**INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA HÍDRICA NO
DESENVOLVIMENTO MORFOGENÉTICO DO *Eucalyptus*
camaldulensis Dehn. *in vitro***

GUSTAVO MAIA SOUZA

Biólogo

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

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Ciências Florestais.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro - 1997

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Souza, Gustavo Maia

Influência da deficiência hídrica no desenvolvimento morfogênético do *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. *in vitro* / Gustavo Maia Souza. - - Piracicabá, 1997.
70 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
Bibliografia.

1. Crescimento de tecido 2. Cultura 3. Déficit hídrico 4. Estresse 5. Eucalipto I.
Título

CDD 634.9734

**INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA HÍDRICA NO
DESENVOLVIMENTO MORFOGENÉTICO DO *Eucalyptus*
camaldulensis Dehn. *in vitro***

GUSTAVO MAIA SOUZA

Aprovado em: 02.02.1998

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Antônio Natal Gonçalves

ESALQ/USP

Prof. Dr. Marcílio de Almeida

ESALQ/USP

Prof. Dr. Massanori Takaki

IB/UNESP/Rio Claro

Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

Orientador

“Eis que a Floresta é o Todo

E o Todo é a Floresta”

O Espírito da Floresta

Dedico

À minha amada esposa Daniela

Aos meus pais Sara e Arnaldo

À Natureza

Agradeço

- Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves pelos ensinamentos de vida e orientação científica.
- Ao meu bom amigo e sincero colaborador Prof. Nelson Barbosa Machado Neto pelo suporte nos estudos bioquímicos.
- Ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida pela amizade e colaboração nos estudos morfológicos.
- Ao Prof. Dr. Nilson Villa Nova pela boa vontade e enorme contribuição nos estudos termodinâmicos.
- Ao Prof. Dr. Massanori Takaki por ceder espaço e material para os estudos bioquímicos.
- Aos técnicos de laboratório Beto e Edna pela excelente assistência.
- À FAPESP pelo suporte financeiro e confiança no projeto.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	v
SUMMARY.....	vi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Estresse hídrico: Considerações gerais.....	2
2.2 Estresse hídrico em <i>Eucalyptus</i> sp.....	5
3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE PROGÊNIES DE <i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehn. SOB CONDIÇÕES DE DEFICIÊNCIA HÍDRICA <i>in vitro</i>	9
3.1 Introdução.....	9
3.2 Material e Métodos.....	11
3.3 Resultados e Discussão.....	12
3.4 Conclusões.....	17
3.5 Referências Bibliográficas.....	18
4 EFEITOS DA DEFICIÊNCIA HÍDRICA <i>in vitro</i> NA ESTRUTURA ANATÔMICA DE FOLHA E CAULE DO <i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehn. (MYRTACEAE).....	21
4.1 Introdução.....	21
4.2 Material e Métodos.....	22
4.3 Resultados.....	23
4.3.1 Procedência de Petford.....	23
4.3.2 Procedência de St. Katherine.....	25
4.3.3 Procedência de Gilbert River.....	27
4.4 Discussão.....	29
4.5 Conclusões.....	31
4.6 Referências Bibliográficas.....	32

5 VARIAÇÕES DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS A DEFICIÊNCIA HÍDRICA EM TRÊS PRECEDÊNCIAS DE <i>Eucalyptus camaldulensis</i> CULTIVADAS <i>in vitro</i>	34
5.1 Introdução.....	34
5.2 Material e Métodos.....	35
5.3 Resultados e Discussão.....	36
5.4 Referências Bibliográficas.....	37
6 ACÚMULO DIFERENCIADO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS, PROLINA E DE PROTEÍNAS RELACIONADAS A DEFICIÊNCIA HÍDRICA EM PLANTAS <i>in vitro</i> de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	38
6.1 Introdução.....	38
6.2 Material e Métodos.....	39
6.2.1 Avaliação de proteínas totais.....	40
6.2.2 Extração e análise de açúcares solúveis.....	40
6.2.3 Avaliação de prolina.....	40
6.3 Resultados.....	41
6.3.1 Análise de proteínas totais.....	41
6.3.2 Avaliação de prolina.....	41
6.3.3 Avaliação de açúcares solúveis.....	42
6.4 Discussão.....	43
6.5 Referências Bibliográficas.....	46
7 ENTROPIA, INFORMAÇÃO E ESTRESSE HÍDRICO EM <i>Eucalyptus camaldulensis in vitro</i>	48
7.1 Introdução.....	49
7.2 Material e Métodos.....	51
7.3 Resultados e Discussão.....	53
7.4 Conclusões.....	56
7.5 Referências Bibliográficas.....	54
8 CONCLUSÕES GERAIS	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA HÍDRICA NO DESENVOLVIMENTO MORFOGENÉTICO DO *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. *in vitro*

Autor: GUSTAVO MAIA SOUZA

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

RESUMO

O objetivo desta dissertação foi o de identificar as principais alterações ocorridas no desenvolvimento morfofenético de três procedências australianas (Gilbert River, St. Katherine e Petford) de *Eucalyptus camaldulensis* submetidas à condições de deficiência hídrica induzida *in vitro*. Nos ensaios *in vitro*, foi adotado o meio de cultura MS com adição de diferentes concentrações de sorbitol estabelecendo quatro potenciais osmóticos: -0.5, -0.75, -1.5, e -3.0 MPa. Gemas e plântulas foram avaliadas quanto ao seu crescimento em altura, produção de matéria seca, alterações anatômicas, e alterações metabólicas após 20 dias de cultivo nestas condições. As avaliações anatômicas foram realizadas através da técnica de inclusão em historesina e microscopia óptica. As avaliações das possíveis alterações metabólicas foram realizadas através da técnica de eletroforese para proteínas totais em gel de poliacrilamida, da quantificação de açúcares solúveis no sistema de separação analítica HPLC e da quantificação de prolina em espectrofotômetro. As principais alterações observadas foram: redução e/ou parada do crescimento em altura; aumento da produção de matéria seca até o ponto crítico; menor diferenciação dos tecidos; espessamento e adensamento dos vasos condutores; colapso celular; acúmulo de reservas de carbono na forma de açúcares solúveis; acúmulo de reservas de nitrogênio na forma de prolina; aumento da síntese de proteínas totais e síntese diferencial de duas proteínas específicas.

WATER DEFICIT INFLUENCE IN THE *Eucalyptus camaldulensis* MORFOGENETIC DEVELOPMENT *in vitro*

Autor: Gustavo Maia Souza

Orientador: Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

SUMMARY

The aim of this work was to identify the main alterations in the morfogenetic development of three *Eucalyptus Camaldulensis* australian provenances (Gilbert River, St. Katherine and Petford) under water deficits induced *in vitro*. In the in vitro essays, it was utilized the MS culture medium with addition of different sorbitol concentrations estabilishing four osmotic potentials : -0,5; -0,75; -1,5 and -3,0 MPa. Shoots and seedlings were evaluated in relation to the height growth, dry matter production, anatomic and metabolic changes after 20 days of culture under these conditions. The anatomic evaluations were made through the technique of inclusion in historesin and optical microscopic. The evaluations of possible metabolic changes were made through the polyacrilamida gel eletrophoresis (SDS-PAGE) technique for total proteins, soluble sugars quantification in the analitical separation sistem HPLC and prolina quantification in espectrophotometer. The main changes observed were: reduction and/or arrest height growth , dry matter productio increase until a critical point, less diferentiation of the tissues, more thicking of the vessels, celular collapse, accumulation of carbon reserves in the form of soluble sugars, accumulation of nitrogen reserves in the form of proline; increase of total proteins synthesis and differential synthesis of two specific proteins.

INTRODUÇÃO

A organização do corpo vegetal é um processo auto-organizado de construção complexa altamente influenciada pelo ambiente. Porém, a despeito das inúmeras variáveis e instabilidades do meio, observa-se padrões morfogenéticos característicos e dinamicamente estáveis para cada espécie e/ou gênero. Entretanto, há um limite de resistência às perturbações do meio que afetam sensivelmente as características do organismo desde sua forma até o funcionamento normal de seu metabolismo.

A hipótese deste trabalho foi considerar que um organismo vegetal possui propriedades que lhe confere capacidade de resistir à perturbações do meio, como o são as várias formas de estresses ambientais, até um certo limite, que é o limite de sua própria sobrevivência. À estas propriedades dá-se o nome de homeostáticas.

Dentre as diversas formas de estresses ambientais, esta dissertação tratou especificamente da deficiência hídrica. Para melhor isolamento desta variável, optou-se pela realização de ensaios *in vitro*, onde o controle de variáveis, como luz, temperatura e nutrientes torna-se mais adequada. A escolha da espécie *Eucalyptus camaldulensis* deu-se em função da facilidade de seu cultivo *in vitro* e devido às suas conhecidas características de sobrevivência em ambientes onde a falta d'água é frequente.

Os objetivos gerais deste trabalho foram os seguintes :

- i) realizar um estudo comparativo do desenvolvimento morfogenético das plantas sob deficiência hídrica em relação ao crescimento padrão;
- ii) testar a resistência de clones ao deficit hídrico;
- iii) contribuir com a abertura de uma nova possibilidade de estudos de deficiência hídrica utilizando-se a cultura de tecidos;

Os objetivos específicos foram :

- i) verificar alterações anatômicas das plantas sob deficiência hídrica;
- ii) verificar alterações do crescimento normal das plantas;
- iii) verificar a ocorrência de variações do metabolismo;

Lemcoff & Ghera (1994), apontam a possibilidade de se realizar uma seleção para resistência do eucalipto sob estresse hídrico em plântulas jovens. Tal possibilidade poderia ser otimizada utilizando-se a técnica de cultura de tecidos proposta nesta dissertação de mestrado.

Os cinco trabalhos que constituem o corpo desta dissertação dizem respeito às pesquisas relacionadas com os vários aspectos da influência da deficiência hídrica no desenvolvimento do *E. camaldulensis*, considerando-se : crescimento em altura, produção de matéria seca, alterações anatômicas, variações metabólicas como síntese proteica, acúmulo de prolina e açúcares solúveis e respostas termodinâmicas do material estudado.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Estresse hídrico : considerações gerais

Segundo Levitt (1972), o termo estresse é adotado para designar qualquer fator ambiental desfavorável para a vida dos organismos; e resistência ao estresse a habilidade da planta para sobreviver sob estas condições; ao organismo sob estresse, diz-se que está em estado de tensão, que pode ser completamente reversível, ou seja, elástica, parcialmente reversível, ou permanente (tensão plástica). A tensão é proporcional ao estresse.

Há dois tipos básicos de resistência ao estresse : resistência elástica, que é a capacidade do organismo de prevenir injúrias reversíveis quando exposto a um específico estresse ambiental; e resistência plástica, que é a capacidade de prevenir injúrias irreversíveis (tensão plástica). A resistência ao estresse possui dois componentes : a) propriedades inatas da planta em se opor a produção de tensão por um determinado estresse, e b) um sistema reparador de tensões reversíveis. A ação destes dois componentes confere a planta sua capacidade de adaptação às condições de estresse ambiental (Levitt, 1972).

Um estresse hídrico pode resultar de duas condições, ou do deficit ou do excesso de água no ambiente, sendo o primeiro mais comum. Segundo Hsiao et al. (1976), talvez o melhor indicador para a detecção de estresse hídrico seja a medida do potencial hidrostático juntamente com o processo de crescimento dependente da turgescência celular, pois o crescimento celular é extremamente sensível ao estresse.

O primeiro efeito do deficit hídrico é a perda de água pela planta, ou desidratação (Levitt, 1972). Uma perda de água nos tecidos da planta possuem os seguintes efeitos diretos : a) redução no potencial químico ou atividade de água; b) concentração de macromoléculas e solutos de baixo peso molecular; c) alterações nas relações espaciais nas membranas e organelas através da redução no volume; e d) redução da pressão hidrostática dentro da célula (Hsiao et al., 1976).

O estresse hídrico é capaz de induzir efeitos secundários, como por exemplo, uma deficiência de fósforo devido a uma diminuição de sua translocação na planta; a relação P/O tende a aumentar em condições de moderada deficiência hídrica. Uma perda acima de 30% de água causa um aumento gradual da taxa de respiração, que poderá exceder a taxa de fotossíntese desencadeando um processo de inanição na planta, devido ao decréscimo das reservas de carboidratos (Levitt, 1972). Entretanto, estudos recentes em espécies de *Populus* têm verificado um aumento de síntese de sacarose, e outros açúcares solúveis, em resposta ao estresse hídrico, em função do acúmulo de proteínas de estresse hídrico e sacarose sintetase (Pelah *et al.*, 1997).

Segundo Levitt (1972) e Hsiao (1976), o próximo efeito causado pelo estresse hídrico é a perda de proteínas. Esta redução é possivelmente causada pela inibição da formação de protoclórofila, já que sua conversão no cloroplasto não é afetada pelo estresse. Na murcha da planta, detectou-se uma redução de todos os amino ácidos à quantidades muito pequenas, com exceção da prolina que tem sido encontrada, nestes casos, em quantidades maiores que o esperado. Isto sugere uma conexão entre a síntese de prolina e a conhecida produção de amido durante a inanição. Um aumento de prolina e asparagina nas folhas é um dos sintomas de adaptação de trigo de inverno ao estresse hídrico e outras condições desfavoráveis, seu acúmulo é maior em plantas mais

resistentes. Podem ser detectados aumentos significantes de outros amino ácidos, como fenilalanina, ácido glutâmico, alanina, arginina, histidina, isoleucina e valina. Uma possível função da prolina foi considerada como a de armazenar NH_3 . Algumas enzimas apresentam redução, ou até inativação de suas atividades, dependendo da intensidade do estresse que são submetidas. É o caso da: sacarase, fosfatase, peptidase, peroxidase e desidrogenase. Há redução do conteúdo de RNA, e aumento da atividade da RNase, assim como prejuízo da síntese de DNA sob condições de estresse hídrico, pois o sistema de ácidos nucleicos é prejudicado.

Arora & Saradhi (1995), sustentam que o acúmulo de prolina aumenta a resistência de plantas a vários estresses, e resulta em uma maior fixação de carbono. Esta síntese de prolina pode estar relacionada a reações de fotoindução e/ou fotoinativação de enzimas associadas ao catabolismo da prolina.

Hsiao et al. (1976) apontam que o ABA (ácido abscísico) tem sua síntese aumentada sob condições de estresse; assim como uma redução da assimilação de CO_2 .

Blancaflor & Hasenstein (1995) relatam a influência do estresse osmótico induzido com sorbitol e KCl sobre o crescimento e orientação dos microtúbulos em raiz de milho. A mais notável observação, segundo os autores, foi a rápida resposta dos microtúbulos ao sorbitol causando sua agregação, coincidindo com a formação de buracos nas zonas de alongamento e maturação, devendo estar relacionado com a inibição do crescimento da raiz. Diferentemente do sorbitol, o KCl causa a reorientação dos microtúbulos na zona de alongamento como consequência da inibição do crescimento. Os microtúbulos da região apical da raiz parece não sofrer efeito em sua organização.

