Bbc	19,27	Aab	18,18	Bab	19,86	Ba	11,02	Bbc
Ác. Glucorônico (mg/g de M.V.F.)	2ª Seleção	5,74	Bb	16,78	Ba	8,93	Bab	14,41	Bab	13,57	Bab	16,23	Ba
Celobiose (mg/g de M.V.F.)	Estado Inicial	19,33	Aa	19,33	Aa	19,33	Aa	19,33	Ba	19,33	Ba	19,33	Ba
Celobiose (mg/g de M.V.F.)	1ª Seleção	19,33	Aa	23,74	Aa	17,26	Aa	32,14	Aa	33,89	Aa	17,53	Aa
Celobiose (mg/g de M.V.F.)	Recuperação	6,63	Bc	15,41	Abc	17,10	Aab	22,90	Bab	19,93	Bab	25,87	Aa
Celobiose (mg/g de M.V.F.)	2ª Seleção	6,63	Bc	23,50	Aa	7,81	Bbc	22,57	Ba	16,51	Bab	23,01	Aa
Glicose (mg/g de M.V.F.)	Estado Inicial	6,47	Aa	6,47	Bca	6,47	Ba	6,47	Ba	6,47	Ba	6,47	Ba
Glicose (mg/g de M.V.F.)	1ª Seleção	6,47	Ac	19,02	Ab	21,57	Ab	26,00	Aa	25,51	Aab	20,81	Ab
Glicose (mg/g de M.V.F.)	Recuperação	3,41	Aab	3,34	Cab	4,02	Bab	6,84	Bab	6,67	Bab	0,00	Cb
Glicose (mg/g de M.V.F.)	2ª Seleção	3,41	Ab	8,57	Bab	3,69	Bb	6,64	Bb	12,10	Bab	6,41	Bb
Poliose (mg/g de M.V.F.)	Estado Inicial	17,28	Aa	17,28	Bca	17,28	Ba	17,28	Ba	17,28	Ba	17,28	Ba
Poliose (mg/g de M.V.F.)	1ª Seleção	17,28	Ac	44,24	Aab	39,53	Aab	38,98	Ab	52,89	Aa	38,05	Ab
Poliose (mg/g de M.V.F.)	Recuperação	10,30	Bbc	11,12	Cb	18,18	Ba	21,35	Ba	19,94	Ba	4,44	Cc
Poliose (mg/g de M.V.F.)	2ª Seleção	10,30	Bd	24,21	Ba	13,66	Bcd	16,40	Bbcd	22,81	Bab	19,45	Babc
Arabinose (mg/g de M.V.F.)	Estado Inicial	0,05	Aa	0,05	Aa	0,05	Aa	0,05	Ba	0,05	Aa	0,05	Aa
Arabinose (mg/g de M.V.F.)	1ª Seleção	0,05	Aa	0,00	Aa	0,25	Aa	0,22	Aba	0,29	Aa	0,13	Aa
Arabinose (mg/g de M.V.F.)	Recuperação	0,12	Aab	0,00	Ab	0,39	Aab	0,97	Aa	0,62	Aab	0,00	Ab
Arabinose (mg/g de M.V.F.)	2ª Seleção	0,12	Aa	0,21	Aa	0,04	Aa	0,00	Ba	0,00	Aa	0,00	Aa

Onde: Letras iguais para cada tratamento nas diferentes fases não apresentam diferenças significativas pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade. As letras maiúsculas são referentes às colunas (em cada tratamento) e as minúsculas, às linhas (entre tratamentos numa determinada fase de experimentação)