

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL

MIRELI MOURA PITZ FLORIANI

RELAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO FRIO DE *Eucalyptus spp.* COM A
CONCENTRAÇÃO FOLIAR DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS TOTAIS
E PROLINA

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal

Orientador: Cristiano André Steffens
Co-orientador: Cassandro Vidal T. do Amarante
Co-orientador: Djalma Miler Chaves

LAGES – SC

2009

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Floriani, Mireli Moura Pitz

Relação da tolerância ao frio de *Eucalyptus spp.* com a
concentração foliar de carboidratos solúveis totais e prolina. /

Mireli Moura Pitz Floriani. -- Lages, 2009.

55 p.

Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências
Agroveterinárias / UDESC.

1. Eucalipto. 2. Plantas – Resistência as geadas.
3. Carboidratos 4. Prolina. I. Título.

CDD – 634.97342

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS
MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL

RELAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO FRIO DE *Eucalyptus spp.* COM A
CONCENTRAÇÃO FOLIAR DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS TOTAIS
E PROLINA

Mireli Moura Pitz Floriani
Bióloga

Aprovado em:/...../.....

Homologado em:/...../.....

Banca Examinadora:

Dr. Cristiano André Steffens
Orientador – UDESC/Lages – SC

Dr. Jefferson Luis Meirelles Coimbra
Coordenador Técnico do Curso de Mestrado
em Produção Vegetal – UDESC/Lages – SC

Ph.D Djalma Miler Chaves
Co-orientador – Departamento de Pesquisa
Florestal KLABIN S.A.
Telêmaco Borba – PR

Dr. Paulo Cezar Cassol
Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Ciências Agrárias

Dra. Luciana Magda de Oliveira
UDESC/Lages - SC

Dr. Adil Knackfuss Vaz
Diretor Geral do Centro de Ciências
Agroveterinárias – UDESC/Lages - SC

A todas as pessoas que lutam por um ideal, sem fracassar nem desanimar diante dos obstáculos. Que fazem das pedras no caminho, degraus para chegar mais cedo ao alcance de suas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradecer a todos que ajudaram a construir esta dissertação não é tarefa fácil. O maior perigo que se coloca para o agradecimento seletivo não é decidir quem incluir, mas decidir quem não mencionar.

Agradeço a Deus em primeiro lugar e em seguida aos meus pais, por terem sido o contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores. As minhas irmãs: Danieli e Daiane. Ao meu marido, Fábio, meu companheiro nesta trajetória, soube compreender, como ninguém, a fase pela qual eu estava passando. Em especial a minha filha Carolina que está a caminho e me acompanhou intensamente na finalização desta dissertação.

A excelência profissional do meu orientador, Dr. Cristiano André Steffens que conferiu prestígio e valor a meu trabalho de mestrado, o interesse e boa vontade que me atendeu em qualquer hora ou dia da semana. Agradeço ao professor Cristiano a consideração de ter aceitado a orientação de minha dissertação, na esperança de retribuir, com a seriedade de meu trabalho, a confiança em mim depositada.

Ao meu Co-orientador, Dr. Djalma Miler Chaves, da mesma forma conferiu prestígio e valor a minha dissertação, a quem admiro muito pela experiência que trazem seus cabelos brancos, pelo incentivo prestado, mostrando o caminho para a realização deste trabalho, acreditando no meu potencial e capacidade de realização.

E sem deixar de mencionar a contribuição do Co-orientador, Dr. Cassandro Vidal do Amarante, o primeiro contato dentro da UDESC (Universidade do Estado de Santa Catarina), com quem conversei várias horas sobre a idéia do projeto de mestrado e que mesmo longe manteve-se atento aos passos dessa jornada.

Agradeço principalmente a Klabin S.A. pela oportunidade e o patrocínio concedido durante os anos do curso e todos os profissionais envolvidos, que deram suporte as minhas ausências sem medir esforços para que pudesse concluir satisfatoriamente os resultados.

Agradeço também, ao coordenador do Departamento de Produção Vegetal, da UDESC (Universidade do Estado de Santa Catarina), e com ele todos os demais professores do mestrado que contribuíram para minha formação.

Não poderia deixar de citar, de forma alguma os bolsistas que me acompanharam nesta jornada, contribuindo efetivamente para a realização das análises em laboratório: Maitê, Thiago, Juliana, Odimar, Bruno e Hélio.