Em Levitt (1972), encontram-se referências sobre os mecanismos de tolerância ao estresse hídrico. Foi observado que plântulas têm sua tolerância diminuída ao longo de seu desenvolvimento; e que há um deslocamento de água das partes mais velhas para as partes mais jovens da planta durante o murchamento. Há uma relação inversa entre resistência ao estresse e o tamanho da célula. A relação volume/superfície é uma expressão deste fator. As menores relações conferem as maiores resistências (ex.:

plantas xeromorfas possuem relação 1/2; células de moderada resistência 5/10; e células pouco resistentes a relação é próxima de 20). As regiões de reserva de amido são as mais tolerantes na plântula. A medida que a planta vai murchando o amido vai se convertendo em açúcares. A estabilidade de certas proteínas é mantida devido a sua capacidade de se dissociar em componentes menores, como é o caso da glutamato descarboxilase. Outras proteínas como a fosforilase e a fosfomonoesterase tornam-se mais ativas em plantas enraizadas em solos secos, enquanto proteínas como a α -amilase, β -amilase, e catalase decrescem. A atividade da peroxidase aumenta, enquanto o total de proteínas solúveis diminui com o aumento do estresse. Há também um aumento das proteínas que contêm ferro, e um decréscimo da desidrogenase láctica, como apontado num teste de eletroforese com gel de acrilamida. Estas alterações são provavelmente sinais de tolerância às injúrias.

Singh et al. (1989), determinaram, através da técnica SDS-PAGE, uma proteína de 23.984 daltons em tabaco, denominada osmotina. A osmotina é uma proteína de resposta ao estresse hídrico induzida por ABA. Recentemente, foi identificada uma proteína de 66-kDa em cultura de ápices de *Populus tremula*, que se acumula em resposta ao gradual estresse hídrico e a aplicação de ABA (Pelah *et al.*, 1995).

Tanguilig et al. (1987), observou um aumento do peso seco das raízes de milho e soja, podendo ser considerado como um mecanismo adaptativo ao estresse. Foi constatado também um aumento da absorção de K, preferencialmente ao N e P, resultado de um ajustamento osmótico que contribui para um maior potencial hídrico na folha; variedades mais tolerantes de trigo também acumulam mais K. Serôdonio e Novais (1991), registraram um acréscimo dos valores da taxa fotossintética, dos valores de peso fresco e de peso seco da parte aérea, dos teores de macronutrientes mais móveis (N, P, K e Mg), bem como do Mn, em plantas de trigo sob condições de alagamento. Matzner & Richards (1996), em estudo feito com *Artemisia tridentata*, apontam que o transporte de íons sob estresse hídrico difere dependentemente dos íons envolvidos, e observaram uma maior eficiência do transporte de P em relação a N, entretanto o decréscimo de N é maior entre potenciais osmóticos de -10 a -20 bars, e menor entre -30 e -54 bars.

Li et al. (1996) relatam que a condição de poliploidia em *Betula papyrifera* torna-se uma fonte de resistência ao déficit hídrico em relação ao tipo diplóide. Isto se deve a uma interação de fatores morfo-fisiológicos, como o aumento do tamanho dos estômatos, redução do número de estômatos por área foliar e aumento do número de cloroplastos nas células-guarda.

- Estresse hídrico em *Eucalyptus*

Na literatura, encontram-se trabalhos envolvendo algumas espécies de *Eucalyptus* com estresse hídrico, basicamente trabalhos envolvendo seleção e estudos de resistência. As espécies mais estudadas são : *E. camaldulensis*; *E. grandis*; *E. spathulata*; *E. globulus*; *E. urophylla*; *E. cloezima*; *E. maculata*; *E. viminalis*; *E. marginata*, apontando as possibilidades de utilização destas espécies para coberturas de regiões áridas, além de sua reconhecida utilização na indústria madeireira, de papel e celulose, e resinas (Moulds, 1961; Doley, 1967; Poupon, 1968; Quraishi & Kramer, 1970; Birot & Galabert, 1970; Pryor, 1972; Paton, 1972; Lubrano & Tarsia, 1973; Ladiges, 1974; Ladiges, 1975; Golfari, Caser & Moura, 1978; Bartle & Shea, 1978; Schonau, 1984; Bowen, 1985; Pook, 1985; Blake & Suiter-Filho, 1988; Blake, Bevilacqua & Barbosa, 1988; Metcalfe, Daves & Pereira, 1990; Fox, Neilsen & Osborne, 1990; Sinha, 1993; Osorio & Pereira, 1993 e 1994; Bell et al., 1994; Franks, Gibson & Bachelard, 1995; White, Beadle & Worledge, 1996).

A espécie utilizada neste trabalho foi o *E. camaldulensis* Dehnh (fam. Myrtaceae). Esta espécie perenifolia, alcança de 25 a 40 m de altura com 60 a 100 cm de diâmetro, possui copa aberta irregular, e um sistema radicular de até 3 m de profundidade e bastante amplo (mais de 15 m). Desenvolve-se bem tanto em clima temperado como em clima tropical. Este eucalipto suporta temperaturas de 29°C até 35°C, suportando geadas esporádicas. É uma espécie de rápido crescimento, adaptando-se a uma ampla gama de solos. É apta para combinações agroflorestais. Seus principais usos são : madeira para lenha, produzindo carvão de excelente qualidade; madeira para postes e construção, produção de mel (CATIE, 1994).

As questões apontadas até aqui, sugerem a possibilidade de utilização desta espécie para compor planos de reflorestamentos em várias regiões do Estado de São Paulo que apresentam condições desfavoráveis de água no solo (Reis & Hall, 1986), uma vez que a produtividade florestal está relacionada com a ótima interação água-nutriente dentro de um ecossistema como aponta o trabalho de Nambiar (1990/91).

O *E. camaldulensis* possui um alto consumo de água, fator este que pode ser limitante para seu crescimento (Sinha, 1993). Sands (1981) e van der Moezel et al. (1988) apontam a sensibilidade do *E. camaldulensis* às condições de salinidade inibindo seu desenvolvimento, devido à sua baixa capacidade de excluir Na e Cl de suas células. Sob condições de alagamento esta espécie desenvolve aerênquimas e raízes adventícias como forma de adaptação a esta condição desfavorável (van der Moezel et al., 1988).

Segundo Façanha et al. (1983), o *E. camaldulensis* apresenta as melhores relações de germinação/crescimento dentre outras espécies de seu gênero sob condições de deficiência hídrica, apresentando as menores reduções em parâmetros como altura do caule, diâmetro do coleto e produção de matéria seca.

Gibson et al. (1994), argumentam que o *E. camaldulensis* possui diferentes estratégias para sua sobrevivência dependendo de seus sítios de origem. Árvores oriundas de regiões mais secas quando submetidas à limitação de água reduzem seu crescimento apical, as folhas tornam-se mais estreitas e espessadas, e há um aumento da concentração de clorofila. Em contraste, árvores oriundas de regiões mais úmidas respondem à limitação da água através de redução da condutância estomática e das trocas gasosas, e um aumento da eficiência do uso da água. Estas diferenças devem ser atribuídas a diferentes mecanismos de adaptação aos ambientes próprios.

Segundo Gibson et al. (1995), plântulas de *E. camaldulensis* de diferentes locais mostram o mesmo padrão de comportamento entre árvores jovens e adultas em relação ao déficit hídrico. Plântulas de regiões mais secas apresentam maior redução da área foliar e maior acúmulo de clorofila em relação às plântulas de localidades mais úmidas, entretanto estas últimas apresentam maiores reduções das taxas de transpiração. Em condições de calor e falta d'água, as plântulas de clima mais seco tendem a aumentar a

formação de raízes, e deslocar a alocação de carbono para o caule principal, reduzindo a relação folha/caule. Plântulas de regiões mais úmidas não alteram sua morfologia, ou a alocação de carbono em resposta às limitações de água. Elas continuam o crescimento apical e iniciam a formação de gemas axilares nos nós superiores.

Segundo Alvear & Gutiérrez (1995), progênies de *E. camaldulensis* de diferentes procedências australianas apresentam comportamento de crescimento diferenciado em determinada condição de crescimento, entretanto as características individuais possuem baixa herdabilidade, desta forma, a melhor estratégia recomendada para o melhoramento é a de utilizar uma ampla base genética. Ainda de acordo com os mesmos autores, esta espécie é apropriada para reflorestamentos de regiões semiáridas.

Gibson *et al.* (1991), apontaram para o fato que plântulas de diferentes procedências submetidas a estresse hídrico, respondem diferentemente quando tratadas com ABA. Procedências da região semi-árida australiana chegam a suprimir o crescimento apical, apresentando menores ajustes osmóticos que as procedências oriundas de região tropical-úmida. Estas apresentaram redução da condutância estomática, e um aumento dos conteúdos de nitrogênio e clorofila.

Barros *et al.* (1990) sugerem que a seca de ponteiros, frequentemente observada em árvores durante períodos de seca prolongada no Brasil, parece estar ligada à deficiência de cálcio. Este é encontrado em teores elevados nos solos de ocorrência natural do *E. camaldulensis*, o que pode indicar uma maior exigência da espécie.

Do ponto de vista morfológico, trabalhos apontam algumas interessantes modificações de folhas de *E. camaldulensis* em resposta ao estresse hídrico. Farrel *et al.* (1996) observaram um aumento do peso seco das folhas em oposição ao número de folhas. Folhas de regiões mais áridas são mais espessas, apresentando um mesófilo mais espesso e cloroplastos mais longos e largos, a epiderme possui células pequenas e adensadas (James & Bell, 1995).

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE PROGÊNIES DE *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. SOB CONDIÇÕES DE DEFICIÊNCIA HÍDRICA *in vitro**

G. M. Souza** & A. N. Gonçalves**

**Depto. de Ciências Florestais, ESALQ/USP, Piracicaba - SP

Resumo : Três progênies de diferentes procedências australianas de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. foram avaliadas em relação a produção de matéria seca e crescimento em altura sob deficiência hídrica induzida *in vitro*. Foram testados quatro meios de cultura com diferentes potenciais osmóticos : -0,5; -0,75; -1,5 e -3,0 MPa. Os materiais apresentaram respostas quantitativamente diferenciadas, embora note-se um gradiente qualitativo comum de colapso das gemas de acordo com o aumento da deficiência hídrica.

Palavras-chave : *Eucalyptus camaldulensis*, estresse hídrico, crescimento, cultura de tecidos.

Abstract : "Growth evaluation of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. progenies under water deficit *in vitro*". The growth evaluation of three *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. progenies from different Australian provenances was carried out in relation to shoot height and dry matter produced under water deficit induced *in vitro*. Four different culture media with - 0.5, - 0.75, - 1.5 and -3.0 MPa were tested. The provenances showed different heights and dry matter percentage in each treatment. However, there was observed a general stress gradient to all provenances.

Key-words : *Eucalyptus camaldulensis*, water stress, growth, tissue culture.

INTRODUÇÃO

O *E. camaldulensis* possui um alto consumo de água, fator este que pode ser limitante ao seu crescimento (Sinha, 1993). Sands (1981) e Moezel *et al.* (1988) apontam a sensibilidade do *E. camaldulensis* às condições de salinidade inibindo seu desenvolvimento, devido à sua baixa capacidade de excluir Na e Cl de suas células. Sob condições de alagamento, esta espécie desenvolve aerênquimas e raízes adventícias como forma de adaptação a esta condição desfavorável (Moezel *et al.*, 1988).

*Trabalho enviado para a revista *Scientia Forestalis*. Piracicaba.

Segundo Façanha *et al.* (1983), o *E. camaldulensis* apresenta as melhores relações de germinação/crescimento, dentre outras espécies de seu gênero, sob condições de deficiência hídrica, apresentando as menores reduções em parâmetros como altura do caule, diâmetro do colo e produção de matéria seca.

Gibson *et al.* (1994), relatam que o *E. camaldulensis* possui diferentes estratégias para sua sobrevivência dependendo de seus sítios de origem. Árvores oriundas de regiões mais secas quando submetidas à limitação de água reduzem seu crescimento apical, as folhas tornam-se mais estreitas e espessadas, e há um aumento da concentração de clorofila. Em contraste, árvores oriundas de regiões mais úmidas respondem à limitação da água através de redução da condutância estomática e das trocas gasosas, e um aumento da

eficiência do uso da água. Estas diferenças devem ser atribuídas a diferentes mecanismos de adaptação aos ambientes próprios.

Plântulas de *E. camaldulensis* de diferentes procedências mostram o mesmo padrão de comportamento que árvores jovens e adultas em relação ao “deficit” hídrico. Plântulas de regiões mais secas apresentam maior redução da área foliar e maior acúmulo de clorofila em relação às plântulas de localidades mais úmidas, entretanto estas últimas apresentam maiores reduções das taxas de transpiração. Em condições de calor e falta d’água, as plântulas de clima mais seco tendem a aumentar a formação de raízes e deslocar a alocação de carbono para o caule principal, reduzindo a relação folha/caule. Plântulas de regiões mais úmidas não alteram sua morfologia, ou a alocação de carbono em resposta às limitações de água. Elas continuam o crescimento apical e iniciam a formação de gemas axilares nos nós superiores (Gibson *et al.*, 1995).

Progenies de *E. camaldulensis* de diferentes procedências australianas apresentam comportamento de crescimento diferenciado em determinada condição de crescimento. Entretanto, como as características individuais possuem baixa herdabilidade, a melhor estratégia recomendada para o melhoramento é a de se utilizar uma ampla base genética. Ainda de acordo com os mesmos autores, esta espécie é apropriada para reflorestamentos de regiões semiáridas (Alvear & Gutierrez, 1995), bem como sugerem

Reis & Hall (1986), citando o *E. camaldulensis* como uma das espécies mais recomendadas para reflorestamentos de áreas secas no Brasil.

Desta forma, o presente trabalho visa fornecer subsídios e incrementar o processo de seleção e propagação vegetativa através de novas informações, obtidas com o emprego da tecnologia da cultura de tecidos, a respeito do comportamento morfológico e fisiológico da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o início do cultivo *in vitro*, utilizou-se sementes de 6 progênes (p1...p6) de *E. camaldulensis* provenientes de matrizes da Estação Experimental de Anhembi - SP, com distintas procedências australianas, variando num gradiente de umidade: Gilbert River, p1 e p2, (semi-árido, latitude 17.10' e longitude 141.45'), S. Katherine, p3 e p4, (tropical seco, lat. 14.30' e long. 132.15') e Petford, p5 e p6, (tropical úmido, lat. 17.20' e long. 144.58').