E sem esquecer da importância das amizades feitas nesta jornada, dos novos amigos que encontrei e que não esquecerei, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar a tolerância à baixa temperatura (LT₅₀) em mudas das espécies de *Eucalyptus dunnii* Maiden, *E. benthamii* Maiden & Cambage, *E. grandis* W. Hill ex Maiden e *E. saligna* Sm., submetidas a diferentes períodos de rustificação, usando como indicadores de tolerância ao frio os teores foliares de carboidratos solúveis totais e prolina. Foram realizados dois experimentos, usando-se o delineamento experimental blocos ao acaso, no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. No primeiro experimento, mudas de *Eucalyptus dunnii* (clone K-1007) foram submetidas a diferentes períodos de rustificação (0, 7, 21 e 42 dias) e após cada período de rustificação as mudas foram expostas a quatro gradientes de temperatura negativa (-2,-4,-6 e -8°C). No segundo experimento, mudas das espécies de *E. dunnii* (clone KF 09), *E. benthamii* (clone ARV 116), *E. grandis* (clone 360) e *E. saligna* (clone 2864) foram submetidos a dois períodos de rustificação (0 e 21 dias), sendo que após cada período de rustificação as mudas foram expostas a três gradientes de temperatura negativa (-2,-5 e -8°C). Em ambos os experimentos a rustificação foi realizada sob um regime de temperaturas diurnas e noturnas de 1°C e 5°C, respectivamente, com fotoperíodo de 12 horas. Foram avaliadas as concentrações foliares de carboidratos solúveis totais e de prolina, o LT₅₀, através da condutividade elétrica, e o índice de dano. Os dados foram submetidos à análise da variância e após a análise de regressão linear, teste de correlação de Pearson e, no experimento 2, também ao teste de Tukey (p<0,05). Os dados obtidos no primeiro experimento, com *E. dunnii*, demonstram que ocorreu um aumento na tolerância desta espécie a baixas temperaturas observando-se um incremento nos teores foliares de carboidratos solúveis totais até 35 dias de rustificação. Também foi observado que existe uma relação entre a tolerância ao frio e o incremento nos teores foliares de carboidratos solúveis totais. No segundo experimento, houve diferenças entre espécies quanto à tolerância ao frio, sendo que as espécies *E. dunnii* e *E. benthamii* apresentaram maior tolerância ao frio seguido das espécies *E. saligna* e *E. grandis*. No entanto, em todas as espécies estudadas foi observada uma maior tolerância ao frio (menor LT₅₀) das plantas submetidas à rustificação e que esta tolerância está associada ao incremento nos teores foliares de carboidratos solúveis totais. A presença de prolina nos tecidos foliares foi identificada apenas nas plantas de *E. dunnii* do primeiro experimento e não houve alteração na concentração com o aumento do período de rustificação. Em ambos os experimentos não foi observada correlação entre os teores foliares de prolina com a tolerância ao frio. Conclui-se que o aumento da tolerância ao frio de espécies de *Eucalyptus*, em resposta à rustificação das plantas, deve-se em grande parte ao incremento nos teores foliares de carboidratos solúveis totais e não aos teores foliares de prolina.

Palavras-chave: *Eucalyptus*. Resistência ao frio. Carboidratos Solúveis Totais. Prolina. LT₅₀.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the tolerance of *Eucalyptus dunnii* Maiden, *E. benthamii* Maiden & Cambage, *E. grandis* W. Hill ex Maiden e *E. saligna* Sm., to low temperature (LT₅₀) of seedlings when submitted to different rustification periods, using as cold tolerance indicators the contents of total soluble carbohydrates and proline in the leaves. The work was carried out in the Plant Physiology Laboratory of the Agricultural and Veterinary Sciences Center of the University of Santa Catarina State – UDESC. Two experiments were performed using a randomized block design. On the first experiment, (clone K-1007) *Eucalyptus dunnii* seedlings were submitted to different periods rustification (0,7,21 and 42 days) and after each rustification period, the seedlings were exposed to different sub-zero temperatures (-2°, -4°, -6° and -8°C). On the second experiment, seedlings of species *Eucalyptus dunnii* (clone KF 09), *E. benthamii* (clone ARV 116), *E. grandis* (clone 360) and *E. saligna* (clone 2864) were submitted to two rustification periods (0 and 21 days) and after each rustification period, the seedlings were exposed to three sub-zero temperatures (-2°, -5° and -8°C). In both experiments the rustification was performed under a regime of daily and night temperatures of 1°C and 5°C, respectively, with photoperiod of 12h. Were evaluated the concentrations of total soluble carbohydrates and proline in the leaves, the LT₅₀, the electric conductivity, and the damage index. The data were submitted to analysis of variance followed by the linear regression analysis, Pearson's correlation and in the experiment 2, as well as, to the Test of Tukey (p<0.05). The data obtained on the first experiment with *E. dunnii*, showed an increase in the tolerance of this species to low temperatures with the increase of leaf contents of total soluble carbohydrates when submitted to a rustification period up to 35 days. It was also observed that there is a relationship between the cold tolerance and the increase of leaf total soluble carbohydrates. On the second experiment, differences were observed between the species regarding to the cold tolerance. The *E. dunnii* and *E. benthamii* presented a higher cold tolerance followed by the *E. saligna* and *E. grandis*. However, in all the species studied, it was observed a good relationship between to cold tolerance (lower LT₅₀) with the rustification period and that tolerance was correlated to the increase in the leaf contents of total soluble carbohydrates. The presence of proline in the leaf tissues was found only in the plants of *E. dunnii* on first experiment and there was no increase within the rustification period. In both experiments it was not observed any relationship between the leaf proline content and cold tolerance. It was concluded that the increase of cold tolerance of eucalyptus species, in response to low temperature of the plants, was mostly due to the increase of total soluble carbohydrates in leaf contents, rather than to the leaf proline contents.