- Ensaio realizados :

a) Avaliação da taxa de germinação sob estresse hídrico

Sementes aleatoriamente escolhidas de uma amostra foram colocadas para germinar em placas de petri com soluções aquosas de sorbitol apresentando diferentes potenciais osmóticos em torno de: -0,5; -0,75; -1,5 e -3,0 MPa, mais uma testemunha apenas com água destilada em fotoperíodo de 16h. Para cada situação, foram avaliadas 100 sementes distribuídas em 5 placas de petri, onde se calculou a porcentagem de germinação.

b) Obtenção de gemas assépticas

Sementes foram desinfestadas em solução de 2% NaOCl comercial por 20 minutos e lavadas em água destilada estéril, sendo inoculadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962). Hipocótilos de plantas com 28 dias foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com 2mg/l de BA (6-benzilaminopurina) para o início da propagação vegetativa via indução de gemas. Após 60 dias de cultura à temperatura de 25°C, intensidade luminosa de 1600 lux e fotoperíodo de 16h, o material foi

transferido para o meio de cultura JADS (Correia, 1993) pois apresentava sintomas de deficiência nutricional, permanecendo cerca de mais 60 dias em meio de multiplicação com repicagens a cada 20 dias aproximadamente.

c) Teste de resistência ao estresse hídrico *in vitro*

Cerca de 15 gemas de 0,5-1,0 cm de comprimento, formando um nó epicórmico, foram inoculadas em meio de cultura MS com 30g de sacarose em diferentes potenciais osmóticos induzidos a partir da adição de diferentes concentrações de sorbitol (100 mM, 400 mM e 1000 mM) atingindo potenciais em torno de -0,75; -1,5 e -3,0 MPa, sendo a testemunha o potencial osmótico de - 0,5 MPa sem adição de sorbitol. A alteração do potencial osmótico (Ψ_o) do meio de cultura foi determinado através do método de Volume Constante (Salisbury e Ross, 1969). O material permaneceu durante 20 dias nestas condições, sendo a seguir avaliado através da variação de altura, peso da matéria seca produzida, e porcentagem de matéria seca.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados sobre as porcentagens de germinação das sementes, sob condições de estresse hídrico, mostram uma inibição da germinação a partir do potencial osmótico - 0.75 MPa, sendo totalmente inibida em - 1.5 MPa (Tabela1):

- Tabela 1: Porcentagem (%) de germinação de sementes de *E. camaldulensis* sob estresse hídrico *in vitro*.

Tratamentos	Germinação (%)
água destilada	46
-0.5 MPa	49
-0.75 MPa	27,3
-1.5 MPa	0
-3.0 MPa	0

Nas tabelas 2, 3 e 4, pode-se observar os resultados obtidos com a variação do potencial osmótico do meio de cultura em relação a porcentagem de água na planta, peso da matéria seca produzida, e altura entre as diferentes progênes.

Tabela 2 : Porcentagem (%) de água nas diferentes progênes de *E. camaldulensis* sob estresse hídrico *in vitro* aos 20 dias de cultivo.

$-\Psi_o$ (MPa)	P1	P2	P3	P4	P5	P6
0,5	85,0	89,7	87,2	89,0	87,2	87,1
0,75	83,7	88,6	87,8	87,3	89,8	83,8
1,5	80,3	84,6	80,5	80,9	81,4	77,5
3,0	69,8	74,7	68,9	69,8	68,9	70,0

Tabela 3: Peso da matéria seca (mg) de nós epicórmicos das diferentes progênes de *E. camaldulensis* sob estresse hídrico *in vitro* aos 20 dias de cultivo.

$-\Psi_o$ (MPa)	P1	P2	P3	P4	P5	P6	C	s
0,5	133	137	146	210	160	143	0,086	12,7
0,75	150	163	157	237	173	146	0,085	13,8
1,5	217	210	197	317	250	173	0,157	34,5
3,0	136	230	193	245	224	200	0,181	36,8

- C = coeficiente de variação; s = desvio padrão

Tabela 4: Altura média das gemas (cm) das diferentes progênes de *E. camaldulensis* sob estresse hídrico *in vitro* aos 20 dias de cultivo.

$-\Psi_0$ (MPa)	P1	P2	P3	P4	P5	P6	C	s
0,5	4,5	1,5	5,0	2,5	5,0	5,0	0,390	1,53
0,75	1,2	1,5	2,0	1,2	1,25	1,4	0,216	0,31
1,5	1,0	0,8	1,0	0,9	1,2	1,0	0,135	0,13
3,0	0,5	0,6	0,6	0,7	0,9	0,6	0,212	0,14

- C = coeficiente de variação; s = desvio padrão

Estes resultados sugerem que a estratégia inicial de resistência ao estresse hídrico se encontra nos estágios de desenvolvimento e crescimento das plântulas, uma vez que as sementes respondem negativamente às condições desfavoráveis de água, inibindo a germinação.

O crescimento das gemas, em geral, apresentou um gradiente de vigor inverso ao aumento da deficiência hídrica, constatando-se também uma maior liberação de fenóis nos meios com maior deficiência hídrica, apontado pelo nítido escurecimento do meio (figura 1).

Apesar das diferentes progênes apresentarem variações nas respostas em relação a porcentagem de água nas plantas, não ficou claro se houve ou não influência das condições ambientais para as distintas procedências em relação a capacidade de respostas ao estresse hídrico induzido *in vitro*. O mesmo aconteceu em relação ao peso da matéria seca produzida pelas diferentes progênes. Entretanto, pode-se observar uma nítida tendência à redução do conteúdo de água nas plantas, que foi acompanhada pelo aumento do peso da matéria seca produzida até o potencial osmótico de -1,5 MPa.

A redução constante da porcentagem de água nas plantas é naturalmente explicada pela retirada de água dos tecidos, em função da redução do potencial osmótico do meio de cultura, isto é, ocorre uma inversão da direção do fluxo de água. Em relação

ao aumento do peso seco das gemas, como resposta inicial ao estresse hídrico, Tanguilig *et al.* (1987) apontam este aumento como um possível mecanismo adaptativo ao estresse hídrico. Já em relação ao crescimento em altura, houve uma nítida redução contante em função da diminuição do potencial osmótico no meio de cultura.

Com os resultados apresentados, pode-se considerar a redução da porcentagem de água nas plantas, bem como a diminuição da dominância apical, em função da diminuição do comprimento das plântulas, como respostas constantes ao estresse hídrico. Já o peso da matéria seca produzida, de forma geral, sofre uma redução em situações mais desfavoráveis, apesar do aumento inicial como resposta à deficiência hídrica.

Figura 1 : Fotografia de um gradiente padrão de ramos epicórmicos de *E. camaldulensis* sob estresse hídrico *in vitro* aos 20 dias de cultivo.

As progênies P2 e P6 foram submetidas a estresse hídrico em meio de cultura sem sacarose (única fonte de carboidrato assimilável), mantendo-se os quatro diferentes potenciais osmóticos apenas com a adição de sorbitol (carboidrato não assimilável) para

avaliação de possível resposta autotrófica, sugerida pelo fato destas progênes não terem reduzido sua produção de matéria seca como as demais. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 5 e 6 :

- Tabela 5: Porcentagem (%) da produção de matéria seca em meio com e sem sacarose em diferentes potenciais osmóticos aos 20 dias de cultivo *in vitro*.

Estresse	P2 c/ sac	P2 s/ sac.	P6 c/ sac.	P6 s/ sac
-0,5 MPa	10,3	10,7	12,9	8,5
-0,75 MPa	11,4	12,5	16,2	9,6
-1,5 MPa	15,4	23,1	22,5	17,5
-3,0 MPa	25,3	37,5	30,0	25,0

* As alturas das plântulas em meio de cultura sem a sacarose foram homogêneas em todos os quatro tratamentos : média de 0.5 cm em P2, e média de 1.0 cm em P6.

- Tabela 6: Peso da matéria seca (mg) produzida pelas progênes P2 e P6 em meios de cultura sem sacarose com diferentes potenciais osmóticos (-MPa).

Estresse (-MPa)	P2	P6
0,5	83	81
0,75	110	90
1,5	126	112
3,0	145	137

Como os resultados mostraram, a progênie P2 teve um aumento da porcentagem de matéria seca em relação ao tratamento com sacarose, indicando uma maior perda de água dos tecidos. Diferentemente, a progênie P6 apresentou uma redução da porcentagem de matéria seca, indicando uma redução de perda de água dos tecidos em relação ao tratamento com sacarose. Entretanto, ambas as progênes mantiveram um

aumento constante da produção de matéria seca (tabela 6), demonstrando serem ambas potencialmente autotróficas, mesmo em situações de maior deficiência hídrica.

Uma vez que a progênie P2 é oriunda de uma região de baixa umidade, parece claro que a estratégia adaptativa para estas circunstâncias é o desenvolvimento de mecanismos que possibilitem uma maior perda de água pelos tecidos, mantendo as funções básicas da planta. Já as procedências de regiões de maior umidade natural, procurariam manter uma maior quantidade de água nos tecidos, ou por mecanismos de redução de perda de água, ou por aumento da absorção.

Deve-se destacar neste trabalho, que em nenhuma situação as gemas possuíam sistema radicular desenvolvido, desta forma, os resultados apresentados restringem-se a situação de cultivo *in vitro*, porém indicando claras formas de resposta à deficiência hídrica.

CONCLUSÕES

A técnica de cultura de tecidos como instrumento para avaliação do crescimento inicial das plântulas mostrou-se eficiente para a detecção de padrões gerais de comportamento ao estresse hídrico, como o aumento da produção de matéria seca e a redução da dominância apical em relação a redução do potencial osmótico do meio de cultura.

A eficiente resposta do material (cerca de 20 dias) à deficiência hídrica no meio de cultura faz desta técnica um eficiente instrumento para pré-seleção de plantas *in vitro*.

Em geral, não foi possível fazer uma nítida distinção do comportamento de cada procedência nas diferentes condições de estresse hídrico, exceto para as procedências submetidas ao teste de autotrofia. Por outro lado, estas distinções foram claras em observações de plantas de maior idade no campo, como relatam Barros *et al* (1990), Gibson *et al.* (1994 e 1995).

Os resultados indicam que uma redução do potencial osmótico do meio de cultura (-0.75 a -1.5 MPa) pode favorecer a multiplicação do material *in vitro*, uma vez

que estas condições desfavoreceram a dominância apical e aumentaram a produção de matéria seca, e que, o meio de cultura JADS (Correia, 1993) forneceu em suprimento nutricional mais adequado.

Uma das formas de resistência ao estresse hídrico pode estar relacionada ao potencial da planta tornar-se autotrófica. Pois, embora o crescimento em altura fosse inibido, manteve-se a produção de matéria seca e as folhas permaneceram verdes. É provável que este tipo de desvio metabólico seja uma das estratégias de defesa de plantas contra o estresse hídrico (Levitt, 1972).

Como indica a literatura (Barros *et al.*), a estratégia comum de resistência à deficiência hídrica é a parada do crescimento, porém, como apontaram os resultados deste trabalho, a parada do crescimento em altura não foi acompanhada pela parada da produção de matéria seca até um certo limite, principalmente para determinadas progênies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVEAR, C. S. & GUTIÉRREZ, B. C. Crecimiento hasta los 42-44 meses de edad y estimación de parámetros genéticos de 23 procedencias e 196 familias de *Eucalyptus camaldulensis* Denh. em cuatro sitios de la zona central de Chile. *Ciência e Investigación Florestal* v. 9 n.1, p.23-47, 1995.
- BARROS, N. F. *et al.* Relação solo-eucalipto. Universidade Federal de Viçosa, p. 6-10, 1990.
- CORREIA, D. Crecimiento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus spp* in vitro em meio de cultura líquido e sólido. ESALQ/USP, 1993. (tese-mestrado)
- FAÇANHA, J. G. V. et al. Relação germinação/crescimento em espécies de Eucalipto submetidas a estresse hídrico. *Revista Árvore* 7(2):177-87, 1983.

- GIBSON, A.; BACHELARD, E. P. & HUBICK, K. T. Growth strategies of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. at three sites in Northern Australia. Aust. J. Plant Physiol. 21:653-62, 1994.
- GIBSON, A.; BACHELARD, E. P. & HUBICK, K. T. relationship between climate and provenance variation in *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. Aust. J. Plant Physiol 22:453-60, 1995.
- LEVITT, J. Responses of plants to enviromental stresses. Academic Press, New York, 1972.
- MOEZEL van der, P. G. et al. The Response of Six Eucalyptus Species and Casuarina obesa to the Combined Effect of Salinity and Waterlogging. Aust. J. Plant Physiol. 15, 465-74, 1988.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays tabacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-97, 1962.
- REIS, G. G. & HALL, A. E. Resposta de brotações de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. submetidos a diferentes níveis de deficiência hídrica. Revista Árvore 10(1):16-26, 1986.
- SALISBURY, F. B. & ROSS, C. Plant Physiology. Wadsworth Publishing Co., Belmont, 1969. p. 53-77.
- SANDS, R. Salt Resistence in Eucalyptus caaldulensis Dehn. from Three Diferrent Seed Soucers. Aust. For. Res. 11, 93-100, 1981.
- SINHA, R. K. Taming the Thar desert of Rajasthan, India. Desertification Control Bulletin, 22:31-35, 1993.
- TANGUILIG, V. C. *et al.* Water stress effects on leaf elongation, leaf water potencial, transpiration, and nutrient uptake to rice, maize and soybean. Plant and Soil 103:155-68, 1987.

EFEITOS DA DEFICIÊNCIA HÍDRICA *in vitro* NA ESTRUTURA ANATÔMICA DE FOLHA E CAULE DO *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. (Myrtaceae)*

G. M. Souza**, A. N. Gonçalves** & M. Almeida***

** Depto. de Ciências Florestais ESALQ/USP, Piracicaba - SP, Brasil

*** Depto. de Botânica ESALQ/USP, Piracicaba - SP, Brasil

Resumo: Três procedências distintas de *E. camaldulensis* foram submetidas à diferentes níveis de deficiência hídrica *in vitro* induzida através da adição de sorbitol em meio de cultura. Cortes transversais de limbos foliares e caules foram analisados anatomicamente através da técnica de emblocamento em historesina. As procedências apresentaram respostas diferenciadas, sendo Gilbert River a mais sensível. As alterações básicas da estrutura anatômica em função da deficiência hídrica são as seguintes: colapso das células, atraso na diferenciação dos tecidos, desorganização do feixe vascular e da epiderme.

Palavras-chave: *Eucalyptus camaldulensis*, deficiência hídrica, anatomia, cultura de tecidos.

Abstract: Shoots of *E. camaldulensis* seedlings from three distinct provenances were submitted to three different levels of *in vitro* water deficit induced by the addition of sorbitol in the culture media. Transversal sections from the leaf blades and stems were anatomically analysed using the historesin inclusion technique. Shoots from the different provenances presented distinct responses to the treatments. The Gilbert River provenance was the most sensible. The basic alterations found on the anatomical structure in response to the water deficit were: cell collapse, late tissue differentiation and vascular bundle and epidermis disorganization.

Keywords: *Eucalyptus camaldulensis*, water deficit, anatomy, tissue culture.

*Trabalho enviado para a revista Australian Journal of Botany

INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. ocorre ao longo de cursos d'água permanentes e intermitentes em uma extensa faixa climática da Austrália (Gibson & Bachelard, 1994). O porte das árvores varia com o grau de aridez da região. Assim, as procedências de Dimulah (Walsh River), Petford (Emu Creek) e Laura são caracterizadas por árvores que chegam a 20 metros de altura. Por outro lado, as procedências situadas entre Mount Garmet e Georgetown são de árvores mais baixas que não atingem, em geral, 10 metros de altura (Barros *et al.*, 1990).

Diferentes trabalhos tem descrito as variações morfo-fisiológicas existentes entre procedências de *E. camaldulensis* à diferentes situações de estresse hídrico (Gibson *et al.*, 1994; Gibson & Bachelard, 1994; Alvear & Gutiérrez, 1995; Gibson *et al.*, 1995; Farrell *et al.*, 1996). Entretanto, poucos trabalhos buscaram relacionar a anatomia desta espécie com suas diferentes procedências em relação ao regime climático e hídrico (Pereira & Kozlowski, 1976; James & Bell, 1995).