Keywords: Eucalyptus. Cold Hardening. Total Soluble Carbohydrates. Proline. LT₅₀.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Corte dos discos foliares de *Eucalyptus dunnii* com perfurador de rolha (A), para posterior determinação de condutividade elétrica (B).....22
- Figura 2 - Congelamento das amostras de folhas em nitrogênio líquido (A) para posterior armazenamento (B).....23
- Figura 3 - Pigmentos no fundo do tubo e carboidratos dissolvidos em meio aquoso (fase aquosa superior).....24
- Figura 4 - Líquido sobrenadante após centrifugação da amostra (A) e separação das fases após adição de tolueno (B).....25
- Figura 5 - Concentração foliar de carboidratos solúveis totais (mg g⁻¹) em *Eucalyptus dunnii* em resposta a rustificação.....26
- Figura 6 - Relação do percentual de dano (%) em *Eucalyptus dunnii* submetidos a diferentes gradientes de temperaturas abaixo de zero (°C) e períodos de rustificação.....28
- Figura 7 - Correlação entre LT50 (°C) e concentrações de carboidratos solúveis totais (mg g⁻¹) em *Eucalyptus dunnii* submetidos a quatro períodos de rustificação30
- Figura 8 - Correlação entre LT50 (°C) e concentrações de carboidratos solúveis totais (mg g⁻¹) em *Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus benthamii*, *Eucalyptus saligna* e *Eucalyptus grandis* submetidos a dois períodos de rustificação.....45
- Figura 9 - Relação do índice de dano (°C) em *Eucalyptus benthamii* (A), *Eucalyptus dunnii* (B), *Eucalyptus saligna* (C) e *Eucalyptus grandis* (D) submetidos a diferentes gradientes de temperaturas abaixo de zero (°C) e períodos de rustificação47

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Temperaturas de LT_{50} (°C) em função de diferentes períodos de rustificação (dias de exposição) das mudas de *Eucalyptus dunnii* a temperaturas diurnas de 5°C e noturnas de 1°C.....28
- Tabela 2 - Concentração foliar de carboidratos solúveis totais ($mg\ g^{-1}$) e LT_{50} (°C) em quatro espécies de *Eucalyptus* submetidas a dois períodos de rustificação.....43
- Tabela 3 - Índice de dano das espécies de *Eucalyptus benthamii*, *Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna*46

LISTA DE ABREVIACÕES

CV	Coefficiente de Variação
CEPA	Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola
CE	Condutividade Elétrica
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FTE BR 12	Fried trace elements – micronutrientes
LT₅₀	Temperatura Letal onde ocorre 50% da morte celular
MAP	Mono-amônio fosfato
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
1 RUSTIFICAÇÃO DE PLANTAS DE <i>EUCALYPTUS DUNNII</i> MAIDEN E A RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS TOTAIS E DE PROLINA FOLIAR E A TOLERÂNCIA AO FRIO.....	17
1.1 RESUMO.....	17
1.2 ABSTRACT.....	18
1.3 INTRODUÇÃO.....	18
1.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
1.4.1 Determinação de LT ₅₀ através da condutividade elétrica (CE).....	21
1.4.2 Determinação de Carboidratos Solúveis Totais.....	22
1.4.3 Determinação de Prolina.....	24
1.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
1.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
1.7 CONCLUSÕES.....	32
2 COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES FOLIARES DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS TOTAIS E DE PROLINA EM DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>EUCALYPTUS</i> E SUAS RELAÇÕES COM A TOLERÂNCIA AO FRIO.....	33
2.1 RESUMO.....	33
2.2 ABSTRACT.....	34
2.3 INTRODUÇÃO.....	35
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.4.1 Determinação de LT ₅₀ através da condutividade elétrica (CE) e índice de dano.....	39