Desta forma, este trabalho teve por objetivo fornecer subsídios para preencher esta lacuna com dados sobre a influência do estresse hídrico na arquitetura anatômica dos tecidos de diferentes procedências australianas de *E. camaldulensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este trabalho, foram escolhidas três procedências de *E. camaldulensis* com distintas origens climáticas : Gilbert River (semi-árido, latitude 17.10' e longitude 141.45'), S. Katherine (tropical seco, lat. 14.30' e long. 132.15') e Petford (tropical úmido, lat. 17.20' e long. 144.58').

Gemas de cultura *in vitro* previamente estabelecida, foram inoculadas em meios de cultura básico (Murashige & Skoog, 1962) com diferentes potenciais osmóticos (-0,5 como testemunha; -0,75; -1,5 e -3,0 MPa) induzidos por adição de diferentes concentrações de sorbitol (Souza & Gonçalves, não publicado). Após 20 dias de cultura

nestas condições, foram retirados explantes caulinares e de limbos foliares para a avaliação anatômica do material.

- Avaliação anatômica

Para o estudo anatômico deste material, utilizou-se a técnica de inclusão de material vegetal em historesina (kit Jung - Historesin).

Seções de 4 mm da porção mediana caulinar e de limbos foliares retiradas da porção mediana relativa em cada tratamento foram fixadas em solução de McDowell durante 48 horas a vácuo. A seguir, o material foi desidratado em série de etanol 70%, 96% e 100% por 2 horas cada etapa. A parainfiltração foi realizada durante 2 horas em uma solução 1:1 de etanol 100% + resina líquida a temperatura ambiente sob vácuo.

O material passou por uma infiltração durante 24 horas em uma solução de resina líquida (50 mL) + pó-ativador (0,5 g). A seguir, o material foi emblocado em moldes de polietileno na mesma solução anterior acrescida do polimerizador “hardner” na proporção de 15:1 mL. A placa de moldes foi colocada em estufa a 40°C até o endurecimento dos blocos.

O material foi seccionado transversalmente em micrótomo com navalha de aço em uma espessura de 7 µm, e corado com azul de toluidina. As lâminas permanentes foram montadas em entellan, e fotomicrografadas em um aparelho Nikon modelo Labophot.

RESULTADOS

Os resultados da avaliação dos cortes anatômicos apontaram claras diferenças entre as procedências em relação aos tratamentos quando comparados as testemunhas (- 0,5 MPa).

- Procedência de Petford

Nos cortes transversais (CTs) de limbos foliares de plantas da procedência de Petford (Figura 1.a-d), observou-se que no potencial osmótico de - 0,5 MPa as epidermes adaxial e abaxial apresentaram-se normais com estômatos bem formados, o

parênquima clorofiliano está nitidamente heterogêneo com parênquimas paliçádico (PP) e lacunoso (PL) distintos, o feixe vascular mostrou-se normal com xilema e floema distintos (Figura 1.a). Em - 0,75 MPa, houve uma menor diferenciação entre o PP e o PL, e uma tendência de formação de espaços intercelulares no PL, a epiderme adaxial apresentou células túrgidas quase cilíndricas, já na região do feixe vascular as células eram menores e perfeitamente cilíndricas quase sem estômatos, o feixe vascular apresenta-se mais compacto (Figura 1.b). Em -1,5 MPa, tornou-se clara a formação de aerênquimas, e uma total indiferenciação entre PP e PL, apresentando o parênquima clorofiliano homogêneo. De uma forma geral, as células apresentaram-se túrgidas, e a epiderme semelhante ao tratamento com - 0,75 MPa, embora indistinta em alguns pontos, o feixe vascular estava pouco distinto e menos organizado (Figura 1.c). Já em - 3,0 MPa, os espaços intercelulares praticamente desapareceram, as células da epiderme tornaram-se menos túrgidas e achatadas com estômatos bem evidentes, o parênquima clorofiliano mostrou-se heterogêneo, com pequena, mas visível distinção entre PP e PL, os vasos condutores apresentaram um maior espessamento de suas paredes e um diâmetro menor (Figura 1.d). Na Tabela 1 encontram-se os dados da análise quantitativa do limbo foliar nos potenciais osmóticos testados.

Tabela 1: Características anatômicas quantitativas dos limbos foliares da procedência de Petford em diferentes potenciais osmóticos (MPa).

Características	- 0,5	-0,75	-1,5	-3,0
n° de células da epiderme adaxial/mm	22,81±0,57	30,42±0,84	26,62±0,84	41,82±0,57
n° de células da epiderme abaxial/mm	25,34±1,02	38,02±1	34,22±0,89	53,23±1,34
espessura da epiderme adaxial (µm)	35,03±0,75	25,46±0,49	29,14±0,69	12,83±0,4
espessura da epiderme abaxial (µm)	38,5±0,61	17,67±0,45	22,41±0,32	10,73±0,23
espessura do mesofilo (µm)	200,73±2,04	240,28±1,77	347,16±3,58	124,14±2,29
espessura total do limbo (µm)	274,22±3,43	283,36±4,2	398,6±5,3	147,8±1,35

Em relação aos CTs do caule (Figura 1.e-h), a testemunha apresentou epiderme com células túrgidas de forma esférica, o córtex possuía células grandes com tendência esférica, embora observou-se células de formas irregulares, com presença de poucos espaços intercelulares, as células próximas ao cilindro vascular são menores. O cilindro vascular estava normal com xilema e floema distintos, e medula intacta (Figura 1.e). Ocorreram maiores modificações no potencial de -0,75 MPa, onde houve uma desintegração total da medula e uma completa desorganização dos demais tecidos. As células do cortex, com paredes muito finas, colapsaram, a epiderme tornou-se irregular, e o cilindro vascular atípico e descontínuo, pressionando o córtex contra a epiderme (Figura 1 f). No potencial de -1,5 MPa, os tecidos encontraram-se em um nível de organização maior, embora, a medula ainda tenda a se desintegrar. As células do córtex apresentaram-se arredondadas com pequenos espaços intercelulares, e o cilindro vascular voltou a ser contínuo e melhor organizado. Entretanto, a epiderme mostrou-se irregular e

quase indistinta do córtex (Figura 1.g). No menor potencial osmótico (-3,0 MPa), a epiderme mostrou-se indistinta do córtex, e este apresentou células de formas irregulares mas sem colapsamento. O cilindro vascular apresentou vasos de menor calibre e paredes mais espessadas. A medula mostrou-se com aparência normal (Figura 1.h).

- Procedência de Saint Katherine

As plantas da procedência Saint Katherine, de um modo geral, foi a que apresentou um aumento constante de sensibilidade a redução do potencial osmótico. Em relação a folha, a testemunha apresentou um aspecto normal semelhante ao descrito para a procedência anterior (Figura 2.a). Embora em -0,75 MPa houvesse uma boa diferenciação entre PP, PL e epiderme, alguns sinais de início de sensibilidade ao estresse hídrico fizeram-se presentes, como por exemplo, formação de evidentes espaços intercelulares, e estômatos atípicos. A epiderme adaxial apresentou células túrgidas e maiores que na epiderme abaxial, o PL apresentou células muito adensadas chegando a possuir mais de uma camada (Figura 2.b). Em -1,5 MPa, as células do parênquima clorofiliano tenderam a se deformar mais próximas ao feixe vascular, não havendo mais distinção tão nítida entre PP e PL, com presença de alguns grandes espaços intercelulares. O feixe vascular apresentou-se com células de forma irregular e paredes mais espessadas. A epiderme (adaxial e abaxial) apresentou células achatadas com estômatos raros e atípicos, sendo que as células da epiderme abaxial eram menores e mais arredondadas na região do feixe vascular (Figura 2.c). No potencial osmótico de -3,0 MPa, a desorganização dos tecidos da folha foi total. Não houve distinção entre PP, PL e epiderme, os vasos do feixe colapsaram, e os estômatos eram totalmente atípicos. As células do parênquima clorofiliano apresentaram formas e tamanhos irregulares (Figura 2.d). Os dados das análises quantitativas dos limbos foliares nos diferentes potenciais osmóticos testados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Características anatômicas quantitativas dos limbos foliares da procedência de St. Katherine em diferentes potenciais osmóticos (MPa).

Características	- 0,5	-0,75	-1,5	-3,0
n° de células da epiderme adaxial/mm	53,86±0,5	53,76±0,8	34,85±1,29	45,94±0,96
n° de células da epiderme abaxial/mm	57,03±1,3	76,04±0,82	44,36±0,71	40,56±0,55
espessura da epiderme adaxial (µm)	15,36±0,66	18,41±0,63	13,99±0,41	20,19±0,38
espessura da epiderme abaxial (µm)	16,83±0,84	12,73±0,49	13,15±0,42	21,88±0,8
espessura do mesofilo (µm)	146,27±2,74	207,92±1,34	195,67±2,67	117,87±1,67
espessura total do limbo (µm)	178,46±2,47	238,9±3,42	222,95±3,7	160,07±2,76

Já em relação aos CTs do caule, a testemunha apresentou uma epiderme distinta com células pequenas, o córtex apresentou-se normal com células menores próximas ao feixe vascular. O cilindro vascular apresentou-se bem organizado com liberianos e lenhosos distintos, a medula estava intacta com células grandes diminuindo de tamanho próximas ao cilindro vascular (Figura 2.e). No potencial osmótico de - 0,75 MPa a estrutura anatômica permaneceu praticamente inalterada, embora o contorno externo do caule fosse mais irregular (Figura 2.f). Uma maior sensibilidade ao estresse hídrico foi observada em -1,5 MPa, onde a forma do caule era totalmente irregular, a medula apresentou grandes rupturas, o cilindro vascular apresentou-se distribuído em pacotes com vasos compactados, as células do córtex evidenciaram sinais de colapso com formas totalmente irregulares, e a epiderme apresentou células túrgidas, embora não totalmente regulares (Figura 2.g). No potencial osmótico de -3,0 MPa, a forma do caule tendeu a ser arredondada, a medula permaneceu intacta, o cilindro vascular, embora com

vasos de paredes mais espessadas, apresentou-se contínuo, e as células do córtex apenas ligeiramente irregulares. A epiderme apresentou células pequenas e esféricas (Figura 2.h).

- Procedência de Gilbert River

As plantas da procedência Gilbert River (região mais seca) foi a que apresentou respostas mais rápidas aos primeiros sinais de deficiência hídrica, embora, apresentasse alguns sinais de recuperação posteriormente. Nos CTs de limbos foliares, logo no potencial osmótico de - 0,75 MPa, a estrutura anatômica foliar encontrou-se totalmente alterada em relação a testemunha, que apresentou um aspecto normal semelhante as demais testemunhas (Figura 3.a e 3.b). Não houve distinção alguma entre PP e PL, as células encontraram-se totalmente irregulares, mostrando evidentes sinais de colapso, e ausência de espaços intercelulares. As epidermes adaxial e abaxial apresentaram-se completamente irregulares, com células achatadas e disformes, mostrando claros sinais de desintegração. A região vascular encontrou-se igualmente colapsada, sem sinais de reforço nas paredes dos vasos, como era de se esperar pelas respostas das outras procedências (Figura 3.b). Entretanto, paradoxalmente, o tecido foliar em - 1,5 MPa, apresentou evidentes sinais de turgecência de suas células de uma forma geral. Não houve diferenciação entre o parênquima clorofiliano e a epiderme, nem entre PP e PL. Todavia, deve-se destacar que as células que se encontraram na região da epiderme, mostraram sinais de reforço com lignina e celulose, evidenciada pela coloração esverdeada destacada pelo azul de toluidina (Johansen, 1940). Notou-se a presença de espaços intercelulares no parênquima clorofiliano, e o feixe vascular encontrava-se mal organizado e pouco diferenciado (Figura 3.c). No potencial osmótico de - 3,0 MPa, os tecidos foliares, de forma geral, apresentaram características semelhantes as encontradas em plantas da procedência St. Katherine em - 3,0 MPa. As células da região da epiderme possuíam forma esférica e paredes finas evidenciando sinais de desintegração. O parênquima clorofiliano mostrou-se homogêneo, praticamente sem espaços intercelulares, e células de formas irregulares, apresentando maiores deformidades próximas ao feixe vascular, que se encontrava fortemente compactado com xilema e floema indistinguíveis

(Figura 3.d). Na Tabela 3 apresentam-se os dados da análise quantitativa dos limbos foliares nos diferentes potenciais osmóticos testados.

Tabela 3: Características anatômicas quantitativas dos limbos foliares da procedência de Gilgert River em diferentes potenciais osmóticos (MPa).

Características	- 0,5	-0,75	-1,5	-3,0
n° de células da epiderme adaxial/mm	31,68±0,82	34,85±0,96	41,19±0,5	39,29±0,84
n° de células da epiderme abaxial/mm	31,68±1,22	41,19±0,6	45,12±0,63	52,28±0,96
espessura da epiderme adaxial (µm)	31,56±0,35	8,42±0,65	19,98±0,57	23,67±0,52
espessura da epiderme abaxial (µm)	24,19±0,45	8,2±0,44	18,72±0,45	16,62±0,58
espessura do mesofilo (µm)	189,35±4,62	184,63±2,88	386,61±5,86	220,92±3,4
espessura total do limbo(µm)	245,15±3,87	201,05±4,33	425,31±5,87	261,19±4,71

Em relação ao caule, a testemunha apresentou-se com aspecto normal (Figura 3.e). A estrutura anatômica no potencial osmótico de - 0,75 MPa, foi muito afetada. O cilindro vascular encontrava-se descontínuo, recortado por células do córtex e medula, e seus vasos apresentaram sensíveis sinais de colapso. As células do córtex apresentaram-se murchas, com formatos irregulares e tendência a formar espaços intercelulares. A epiderme, embora ainda distinguível, apresentou-se mal organizada com sinais de reforço de celulose e lignina evidenciados pelo corante (Johansen, 1940) (Figura 3.f). O cilindro vascular nos potenciais de -1,5 e -3,0 MPa, embora contínuos, apresentaram células com espessamento nas paredes. O córtex e a medula em -3,0 MPa,

apresentaram sinais de maior sensibilidade ao estresse hídrico que em -1.5 MPa, mostrando células com formas mais irregulares e maiores espaços intercelulares. Em ambos os casos, foi difícil distinguir as células da epiderme em relação ao córtex (Figura 3.g e 3.h).

DISCUSSÃO

Comparando-se as três procedências, de modo geral, Gilbert River apresenta respostas mais rápidas e evidentes à deficiência hídrica, mostrando mecanismos adaptativos mais eficientes ao estresse hídrico, uma vez que é natural de regiões com grandes períodos de seca. Estes dados anatômicos corroboram o padrão de comportamento fisiológico e morfológico descrito na literatura (Gibson *et al.*, 1994; Gibson & Bachelard, 1994; Alvear & Gutiérrez, 1995; Gibson *et al.*, 1995, Farrel), embora apareçam algumas irregularidades. Nota-se claramente, que a procedência de Petford apresenta comportamentos distintos de reação ao estresse hídrico entre folha e caule, sendo a folha com um padrão mais regular. Isto pode significar diferenças de sensibilidade ao estresse entre folha e caule, ou apontar desvios de comportamento metabólico como forma de estratégia de resistência a deficiência hídrica (Levitt, 1972).

Os dados quantitativos (Tabelas 1, 2 e 3) apontaram para uma tendência de aumento do tecido fotossintético (clorênquima) em função da redução do potencial osmótico. Para a procedência de Petford este aumento foi constante até o potencial osmótico de -1,5 MPa caindo drasticamente no nível de deficiência hídrica mais agudo. Embora este comportamento também fosse observável na procedência de Gilbert River, no nível de deficiência hídrica mais agudo (-3,0 MPa) a espessura do mesofilo permaneceu maior do que na testemunha, indicando uma maior resistência à deficiência hídrica. Já em relação a procedência de St. Katherine observou-se um declínio constante da espessura do tecido fotossintético a partir do potencial osmótico de -0,75 MPa, indicando uma possível redução da taxa fotossintética deste material em relação aos demais.

Figura 1 : Micrografias de secções transversais de limbo foliar e caule de *E. camaldulensis* da procedência Petford sob deficiência hídrica (-MPa) *in vitro*. (PM = Parênquima paliçádico; SM = parênquima lacunoso; VB = sistema vascular; C = clorênquima; M = medula; Co = cortex; VC = cilindro vascular)

Figura 2 : Micrografias de secções transversais de limbo foliar e caule de *E. camaldulensis* da procedência St. Katherine sob deficiência hídrica (-MPa) *in vitro*. (PM = Parênquima paliádico; SM = parênquima lacunoso; VB = sistema vascular; C = clorênquima; M = medula; Co = cortex; VC = cilindro vascular)

Figura 3 : Micrografias de seções transversais de limbo foliar e caule de *E. camaldulensis* da procedência Gilbert River sob deficiência hídrica (-MPa) *in vitro*. (PM = Parênquima paliádico; SM = parênquima lacunoso; VB = sistema vascular; C = clorênquima; M = medula; Co = cortex; VC = cilindro vascular)

Em relação à epiderme, há uma tendência da epiderme adaxial ser mais espessa em todas as procedências nos quatro tratamentos. Entretanto, não há um padrão de resposta entre as procedências na variação da espessura das epidermes em relação à variação do potencial osmótico. Na procedência de Petford tanto a espessura da epiderme adaxial quanto a da abaxial reduziram-se no potencial osmótico de -0,75 MPa, voltando a aumentar em -1,5 MPa e voltando a reduzir-se no potencial osmótico de -3,0 MPa. Na procedência de St. Katherine a espessura da epiderme abaxial mantém-se mais estável que a da epiderme adaxial, com um forte aumento no menor potencial osmótico, inversamente ao que ocorre com a espessura do mesofilo. Isto pode sugerir que certas procedências possuem caminhos alternativos e complementares de resistir a falta de água, ou pelo espessamento da epiderme reduzindo as perdas de água e/ou pelo aumento do tecido fotossintético promovendo um ajuste osmótico pela síntese de solutos. Já em relação à procedência de Gilbert River ambas as espessuras das faces da epiderme reduzem-se drasticamente no potencial osmótico de -0,75 MPa, voltando a aumentar em -1,5 MPa. Entretanto, a epiderme adaxial tem sua espessura aumentada no potencial osmótico de -3,0 MPa, enquanto a espessura da epiderme abaxial sofre uma pequena redução. O número de células na epiderme também varia irregularmente entre as procedências em relação ao potencial osmótico. Com relação a epiderme abaxial nota-se uma lógica relação inversa entre o número de células e a espessura da epiderme, já em relação a epiderme adaxial isto não é observado (Tabelas 1, 2 e 3). O aumento da espessura da epiderme é um indício de resistência à deficiência hídrica (Levitt, 1972).

Segundo James & Bell (1995), as procedências de localidades mais secas apresentam o parênquima lacunoso mais fino, o parênquima paliçádico mais espesso, cloroplastos maiores, e menor densidade de células na epiderme que procedências de localidades menos secas. Entretanto, não houve marcantes diferenças na morfologia e anatomia foliar dos clones de *E. camaldulensis* em relação a qualquer condição climática. Diferentemente, neste trabalho as observações feitas por James e Bell (1995) não foram tão nítidas, embora nas testemunhas as relações opostas entre os parênquimas lacunoso e paliçádico sejam observáveis (Figuras 1a, 2a, 3a).

Estes mecanismos, embora observáveis em maior ou menor escala em todas as precedências, uma vez que são respostas comuns dos vegetais aos estresse hídrico (Levitt, 1972), mostram-se mais rápido e eficientemente nos materiais oriundos de regiões onde a deficiência hídrica é uma constante. Entretanto, deve-se destacar que estas respostas, em geral, não correspondem ao padrão de adaptação de plantas xeromórficas descritos por Esau (1974). Isto demonstra que, embora a procedência de Gilbert River seja de uma região semi-árida, suas adaptações podem não estar evolutivamente fixadas, pois na ausência de deficiência hídrica seu comportamento é semelhante, por exemplo, ao de Petford. Desta forma, poderíamos considerar estes mecanismos como formas adaptativas facultativas, isto é, expressam-se conforme a exigência do ambiente, e não obrigatoriamente apresentando características xeromórficas.

CONCLUSÕES

Este trabalho tornou evidente a influência do ambiente de origem do *E. camaldulensis* em suas respostas, ao nível anatômico, conforme alterações das condições osmóticas gerando deficiências hídricas.

Basicamente, as alterações anatômicas observadas mais características de resposta à deficiência hídrica no limbo foliar são :

- deformações nas células da epiderme, que inicialmente apresentam sinais de turgescência, e em potenciais osmóticos menores (-3,0 MPa) tendem a desintegrar-se;
- menor diferenciação entre os parênquimas paliçádico e lacunoso;
- formação de espaços intercelulares no parênquima clorofiliano nos potenciais osmóticos intermediários, que entretanto, tendem a desaparecer nos potenciais osmóticos extremos;
- desorganização do feixe vascular, com maior compactação e espessamento das paredes dos vasos, e menor distinção entre xilema e floema;
- variações nas espessuras do mesofilo e epiderme.

Em relação ao caule, os tipos de respostas observadas à deficiência hídrica são as seguintes:

- desorganização da epiderme, tornando-se indistinta do córtex;
- as células do córtex tornam-se irregulares na forma e tamanho;
- formação de espaços intercelulares, embora menos frequentes que nas folhas;
- desorganização do cilindro vascular, apresentando maior compactação dos vasos e espeçamento de suas paredes; bem como, em alguns casos, apresentar-se de forma descontínua;
- desintegração da medula.

A utilização da cultura de tecidos como técnica para avaliação de respostas ao estresse hídrico mostrou ser eficiente e rápida, merecendo ser mais explorada e desenvolvida, indicando novas linhas de pesquisa e aplicações em anatomia ecológica, ecofisiologia, e, até mesmo, no estudo da evolução de estratégias adaptativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvear, C. S. & Gutiérrez, B. C. Crecimiento hasta los 42-44 meses de edad y estimación de parámetros genéticos de 23 procedencias e 196 famílias de *Eucalyptus camaldulensis* Denh. em cuatro sitios de la zona central de Chile. Ciência e Investigación Florestal v. 9 n.1, 1995.
- Barros N. F. *et al.* Relação Planta Solo, p. 6-10. Ed. Universidade Federal de Viçosa, 1990.
- Esau, K. Anatomia das plantas com sementes. Ed. Edgard Blucher Ltda., São Paulo, 1974.
- Farrell, R. C. C. *et al.* Morphological and physiological comparisons of clonal lines of *Eucalyptus camaldulensis*. I. Responses to Drought and Waterlogging. Australian Journal of Plant Physiology, **23**, 497-507, 1996.

- Gibson, A.; Bachelard, E. P. & Hubick, K. T. Growth strategies of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. at three sites in Northern Australia. Australian Journal of Plant Physiology, **21**, 653-62, 1994.
- Gibson, A. & Bachelard, E. P. Relationships between site characteristic and survival strategies of *Eucalyptus camaldulensis* seedlings. Australian Tree Species Research in China, p. 91-95, 1994.
- Gibson, A.; Bachelard, E. P. & Hubick, K. T. Relationship between climate and provenance variation in *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. Australian Journal of Plant Physiology **22**, 453-60, 1995.
- Johansen, D. A. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co., 1940.
- James, S. A. and Bell, D. T. Morphology and anatomy of leaves of *Eucalyptus camaldulensis* clones: variation between geographically separated locations. Australian Journal of Botany, **43**, 415-433, 1995.
- Levitt, J. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York, 1972.
- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, **15**, 473-97, 1962.
- Pereira, J. S. and Kozłowski, T. T. Leaf anatomy and water relations of *Eucalyptus camaldulensis* and *E. globulos* seedlings. Canadian Journal of Botany, **54**, 2868-2880, 1976.

**VARIAÇÕES DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS A
DEFICIÊNCIA HÍDRICA EM TRÊS PROCEDÊNCIAS DE *Eucalyptus*
camaldulensis cultivadas *in vitro****

Souza, G. M. **; Machado Neto, N. B.*** e Gonçalves, A. N.**

* **Departamento de Ciências Florestais ESALQ/USP, Piracicaba - SP

***Laboratório de Biotecnologia da UNOESTE, Presidente Prudente - SP

Resumo: Três procedências de *E. camaldulensis* foram submetidas a diferentes níveis de deficiência hídrica induzida *in vitro* e submetidas a análise de eletroforese de proteínas totais em gel de poliacrilamida. Foram identificadas duas proteínas de resposta a deficiência hídrica de 45 e 36 kDa, e constatou-se um aumento geral da síntese proteica entre as procedências em função da redução do potencial osmótico.

Palavras-chave: deficiência hídrica, *Eucalyptus camaldulensis*, proteínas, cultura de tecidos.

Abstract: Three *E. camaldulensis* provenances were submitted to different levels of *in vitro* induced water deficit, and evaluated in SDS-PAGE. Two proteins related to water deficit were determined. A rate between a general increase of protein synthesis and a reduction of osmotic potential was observed among the provenances.

Key-words: water deficit, *Eucalyptus camaldulensis*, proteins, tissue culture.

*Trabalho enviado para a revista *Scientia Forestalis*, Piracicaba

INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus camaldulensis* é uma espécie que ocorre em várias regiões climáticas australianas, mas predominantemente em regiões áridas e semi-áridas ao longo de córregos e rios que, com frequência, são sazonais. Desta forma, esta espécie apresenta mecanismos de adaptação a seca que, espera-se, varie entre as distintas procedências (Barros *et al.*, 1990).

Dentre os vários mecanismos de resposta ao estresse hídrico estão as alterações do metabolismo celular. Isto parece ser o resultado do acúmulo de solutos e de proteínas que podem ser rapidamente induzidas pelo estresse osmótico para prevenir a perda de água e reestabelecer a turgescência das células (Rhodes, 1987).

Em resposta ao estresse osmótico, as células da planta aumentam a expressão de alguns genes enquanto que, ao mesmo tempo, diminuem alguns outros (Zhu *et al.*, 1997). Alguns conjuntos de genes de resposta ao ABA estão relacionados a reações gerais de resposta ao estresse osmótico (Skriver e Mundy, 1990).

Singh *et al.* (1989) identificaram uma proteína de 24 kDa em tabaco, denominada osmotina, relacionada a adaptação ao estresse osmótico. Em 1995, Pelah *et al.* identificaram uma nova proteína de 66 kDa em *Populus tremula*, estável à ebulição, que se expressava em resposta a um gradual estresse hídrico.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foram utilizadas três diferentes procedências do *E. camaldulensis*: Gilbert River (semi-árido), St. Katherine (tropical seco) e Petford (tropical úmido).

Gemas obtidas de cultura *in vitro* foram submetidas a diferentes níveis de deficiência hídrica induzida pela adição de sorbitol em meio de cultura MS durante 20 dias. Os potenciais osmóticos testados foram de - 0.5 (controle), -0.75, - 1.5 e -3.0 MPa (Souza e Gonçalves, 1996, inédito).

Para a análise de proteínas totais 300 mg de material de cada tratamento foi macerado numa solução de extração na proporção 1:10 contendo 4 mL de TRIS-HCl pH 6-8, 1.6 mL de 2-mercaptoetanol, 6.4 mL de SDS 10%, 3.2 mL de DMSO 2%, 3.5 g de PVPP, 0.35 g de PMSF, 6.4 mL de glicerina, 10.4 mL de água deionizada. A mistura permaneceu em repouso por 1 h a temperatura ambiente, a seguir sendo mantida em ponto de ebulição por 3 minutos. A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm, o sobrenadante foi recolhido para a quantificação de proteínas de acordo com Bradford (1976) e para a eletroforese.

O extrato de proteínas foi separado em um gel de poliacrilamida (PAGE) com 20% de SDS durante 3 horas a 35 mA. Foram utilizados 50 µg de proteína por faixa de corrida.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade de proteínas totais sintetizadas mostrou uma tendência a aumentar em função da redução do potencial osmótico entre as três procedências (Tabela 1).

Tabela 1: Quantidade de proteínas totais (µg/50µL de amostra) em *E. camaldulensis* sob deficiência hídrica após 20 dias de cultivo *in vitro*.

Potencial osmótico (-MPa)	Gilbert River	St. Katherine	Peford	Médias entre os potenciais
0.5	61.2	67.6	61.3	63.37
0.75	68.6	65.5	65.3	66.47
1.5	68.3	66.5	71.7	68.83
3.0	73.5	69.7	71.9	71.70

Foram identificadas duas proteínas de resposta de 45 e 36 kDa sensíveis ao gradiente de deficiência hídrica nas três procedências. Entretanto, a expressão destas proteínas se dá de forma diferenciada entre as procedências (Figura 1).

Figura 1: Esquema do SDS-PAGE do *E. camaldulensis* sob deficiência hídrica (-MPa) *in vitro* após 20 dias de cultivo.

* legenda:

- intensidade baixa
- intensidade média
- intensidade alta

As proteínas expressaram-se de forma mais intensa primeiramente na procedência de Gilbert River logo no potencial osmótico de -0.75 MPa, o que pode corresponder a uma resposta adaptativa mais rápida uma vez que esta procedência é original de uma região onde a deficiência hídrica é frequente. Tal expressão se dá de forma mais clara nas procedências de Petford e St. Katherine apenas a partir do potencial osmótico de - 1.5 MPa. A expressão das proteínas tende a aumentar nos potenciais menores em Gilbert River e St. Katherine, enquanto que em Petford pode-se observar uma redução no potencial osmótico de -3.0 MPa.

Os resultados obtidos evidenciam que ocorrem variações no metabolismo entre distintas procedências de *E. camaldulensis* em relação aos diferentes níveis de deficiência hídrica, embora ocorra a presença da mesma proteína nas três procedências.

Bibliografia

- Barros, N. F. *et al.* *Eucalyptus camaldulensis*. In: Barros et al. Relação solo-planta. Viçosa: UFV, 1990. p. 6-10.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p.248-254, 1976.
- Pelah, D.; Shoseyov, O. e Altman, A. Characterization of BspA, a major boiling-stable, water-stress-responsive protein in aspen (*Populus tremula*). *Tree Physiology*, v. 15, p. 673-678, 1995.
- Rhodes, D. Metabolic responses to stress. In: Stumpf, P. K. e Conn, E. E. *The Biochemistry of Plants*. New York: Academic Press, 1987. p. 201-241.
- Singh, N. K. *et al.* Osmotin: A protein associated with osmotic stress adaptation in plant cells. In: Cherry, J. H. *Environmental Stress in Plants*. Berlin: Springer-Verlag, 1989. p. 67-85.
- Skriver, K. e Mundy, J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *The Plant Cell*, v. 2, p. 503-512, 1990.
- Zhu, J. K., Hasegawa, P. M. e Bressan, R. A. Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 16(3), p. 253-277, 1997.

Acúmulo Diferenciado de Açúcares Solúveis, Prolina e de Proteínas Relacionadas a Deficiência Hídrica em Plantas *in vitro* de *Eucalyptus camaldulensis**

Souza, G. M.**; Machado Neto, N. B.*** e Gonçalves, A. N.**

** Departamento de Ciências Florestais ESALQ/USP, Piracicaba - SP

***Laboratório de Biotecnologia da UNOESTE, Presidente Prudente - SP

Resumo: Plântulas de *E. camaldulensis* foram submetidas a deficiência hídrica induzida *in vitro*. As concentrações de açúcares solúveis e prolina foram medidas e apresentaram um gradiente de acúmulo em função da redução do potencial osmótico do meio de cultura. Detectou-se duas proteínas, de 45 e 36 kDa, relacionadas a deficiência hídrica.

Palavras-chave: deficiência hídrica, prolina, açúcares, proteínas, *Eucalyptus camaldulensis*, cultura de tecidos.

Abstract: (Differential accumulation of soluble sugars, proline and proteins related to water deficit in *Eucalyptus camaldulensis* seedlings *in vitro*) *E. camaldulensis* seedlings were submitted to *in vitro* water deficit. The amount of soluble sugars and proline were determined, and showed an accumulation gradient related to the osmotic potential reduction of the culture medium. Two proteins related to water deficit, of 45 and 36 kDa, were detected through of SDS-PAGE.

Key-words: water deficit, proline, sugars, proteins, *Eucalyptus camaldulensis*, tissue culture.

*Trabalho a ser enviado para a revista Tree Physiology

INTRODUÇÃO

A deficiência hídrica está associada a uma série de alterações de ordem morfológica e fisiológica no desenvolvimento de plantas. Entre as alterações fisiológicas, destacam-se a redução dos níveis de fotossíntese e transpiração devido ao fechamento dos

estômatos, acumulação de determinados metabólitos, e a redução da atividade de algumas enzimas como a peroxidase, catalase e amilases (Levitt, 1972).

O acúmulo diferenciado de certos metabólitos pode ser útil para uma melhor compreensão do fenômeno de resistência ao estresse hídrico, bem como servir de parâmetros para a seleção de cultivares. Pelah *et al.* (1995) identificaram uma proteína de 66 kDa (BspA), estável a ebulição, associada a resposta ao estresse hídrico em *Populus tremula*, anteriormente, Singh *et al.* (1989) identificaram em tabaco uma proteína de 24 kDa, denominada osmotina, também associada ao estresse hídrico.

O acúmulo de ABA (ácido abscísico) é uma resposta associada à deficiência hídrica interferindo na expressão gênica, no funcionamento dos estômatos e promovendo a queda de folhas como forma de diminuir as perdas de água pela planta (Skriver e Mundy, 1990; Gibson *et al.*, 1991).

O aumento da produção de açúcares solúveis é outra característica relacionada à deficiência hídrica como sugerem Jhonson *et al.* (1996) e Pelah *et al.* (1997).

Arora & Saradhi (1995) apontam que a acumulação de prolina aumenta a resistência de plantas a vários estresses, e resulta em uma maior fixação de carbono. Esta síntese de prolina pode estar relacionada a reações de fotoindução e/ou fotoinativação de enzimas associadas ao catabolismo da prolina.

O objetivo deste trabalho com *Eucalyptus camaldulensis* foi o de obter dados sobre possíveis alterações nas vias metabólicas associadas pela literatura à

deficiência hídrica, possibilitando um maior conhecimento sobre as formas de resistência desta espécie, sugerindo parâmetros para seleção de árvores.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *Eucalyptus camaldulensis* da região australiana de Gilbert River, foram esterilizadas em solução 2% de NaOCl comercial por 20 minutos, e inoculadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) para obtenção de “seedlings” axênicas.

Plântulas com aproximadamente 1 cm de altura foram submetidas a deficiência hídrica *in vitro* em meio de cultura MS com diferentes potenciais osmóticos (-0.5 como testemunha, -0.75, -1.5 e -3.0 MPa) induzidos por adição de diferentes concentrações de sorbitol (Souza e Gonçalves, não publicado). Após 20 dias de cultura, as plantas foram submetidas às avaliações bioquímicas.

Avaliação de proteínas totais

Para a extração de proteínas, 300 mg de material foi macerado numa solução de extração na proporção 1:10 contendo 4 mL de TRIS-HCl pH 6-8, 1.6 mL de 2-mercaptoetanol, 6.4 mL de SDS 10%, 3.2 mL de DMSO 2%, 3.5 g de PVPP, 0.35 g de PMSF, 6.4 mL de glicerina, 10.4 mL de água deionizada. A mistura permaneceu em repouso por 1 h a temperatura ambiente, a seguir sendo mantida em ponto de ebulição por 3 minutos. A mistura foi centrifugada a 10,000 rpm, o sobrenadante foi recolhido para a quantificação de proteínas de acordo com Bradford (1976) e eletroforese.

O extrato de proteínas foi separado em um gel de poliacrilamida (PAGE) com 20% de SDS durante 3 horas a 35 mA. Foi utilizado 50 µg de proteína por faixa de corrida.

Extração e análise de açúcares solúveis

Açúcares solúveis foram extraídos de quatro plantas por tratamento em solução de 80% de etanol. O extrato foi filtrado em Milipore de 20 μ m. Depois da evaporação os açúcares foram dissolvidos em água deionizada para posterior separação no sistema analítico HPLC de acordo com Pelah *et al.* (1997).

Avaliação de prolina

Para a extração de prolina, 500 mg de material por tratamento foi macerado em solução 3% de ácido sulfossalicílico e filtrado em Whatman. A determinação foi realizada de acordo com o método de Bates (1973). Dois mL do filtrado foi adicionado a 2 mL de niidrina-ácida e 2 mL de ácido acético glacial permanecendo por 1 hora a 100°C, a reação foi parada em banho de gelo. Foi acrescentado 4 mL de toluol com vigorosa agitação, sendo recolhido o sobrenadante para leitura de absorbância a 520 nm.

RESULTADOS

Análise de Proteínas Totais

Detectou-se a variação da expressão de duas bandas proteicas em resposta ao estresse induzido *in vitro* corroborando os dados obtidos com gemas por Souza *et al.* (1997, não publicado). As proteínas de 45 e 36 kDa apresentaram uma maior expressão nos potenciais osmóticos de -0.75 MPa e, principalmente em -3.0 MPa. Entretanto, encontram-se traços nos demais potenciais osmóticos (Figura 1).

Figura 1: Análise de SDS PAGE de *E. camaldulensis* sob estresse hídrico após 20 dias de cultivo *in vitro*, mostrando avariação das bandas de 45 e 36 kDa.

* legenda:

— intensidade baixa
 — intensidade média
 — intensidade alta

Avaliação de Prolina

Detectou-se um grande acúmulo de prolina em função do aumento da deficiência hídrica, principalmete a partir do potencial osmótico de -1.5 MPa, chegando a quintuplicar à -3.0 MPa (Figura 2).

Figura 2 : Acúmulo de prolina em *E. camaldulensis* sob estresse hídrico após 20 dias de cultivo *in vitro*.

Avaliação de açúcares solúveis

Os dados obtidos apontaram um constante acúmulo de frutose em relação a diminuição do potencial osmótico. Em relação a glicose, obteve-se um pequeno acúmulo entre -0.5 e -0.75 MPa, entretanto, a partir de -1.5 MPa não encontra-se mais traços deste açúcar. A partir de -1.5 MPa inicia-se um acúmulo de sacarose (Figura 3).

Figura 3 : Acúmulo de açúcares solúveis em *E. camaldulensis* sob estresse hídrico após 20 dias de cultivo *in vitro*.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos apontaram uma estreita relação entre a deficiência hídrica e desvios no metabolismo do *E. camaldulensis*, notoriamente em relação ao aumento de síntese de frutose, prolina e da variação da expressão de duas proteínas de 45 e 36 kDa, respectivamente.

Segundo Stewart (1978), a estimulação da síntese de prolina a partir do glutamato sugere a presença de altos níveis de carboidratos como precursores necessários como fontes de C e H. O suprimento e metabolismo de carboidratos disponíveis é essencial para o acúmulo de prolina, que tende a ser mais prolongado em folhas com alto conteúdo de açúcar e amido. A oxidação de açúcares fornece α -cetoglutarato e NAD(P)H para a síntese de prolina. O acúmulo de prolina também pode estar associado à diminuição da degradação da própria prolina. Suspeita-se que o N venha de outro amino ácido (via transaminação do

ácido glutâmico) que acumula como resultado da redução de síntese protéica e/ou proteólise

(Stewart *et al.*, 1966). Em cevada, há conversão de ornitina e arginina em prolina induzida por estresse hídrico, entretanto, apenas 1% do acúmulo de prolina deve-se a arginina. Assim, sugere-se que o acúmulo de prolina é devido a nova síntese a partir do ácido glutâmico, e não por resíduos de amino ácidos provenientes da degradação de proteínas (Boggess e Stewart, 1976 e Stewart, 1978), entretanto, em feijão a ornitina e arginina são precursores da prolina em adição ao glutamato (Stewart, 1978).

Outra possibilidade é que a concentração de compostos de N solúvel possam regular os níveis de prolina. Além disso, a seca, direta ou indiretamente, afeta a quantidade ou atividade de enzimas envolvidas na síntese e degradação da prolina. De qualquer forma, o acúmulo de prolina é um efeito secundário em resposta ao estresse hídrico (Stewart *et al.*, 1966).

O rápido e grande acúmulo de prolina em cevada e tabaco durante o estresse hídrico indica que uma retro-inibição da síntese de prolina sob estas circunstâncias é improvável (Boggess *et al.*, 1976). Sob estresse hídrico a oxidação da prolina é reduzida a taxas desprezíveis, este resultado é consistente com a idéia de que o acúmulo de prolina é resultado da inativação de seus mecanismos de controle normais, sendo a inibição de sua oxidação necessária para a manutenção de altos níveis de prolina (Stewart *et al.*, 1977).

Os resultados deste trabalho indicam que, uma vez que não se constatou redução da síntese de proteínas totais, o acúmulo de prolina em *E. camaldulensis* pode estar associado basicamente a oxidação da frutose 6-P como precursora da via do glutamato para a síntese de prolina.

Embora ocorra acúmulo de poliaminas sob estresse hídrico, sua importância como soluto osmótico é mínima em comparação a prolina e betaina (cevada) (Rhodes, 1987). A putrescina parece ser o caso mais comum de acúmulo de poliaminas, servindo como estoque de N, além disso, a pirrolina, que é precursora da prolina, é um

produto da degradação da putrescina (Tiburcio *et al.*, 1990). É possível que uma das proteínas sintetizadas induzidas pelo estresse seja a arginina descarboxilase, que esta envolvida com o acúmulo de putrescina (Rhodes, 1987).

Os solutos acumulados em plantas sob estresse hídrico parecem interagir e promover estabilidade às membranas plasmáticas e de organelas (Rhodes, 1987). A prolina pode ser considerada como uma boa forma de estoque de N, sendo um composto chave para seu metabolismo na conversão para ácido glutâmico, além de ser uma fonte viável de energia (Stewart *et al.*, 1966).

Em função dos resultados apresentados neste trabalho e das informações coletadas na literatura, propomos a seguinte via metabólica, com suas alternativas, para o acúmulo de prolina sob estresse hídrico representada pela Figura 5.

Figura 5 : Os passos de 1-6 representam a via glicolítica; passos 7-8 representam a síntese do α -cetoglutarato através do Ciclo do Ácido Cítrico; passo 9 é a síntese do glutamato; passos 10-12 representam a biosíntese dos amino ácidos da “família do glutamato”, em 12 ocorre uma redução da pirrolina-5-carboxilato formando NAD(P)+ originando prolina (os passos de 1-12 em negrito, retirados de Voet e Voet, 1990, representam a principal via de acúmulo de prolina proposta neste trabalho para o *E. camaldulensis*. Os passos de a1-a8 representam a simplificação da via alternativa proposta para o acúmulo de prolina segundo dados extraídos de Thompson, 1980; Tiburcio *et al.*, 1990; Rhodes, 1987; Stewart e Larher, 1980. (PEP = fosfoenolpiruvato, PGI = fosfoglicose isomerase, GSA = semialdeído glutâmico, ORN = ornitina, ARG = arginina, CIT = citrulina)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arora, S and P. P. Saradhi. 1995. Light-induced enhancement in proline levels in *Vigna radiata* exposed to environmental stresses. *Aust. J. Plant Physiol.* 22:383-386.
- Bates, L. S., R. P. Waldren and I. D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207.
- Bogges, S. F. and C. R. Stewart. 1976. Contribution of arginine to proline accumulation in water-stressed barley leaves. *Plant Physiol.* 58:796-797.
- Bogges, S. F., D. Aspinall and L. G. Paleg. 1976. Stress metabolism. IX. The significance of end-product inhibition of proline biosynthesis and compartmentation in relation to stress-induced proline accumulation. *Aust. J. Plant Physiol.* 3:513-525.
- Bradford, M. M. 1976 A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

- Gibson, A., K. T. Hubick and E. P. Bachelard. 1991. Effects of abscisic acid on morphological and physiological responses to water stress in *Eucalyptus camaldulensis* seedlings. Aust. J. Plant. Physiol. 18:153-163.
- Johnson, J. M., J. Pritchard, J. Gorham and A. D. Tomos. 1996. Growth, water relations and solute accumulation in osmotically stressed seedlings of the tropical tree *Colophospermum mopane*. Tree Physiol. 16:713-718.
- Levitt, J. 1972. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York, pp322-446.
- Pelah, D., O. Shoseyov and A. Altman. 1995. Characterization of BspA, a major boiling-stable, water-stress-responsive protein in aspen (*Populus tremula*). Tree Physiol. 15:673-678.
- Pelah, D., W. Wang, A. Altman, O. Shoseyov and D. Bartels. 1997. Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response. Physiol. Plantarum 99:153-159.
- Rhodes, D. 1987. Metabolic responses to stress. In The Biochemistry of Plants. Academic Press, New York 12:201-241.
- Singh, N. K., D. E. Nelson, P. C. LaRosa, C. E. Braker, A. K. Handa, P. M. Hasegawa and R. A. Bressan. 1989. Osmotin: A protein associated with osmotic stress adaptation in plant cells. In Environmental Stress in Plants. Edited by J. H. Cherry. NATO ASI Series, vol. G19. Springer-Verlag, Heidelberg pp67-85.
- Skriver, K. and J. Mundy. 1990. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. The Plant Cell 2:503-512.
- Stewart, C. R., C. J. Morris and J. F. Thompson. 1966. Changes in amino acid content of excised leaves during incubation II. Role of sugar in the accumulation of proline in wilted leaves. Plant. Physiol. 41:1585-1590.
- Stewart, C. R., S. F. Boggess, D. Aspinall and L. G. Paleg. 1977. Inhibition of proline oxidation by water stress. Plant Physiol. 59:930-932.

- Stewart, C. R. 1978. Role of carbohydrates in proline accumulation in wilted barley leaves. *Plant Physiol.* 61:775-778.
- Stewart, G. R. and F. Larher. 1980. Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. *In The Biochemistry of Plants.* Academic Press, New York 5:609-635.
- Thompson, J. F. 1980. Arginine synthesis, proline synthesis, and related processes. *In The Biochemistry of Plants.* Academic Press, New York 5:375-402.
- Tiburcio, A. F., R. Kaur-Sawhney and A. W. Galston. 1990. Polyamine metabolism. *In The Biochemistry of Plants.* Academic Press, New York 16:283-325.
- Voet, D. and J. G. Voet. 1990. *Biochemistry.* John Wiley and Sons, New York.

ENTROPIA, INFORMAÇÃO E ESTRESSE HÍDRICO EM *Eucalyptus camaldulensis in vitro**

Souza, G. M.**; Villa Nova, N. A.*** e Gonçalves, A. N.**

**Depto. de Ciências Florestais, ESALQ/USP, Piracicaba

***Depto. de Física e Meteorologia, ESALQ/USP, Piracicaba

Resumo: O presente trabalho objetivou estabelecer uma nova linha de estudo sobre desenvolvimento de plantas através da interpretação de seus estados entrópicos. Estes no *Eucalyptus camaldulensis*, cultivado *in vitro* em diferentes condições de deficiência hídrica, foram avaliados através de sua produção de matéria seca utilizando-se as funções de entropia de Clausius e Shannon. O material submetido à deficiência hídrica obedeceu ao segundo princípio da termodinâmica, comportando-se como uma estrutura dissipativa. A medida que houve um aumento na produção de entropia houve uma menor diferenciação dos tecidos foliares, ou seja, uma redução do nível de organização da planta.

Palavras-chave: entropia, informação, organização, *Eucalyptus camaldulensis*, cultura de tecidos, estresse hídrico.

Abstract: (Entropy, information, and water stress in *Eucalyptus camaldulensis in vitro*) This work purposed develop a new approach about the plant development through interpretation of yours entropic states. The *Eucalyptus camaldulensis* entropic states, *in vitro* cultivated under water deficit, were evaluated through dry matter production utilizing the Clausius and Shannon functions. The material under water deficit followed to second law of thermodynamics like a dissipative structure. Whereas the entropic production increased the leaves tissues differentiation decreased, this is, the plant organization reduction.

Keywords: entropy, information, organization, *Eucalyptus camaldulensis*, water stress, tissue culture.

*Trabalho enviado para a Revista Brasileira de Biologia.

Introdução

Este trabalho teve por objetivo principal introduzir os conceitos e idéias sobre entropia, informação, ordem e desordem ao estudo das influências de perturbações ambientais no controle homeostático de plantas, neste caso, referimo-nos ao estresse hídrico gerado por deficiência hídrica.

O termo entropia foi primeiramente usado por Clausius em 1865 para designar uma quantidade de calor não transformável em trabalho. O segundo princípio da termodinâmica nos diz que um sistema físico isolado evolui inevitavelmente para um estado de entropia máxima, que é atingido quando o sistema entra em equilíbrio termodinâmico (Atlan. 1992).

Ainda não há uma formalização única para entropia. De uma forma geral e intuitiva, a entropia refere-se ao nível de aleatoriedade de um sistema (Gatlin, 1972). Podemos considerar aqui, para fins de uma maior precisão de termos, três tipos relacionados entre si de entropia. A primeira, inaugurada por Clausius, diz respeito à termodinâmica macroscópica, estabelecida através do estudo de máquinas térmicas, cuja formulação matemática é dada por

$$\Delta S = \int dQ/T \quad [1]$$

onde Q é a quantidade de calor do sistema e T é a fonte de temperatura. A variação da produção de entropia é dada por

$$\Delta S = S_f - S_i \quad [2]$$

A termodinâmica microscópica foi definida estatisticamente por Boltzmann em 1872. Transformar calor em trabalho implica que se ordene o movimento desordenado das moléculas num movimento orientado, de forma que, em média, as

moléculas se desloquem numa mesma direção. Uma certa parcela de desordem molecular continuará a existir e se traduzirá em calor não utilizável de acordo com o segundo princípio da termodinâmica (Sears, 1958; Morowitz, 1978; Atlan, 1992).

Boltzmann mostrou a igualdade entre essa quantidade de calor não utilizável e uma medida do estado de desordem molecular baseada no estudo das probabilidades de encontrar todas as moléculas de uma amostra em seus diferentes estados possíveis. A formulação matemática que relaciona a mecânica estatística com a termodinâmica clássica é a expressão

$$S = -k \sum p_i \ln p_i \quad [3]$$

onde $-k$ é uma constante universal de proporcionalidade e p_i é a probabilidade individual de cada microestado. Para maior detalhamento ver Morowitz (1978) e Gatlin (1972).

Desta forma, em termodinâmica, desordem corresponde à uma distribuição totalmente aleatória de objetos que são dispostos de maneira estatisticamente homogênea; este estado corresponde ao de máxima entropia. Por outro lado, ordem implica numa heterogeneidade na distribuição de objetos, correspondendo à uma maior diversidade e menor redundância (Atlan, 1992).

A terceira forma de considerar entropia, a entropia informacional, desenvolveu-se a partir da teoria de informação de Shannon em 1948. O teorema H de Shannon corresponde à uma expressão matemática muito semelhante a da mecânica estatística

$$H = \sum p_i \log_k 1/p_i \quad [4]$$

a base k do logaritmo geralmente é binária, medindo a informação em bits. Entretanto também é utilizada a base e , medindo informação em unidades naturais ou nats. A entropia informacional mede a quantidade de incerteza na distribuição antes da amostragem e a quantidade de informação obtida pela amostragem (Roman, 1992).

Embora as duas formulações [3] e [4] sejam semelhantes, deveremos ter cuidado com a interpretação dos seus resultados, de um ponto de vista biológico. Em relação a [3], o aumento dos valores da entropia resultante indica uma diminuição da organização do sistema devido a maior proximidade do equilíbrio. Entretanto, em [4] o aumento dos valores da entropia, medido pela amostragem, significa maior quantidade de informação no sistema, ou seja, maior diversidade, maior organização.

Para que um sistema vivo possa se organizar ao longo de sua vida e manter-se assim, é necessário que se liberte da entropia por ele produzida através de seu metabolismo, assim um organismo vivo mantém-se por dissipação da entropia interna, aumentando a entropia do universo de acordo com o segundo princípio da termodinâmica. Desta forma, como considera Schrödinger (1943), “a vida alimenta-se de entropia negativa”.

É importante destacar que trabalhamos aqui com sistemas abertos (com trocas de matéria e energia com o meio) nos seus estados finais de equilíbrio estacionário, uma vez que tratamos de experimentos biológicos de forma destrutiva. Caso contrário, estaríamos tratando de sistemas em não-equilíbrio dinâmico, que é o caso dos sistemas orgânicos em vida, cujos tratamentos teóricos são infinitamente mais complexos (ver Nicolis e Prigogine, 1977).

A idéia de entropia informacional vem sendo empregada em biologia, considerando desde aspectos moleculares até evolutivos (Gatlin, 1972; Brooks e Wiley, 1988 e León, 1990).

De uma forma geral, entropia vem sendo empregada em estudos que visam compreender as formas de organização da matéria viva, haja visto os trabalhos de Roussel, 1974; Danchin, 1978; Briedis e Seagraves, 1984; Aoki, 1987 e Pearson *et al.*, 1991.

Material e Métodos

A parte experimental deste trabalho consistiu da utilização das técnicas de cultivo *in vitro* objetivando o melhor isolamento da variável de perturbação do sistema: a deficiência hídrica.

Para a montagem do experimento, foram empregadas grupos de gemas com cerca de 36 mg de matéria seca por grupo, provenientes de cultura *in vitro* de 5 progênes de *Eucalyptus camaldulensis*.

As condições constantes do experimento foram: meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) com 30% de sacarose e 5% de ágar, 2.000 lux de iluminância média, fotoperíodo de 16 horas e temperatura constante de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

A deficiência hídrica foi induzida pela adição de diferentes concentrações de sorbitol (100, 400 e 1000 mM) ao meio MS, gerando potenciais osmóticos em torno de -0.75, -1.5 e -3.0 MPa. O meio básico tem o potencial em torno de -0.5 MPa. Os potenciais osmóticos foram determinados de acordo com o método de Volume Constante (Salisbury e Ross, 1992).

Os grupos de gemas iniciais foram inoculados em tubos de ensaio com 10 mL de meio de cultura/tubo, dispostos lado-a-lado em um suporte para tubos, formando um conjunto com área superficial de exposição à luz de 3168 cm^2 .

O material permaneceu nestas condições durante 20 dias, quando foram medidas suas quantidades de matéria seca por tratamento/progênie.

- Cálculo da variação da produção de entropia

A produção de entropia foi calculada de acordo com as equações [1] e [2] apresentadas na introdução. A quantidade de calor Q das amostras foi estimada considerando-se o poder calorífico médio C da espécie em questão como sendo 4500 kcal/kg de matéria seca, de acordo com a expressão

$Q = C M$, onde M é quantidade de matéria seca média de cada progênie/tratamento.

Uma vez que a temperatura do experimento é constante, a equação [1] fica sendo

$$\Delta S = \int dQ / T = 1 / T \int dQ = Q / T$$

O valor da entropia inicial para todos os tratamentos é $S_i = 0.5 \text{ cal/}^\circ\text{K}$, uma vez que todos os tratamentos partiram de grupos de gemas com cerca de 36 mg de matéria seca.

- Cálculo da entropia informacional

A entropia informacional foi calculada de acordo com a equação de Shannon [4]. Como microestados foram considerados 3 tipos celulares que compõem os diferentes tecidos diferenciados presentes numa folha, a saber, células epidérmicas, células do parênquima paliádico e células do parênquima lacunoso. Para tanto, foram realizadas observações anatômicas de secções transversais de limbo foliar através da técnica de inclusão em historesina e microscopia óptica. A probabilidade p_i de cada tipo celular é 1/3.

- Cálculo da eficiência termodinâmica

Este cálculo visa criar uma medida do afastamento do equilíbrio termodinâmico em função da dissipação de energia, ou da eficiência fotossintética, dada pela expressão

$$\eta = Q / Q_t, \text{ onde } Q_t \text{ é a quantidade total de}$$

energia fornecida ao sistema.

Q_t é calculada pela expressão,

$Q_t = fp \ t \ E$, onde fp é o fotoperíodo, t é o tempo total de exposição à luz e E é a quantidade de energia luminosa em cal/min.

Para a determinação de E considerou-se que $100000 \text{ lux} \cong 1,5 \text{ cal/cm}^2 \text{ min.}$ e a área de recebimento de luz de cada suporte de tubos = 3168 cm^2 .

Resultados e Discussão

Os valores médios da variação da produção de entropia em cada potencial osmótico testado apresentaram um aumento entre -0.5 e -1.5 MPa, vindo a declinar entre -1.5 e -3.0 MPa, embora houvesse um aumento constante em duas progênes (Tabela 1).

A entropia informacional H , calculada em nats, reduziu-se constantemente em função do aumento da deficiência hídrica. Os valores de H nos potenciais osmóticos -0.5, -0.75, -1.5 e -3.0 MPa foram, respectivamente, 1.01, 0.92, 0.73 e 0.44 nats. As folhas no potencial osmótico de -0.5 MPa apresentaram sempre os três tipos celulares (Figura 1), no potencial de -0.75 MPa apresentaram em média 2.5 tipos celulares (Figura 2), no potencial de -1.5 MPa todas apresentaram 2 tipos celulares (Figura 3) e no potencial de -3.0 MPa apresentaram em média apenas 1.2 tipos celulares (Figura 4).

Os resultados mostraram que a eficiência termodinâmica, em média, aumentou em todas as progênes em função do aumento da deficiência hídrica até o potencial osmótico de -1.5 MPa, reduzindo-se em -3.0 MPa (Tabela 2).

Tabela 1. Variação da produção de entropia em cada progênie de *E. camaldulensis* em função do aumento da deficiência hídrica - ΔS (cal/°K)

- MPa	P1	P2	P3	P4	P5	médias
0.5	1.50	1.57	1.70	1.92	1.66	1.67±0.16
0.75	1.76	1.96	1.87	2.11	1.70	1.88±0.16
1.5	2.78	2.67	2.47	3.27	2.11	2.66±0.42
3.0	1.55	1.55	2.41	2.88	2.52	2.18±0.60

Tabela 2: Eficiência termodinâmica das progênies de *E. camaldulensis* em função do aumento da deficiência hídrica - $\eta\%$

- MPa	P1	P2	P3	P4	P5	médias
0.5	0.53	0.54	0.57	0.63	0.56	0.57± .039
0.75	0.60	0.64	0.62	0.68	0.57	0.62± .041
1.5	0.85	0.83	0.77	0.98	0.68	0.82± .110
3.0	0.53	0.90	0.76	0.88	0.79	0.77± .147

Figuras 1, 2, 3 e 4: Secções transversais de limbo foliar de *E. camaldulensis* sob deficiência hídrica *in vitro* (1. -0.5 MPa, 2. -0.75 MPa, 3. -1.5 MPa e 4. -3.0 MPa) = 157,8 μm

Figura 1

Figura 2

Figura 3

Figura 4

*(EP = células da epiderme; PP = células do parênquima paliçádico; PL = células do parênquima lacunoso; M = mesofilo) Na figura 2 há uma maior homogeneidade entre os três tipos celulares que na figura 1; na figura 3 o parênquima paliçádico não se diferenciou e na figura 4 todas as células apresentam forma semelhante.

Os resultados apresentados encontram-se em acordo com a teoria, visto que praticamente ocorreu uma relação inversa entre S e H , apontando para um estado de maior desordem do sistema em função do aumento da deficiência hídrica.

A eficiência termodinâmica, variando de 0.53 a 0.90 %, indica o quão afastado do equilíbrio termodinâmico o material necessita estar em vida para manter sua organização. Este dado indica que, para fins de produtividade, existe uma eficiência mínima e máxima que deve ser respeitada de maneira a possibilitar a própria sobrevivência da planta.

A medida em que se aumenta o desvio do equilíbrio termodinâmico, o sistema pode atravessar múltiplas zonas de instabilidade nas quais seu comportamento se modificará de maneira qualitativa. Ele poderá, sobre tudo, atingir um regime caótico onde várias possibilidades de organização se tornam possíveis (Prigogine e Stengers, 1992). Isto é, pequenas instabilidades e flutuações levam a bifurcações irreversíveis e a um aumento de complexidade do possível comportamento seguinte (Mainzer, 1994).

Segundo Aoki (1987) a produção de entropia em folhas de plantas oscila durante o período de um dia, paralelamente a energia da luz solar por elas absorvidas.

Deste modo, o presente trabalho procurou corroborar as idéias de que os organismos vivos, no caso específico o *E. camaldulensis*, mantêm sua estrutura por dissipação de entropia permanecendo distantes do equilíbrio termodinâmico. A medida que a dissipação torna-se ineficiente o organismo perece.

Além do mais, a nova teoria da complexidade, baseada em sistemas dinâmicos, nos diz que a descrição para sistemas abertos em vida só é adequadamente traduzida por análises não-lineares presentes na emergente teoria do caos. Tais sistemas são dotados de propriedades auto-organizadoras, ou seja, sistemas dissipativos que se organizam a partir de instabilidades nas trocas de energia e massa com o meio. Em forma breve, a auto-organização é resultado da condição de que a energia bombeada no sistema por uma fonte externa, em lugar de ser totalmente usada para gerar agitação térmica, é

parcialmente redirecionada para a produção de ordem (Luzzi e Vasconcelos, 1996; Capra, 1997).

Conclusões

- O *E. camaldulensis*, submetido à deficiência hídrica, aumenta sua produção de entropia interna até um limite de eficiência (-1.5 MPa);
- O *E. camaldulensis*, como todo o ser vivo, se comporta como uma estrutura dissipativa, mantendo sua organização por bombeamento de energia;
- A eficiência termodinâmica ideal para o material analisado encontra-se entre 0.57 e 0.62 %;
- A entropia informacional é um bom indicador para medir o nível de diferenciação dos tecidos da folha;
- A medida em que a produção de entropia aumenta há uma menor diferenciação celular;
- Diferentes formas de quantificar entropia são importantes para caracterizar o sistema do ponto de vista termodinâmico e holístico.

Agradecimentos

Agradecimentos à FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

- Aoki, I. 1987. Entropy budgets of deciduous plant leaves and a theorem of oscillating entropy production. *Bulletin of Mathematical Biology* **49(4)**: 449-460.
- Atlan, H. 1992. Entre o cristal e a fumaça: Ensaio sobre a organização do ser vivo. Jorge Zahar Editor, Rio de Janeiro.

- Briedis, D. e Seagraves, R. C. 1984. Energy tranformation and entropy production in living systems I. Applications to embrionic growth. *Journal of Theoretical Biology* **110**: 173-193.
- Brooks, D. R. e Wiley, E. O. 1988. *Evolution as entropy: Toward a unified theory of biology*. (2 nd. edition) University of Chigago Press, Chigago.
- Capra, F. 1997. *A teia da vida*. Editora Cultrix, São Paulo.
- Danchin, A. 1978. Entropie et ordre biologique. *La Recherche* **9(92)**: 788-791.
- Gatlin, L. L. 1972. *Information theory and the living system*. Columbia University Press, New York.
- León, A. 1990. Coevolution: New thermodynamic theorems. *Journal of Theoretical Biology* **147**: 205-212.
- Luzzi, R. e Vasconcelos, A. R. 1996. Estruturas dissipativas auto-organizadas: Um ponto de vista estatístico. *In*: Bebrun, M. *et al.* *Auto-organização: Estudos interdisciplinares*. CLE / UNICAMP, Campinas.
- Mainzer, K. 1994. *Thinking about complexity: The complex dynamics of matter, mind, and making*. Springer-Verlag, Berlin.
- Morowitz, H. J. 1978. *Entropia para Biólogos: Introducción a la termodinámica biológica*. H. Blume Ediciones, Madrid.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays tabacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**:473-97.
- Nicolis, G. e Prigogine, I. 1977. *Self-organization in nonequilibrium systems: From dissipative structures to order through fluctuations*. Jonh Wiley & Sons, New York.
- Pearson, S. D.; Ackerman, R. A. e Seagrave, R. C. 1991. The energetics of embryonic growth and development. I. Oxygen consumption, biomass growth, and heat production. *Journal of Theoretical Biology* **151**: 223-240.

- Prigogine, I. Stengers, E. 1992. Entre o tempo e a eternidade. Companhia das Letras, São Paulo.
- Roman, S. 1992. Coding and information theory. Graduate Texts in Mathematics, Springer-Verlag, New York.
- Roussel, L. 1974. Entropie, sylviculture et écologie. Revue Forestier Française **26(2)**: 130-134.
- Salisbury, F. B. e Ross, C. W. 1992. Plant Physiology. (4^a ed.) Wadsworth Publishing Co., Belmont.
- Schrödinger, E. 1943. O que é a vida? Editorial Fragmentos Ltda., Lisboa.
- Sears, F. W. 1958. Introducción a la termodinámica, teoría cinética de los gases y mecánica estadística. Editorial Reverté S.A., Barcelona.

CONCLUSÕES GERAIS

1) O ponto crítico de potencial osmótico para esta espécie cultivada *in vitro* encontra-se próximo de - 1.5 MPa.

2) O *E. camaldulensis* possui uma série de mecanismos de resposta a deficiência hídrica indo desde alterações conformacionais até desvios do metabolismo :

- a) redução e/ou parada do crescimento em altura;
- b) aumento da produção de matéria seca até um ponto crítico;
- c) menor diferenciação dos tecidos;
- d) espessamento e adensamento dos vasos condutores;
- e) colapso celular;
- f) acúmulo de reservas de carbono na forma de açúcares solúveis;
- g) acúmulo de reservas de nitrogênio na forma de prolina;
- h) aumento da síntese de proteínas totais;
- i) síntese diferencial de proteínas.

3) O *E. camaldulensis*, como todo o ser vivo, se comporta como uma estrutura dissipativa, mantendo sua organização por bombeamento de energia.

4) A eficiência termodinâmica ideal para o material analisado encontra-se entre 0.57 e 0.62 %.

5) A entropia informacional é um bom indicador para medir o nível de diferenciação dos tecidos da folha.

6) A medida em que a produção de entropia aumenta há uma menor diferenciação celular.

7) Diferentes formas de quantificar entropia são importantes para caracterizar o sistema do ponto de vista termodinâmico e sistêmico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVEAR, C. S. & GUTIÉRREZ, B. C. Crecimiento hasta los 42-44 meses de edad y estimación de parámetros genéticos de 23 procedencias e 196 famílias de *Eucalyptus camaldulensis* Denh. em cuatro sitios de la zona central de Chile. **Ciência e Investigación Florestal** v. 9 n.1, p. 23-47, 1995.
- ARORA, S. & SARADHI, P. Light-induced enhancement in proline levels in *Vigna radiata* exposed to environmental stress. **Australian Journal of Plant Physiology**, V.22, p.383-386, 1995.
- BARROS N. F.; NOVAIS, R. F.; CARDOSO, J. R. & MACEDO, P. R. O. **Relação Planta Solo**. Ed. Universidade Federal de Viçosa, 1990. p. 6-10
- BARTLE, J. R. & SHEA, S. R. Selection of tree species for rehabilitation of degraded areas in the northern jarrah forest. Rehabilitation of Mined Lands in Western Australia : **Proceedings of a Meeting Held in Perth on 11th October, 1978**.
- BELL, D. T. et al. Comparisons of selected and cloned plantlet against seedlings for rehabilitation of saline and waterlogged discharge zones in Australian agricultural catchments. **Australian-Forest**, v.57, n.2, p.69-75, 1994.
- BIROT, Y. & GALABERT, J. Bioclimatology and water dynamics in a Eucalyptus plantation. Centre Technique Forestier Tropical, Centre Niger/Haute-Volte, 1970.
- BLAKE, T.; BEVILACQUA, E. & BARBOSA, M. de M. Early selection of fast-growing Eucalyptus clones and species. **IPEF**, v.40, p.5-13, 1988.
- BLAKE, T. J. & SUITER-FILHO, W. Drought tolerance, growth partitioning and vigor in eucalypt seedlings and rooted cuttings. **Tree Physiology**, v.4, n.4, p. 325-335, 1988.

- BOWEN, M. R. Selection and adaptation of trees for plantations use diverse ecosystems. Consultant's Report ICD/UNDP/ETH, 1985.
- CATIE - Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Proyecto Diseminación del Cultivo de Árboles de Uso Múltiple, Colección Materiales de Extensión, 1994.
- CORREIA, D. Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus spp in vitro* em meio de cultura líquido e sólido. ESALQ/USP, 1993. (tese-mestrado)
- DOLEY, D. Water relations of *Eucalyptus marginata* Sm. under natural conditions. **Journal Ecology**, v.55, n.3, p.597-614, 1967.
- BLANCAFLOR, E. B. & HASENSTEIN, K. H. Growth and microtubule orientation of Zea mays roots subject to osmotic stress. **International Journal of Plant Sciences**, v.156, n.6, p.774-83, 1995.
- FAÇANHA, J. G. V. et al. Relação germinação/crescimento em espécies de Eucalipto submetidas a estresse hídrico. **Revista Árvore**, v.7, n.2, p.177-87, 1983.
- FARREL, R. C. C. et al. Morphological and physiological comparisons of clonal lines of *Eucalyptus camaldulensis*. I. Responses to drought and waterlogging. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.23, p.497-507, 1996.
- FRANKS, P. J.; GIBSON, A. & BACHELARD, E. P. Xylem permeability and embolism susceptibility in seedlings of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. from two different climatic zones. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.22, p.15-21, 1995.
- FOX, J. E. D.; NEILSEN, J. R. & OSBORNE, J. M. Eucalyptus seedling growth and salt tolerance from north-eastern goldfields of Western Australia. **Journal of Arids Enviroment**, v.19, n.1, p.45-53, 1990.

- GIBSON, A.; HUBICK, K. T. & BACHELARD, E. P. Effectes of abscisic acid on morphological and physiological responses to water stress in *Eucalyptus camaldulensis* seedlings. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.153-63, 1991.
- GIBSON, A.; BACHELARD, E. P. & HUBICK, K. T. Growth strategies of *Eucaliptus camaldulensis* Dehnh. at three sites in Northern Australia. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.21, p.653-62, 1994.
- GIBSON, A.; BACHELARD, E. P. & HUBICK, K. T. relationship between climate and provenance variation in *Eucaliptus camaldulensis* Dehnh. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.22, p.453-60, 1995.
- GOLFARI, L.; CASER, R. L. & MOURA, V. P. G. Ecological zoning scheme for afforestation in Brazil. Second Approximation. **FAO Report**, n. 45, 1978.
- HSIAO, T. C. et al. Stress Metabolism - Water stress, growth and osmotic adjustment. **Philosophical Transactions of Royal Society of London B**. 273, v.479, 1976.
- JAMES, S. A. & BELL, D. T. Morphology and anatomy of leaves of *Eucalyptus camaldulensis* clones: variation between geographically separated locations. **Australian Journal of Botany**, v.43, p.415-433, 1995.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. McGranhill Bood Co, New York, 1940.
- LADIGES, P. Y. Variation in drought tolerance in *Eucalyptus viminalis* Labill. **Australian Journal of Botany**, v.22, n.3, p.489-500, 1974.
- LADIGES, P. Y. Some aspects of tissue water relations in three populations of *Eucalyptus viminalis* Labill. **New Phytologist**, v.75, n.1, p.53-62, 1975.
- LENCOFF, J. H. & GHERSA, C. M. Osmotic adjustment and its use as a selection criterion in *Eucalyptus* seedlings. **Canadian Journal of Forestry Research**, v. 24, p. 2404-8, 1994.

- LEVITT, J. **Responses of Plants to Enviromental Stresses**. Academic Press, New York, 1972. p. 1-8 e p. 321-446.
- LI, W. L.; BERLYM, G. P. & ASHTON, P. M. Polyploids and their structural and physiological characteristics relative to water deficit in *Betula papyrifera*. **American Journal of Botany** v.83, n.1, p.15-20, 1996.
- LUBRANO, L. & TARSIA, N. Preliminary studies on the drought resistance of *Eucalyptus viminalis* and *E. camaldulensis* seedlings. **Pubblicazione del Centro di Sperimentazione Agricola e Forestale**, v.12, n.7, p.105-117, 1973.
- MATZNER, S. L. & RICHARDS, J. H. Sagebrush (*Artemisia tridentata*) roots maintain nutrient uptake capacity under water stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 301, 1996.
- METCALFE, J. F.; DAVIES, W. J. & PEREIRA, J. S. Leaf growth of *Eucalyptus globulus* seedlings under water deficit. **Tree Physiology**, v.2, p.221-27, 1990.
- MOEZEL van der, P. G. et al. The Response of Six Eucalyptus Species and *Casuarina obesa* to the Combined Effect of Salinity and Waterlogging. **Australian Journal of Plant Physiology**. v.15, p.465-74, 1988.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-97, 1962.
- NAMBIAR, E. K. S. Manegement of forests under nutrient and water stress. **Water, Air, and Soil Pollution** v.54, p.209-230, 1990/91.
- NICCOL, R. J.; REGAN, P. A. & De FILIPPIS, L. F. Simplified protocol for the micropropagation of selected *Eucalyptus* and *Banksia* species. **Australian Forestry**, v.57, n.4, p.143-47, 1994.

- OSORIO, J. & PEREIRA, J. S. Drought effects on productivity, water use efficiency and ^{13}C discrimination in *Eucalyptus globulus* clones. **Agricoltura Ricerca**, v.15, n.146, p.13-14, 1993.
- OSORIO, J. & PEREIRA, J. S. Genotypic differences in water use efficiency and ^{13}C *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, v.14, n.7/9, p.871-82, 1994.
- PATON, D. M. Frost resistance in *Eucalyptus*: a new method for assessment of frost injury in altitudinal provenances of *E. viminalis*. **Australian Journal of Botany**, v.20, n.2, p.127-39, 1972.
- PELAH, D.; SHOSEYOV, O. & ALTMAN, A. Characterization of BspA, a major boiling-protein, water-stress-responsive protein in aspen (*Populus tremula*). **Tree Physiology**, v.15, p.673-678, 1995.
- PELAH, D. *et al.* Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response. **Physiologia Plantarum** v.99, p.153-159, 1997.
- POOK, E. W. Canopy dynamics of *Eucalyptus maculata* Hook. III Effects of drought. **Australian Journal of Botany**, v.35, n.1, p. 65-79, 1985.
- POUPON, H. Preliminary studies on the water relations of leaves of *Eucalyptus camaldulensis* in Tunisia. **Annals of Institute of Nature Research Forestry**. Tunisia, 1968.
- PRYOR, L. D. The selection of *Eucalyptus* for regeneration. **Appita**, v.26, n.1, p.35-38, 1972.
- QURASHI, M. A. & KRAMER, P. J. Water stress in three species of *Eucalyptus*. **Forestry Sciences**, v.16, n.1, p.74-78, 1970.
- REIS, G. G. & HALL, A. E. Resposta de brotações de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. submetidos a diferentes níveis de deficiência hídrica. **Revista Árvore**, v.10, n.1, p.16-26, 1986.
- SALISBURY, F. B. & ROSS, C. **Plant Physiology**. Wadsworth Publishing Company, Belmont, 1969. p. 53-77.

- SANDS, R. Salt Resistance in *Eucalyptus caaldulensis* Dehn. from Three Different Seed Sources. **Australian Forestry Research**, v.11, p.93-100, 1981.
- SERÔDIO, M. I. & NOVAIS, M. C. Nutrientes, fotossíntese e crescimento de trigo em condições de alagamento de solo. **Revista Brasileira de Botânica**, v.14, p.97-101, 1991.
- SCHONAU, A. P. G. Silvicultural considerations for high productivity of *Eucalyptus grandis*. **Forest Ecology and management**, v.9, n.4, p.295-314, 1984.
- SINGH, D. E. *et al.* Osmotin : a protein associated with osmotic stress adaptation in plant cells. NATO ASI Series, v.G19; **Environmental Stress in Plants** p. 67-87, Ed. Springer-Verlag, 1989.
- SINHA, R. K. Taming the Thar desert of Rajasthan, India. **Desertification Control Bulletin**, v.22, p.31-35, 1993.
- TANGUILIG, V. C. *et al.* Water stress effects on leaf elongation, leaf water potential, transpiration, and nutrient uptake to rice, maize and soybean. **Plant and Soil**, v.103, p.155-68, 1987.
- WHITE, D. A.; BEADLE, C. L. & WORLEDGE, D. Leaf water relations of *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*: seasonal, drought and species effects. **Tree Physiology**, v. 16, p. 469-76, 1996.