2.4.2 Determinação de Carboidratos Solúveis Totais.....	40
2.4.3 Determinação de Prolina.....	41
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	41
2.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
2.7 CONCLUSÕES.....	49
CONCLUSÕES GERAIS.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

INTRODUÇÃO

Em função das condições climáticas no Brasil e da tecnologia desenvolvida pelas empresas e instituições de pesquisa, o setor florestal apresenta grande competitividade, com significativa contribuição na economia do País, representando aproximadamente 4,5% do PIB e 6,3% das exportações nacionais, ocupando uma área de apenas 0,67% do território nacional. Além disso, gera cerca de 4,1 milhões de empregos diretos e indiretos (Alves et al., 2006), uma receita anual de R\$ 20 bilhões contribuindo anualmente com R\$ 3 bilhões de impostos (Barcellos et al., 2005). Atualmente, o setor conta com aproximadamente 3 milhões de hectares de florestas plantadas com *Eucalyptus spp.*, em todo o Brasil, sendo Minas Gerais o estado com maior área plantada, aproximadamente 1,6 milhões de hectares (Couto et al., 2004).

Em Santa Catarina, a vocação florestal é extremamente forte e a economia é voltada para o setor florestal, possibilitando a presença de empresas florestais de grande porte. Segundo dados Cepa/Epagri (2008), a silvicultura catarinense ocupa 6,0% do território do Estado, participando com 9,0% do valor bruto da produção do setor agropecuário. A indústria de base florestal responde por mais de 15,0% do valor da transformação industrial do Estado. No entanto, especialmente na região do Planalto, o cultivo de *Eucalyptus spp.*, sofre severos danos ocasionados por geadas severas durante o inverno

Desta forma, o desafio da região e, conseqüentemente, da área florestal é a busca constante, através de pesquisas, de material genético adequado de espécies que, dentre outras características desejáveis, apresentem tolerância ao frio.

O gênero *Eucalyptus* possui grande plasticidade, crescendo satisfatoriamente em uma grande diversidade de condições edafoclimáticas, pois as espécies deste gênero possuem grande variabilidade na adaptação a condições de estresse como frio, salinidade e déficit hídrico (Alberdi e Corcuera, 1991; Nilsen e Orcutt, 1996). O processo de escolha de espécies de *Eucalyptus*, potencialmente aptas para plantio no Brasil tem se baseado, primeiramente, em critérios climáticos (Barros e Novais, 1990). No entanto, o desenvolvimento da eucaliptocultura em regiões do Sul do Brasil, onde ocorrem geadas freqüentes, como o Planalto Catarinense, vem encontrando dificuldades, diante da baixa tolerância às geadas apresentada pelas espécies comumente utilizadas em escala comercial.

A geada, por ser um fator ambiental determinante na adaptação das espécies de *Eucalyptus* na região Sul do Brasil, vem sendo um dos principais fatores a ser considerado para o êxito dos plantios florestais (Higa et al., 1997; Higa e Higa, 2000). Para a região do Planalto Serrano de Santa Catarina, deve-se escolher genótipos com características que confirmem resistência ou tolerância a baixas temperaturas. Segundo Larcher (2000), algumas destas características podem estar associadas às concentrações de carboidratos solúveis totais e prolina no tecido vegetal.

Desta forma, a relação entre resistência ou tolerância ao frio e a concentração de carboidratos solúveis ou de prolina no tecido vegetal pode possibilitar a identificação de genótipos que possam ser cultivados nestas condições de baixas temperaturas. Além disso, esta característica pode ser incorporada em genótipos através do melhoramento florestal, visando buscar materiais mais adaptados à região.

Segundo Larcher (2000), o que define a sobrevivência de uma planta em uma região de clima frio é a sua capacidade de resistência ou tolerância ao congelamento. Os danos causados pelo congelamento podem ser evitados por mecanismos de proteção e evasão, de forma que o congelamento do tecido pode demorar mais ou até mesmo não ocorrer (Nilsen & Orcutt, 1996). Em amoras silvestres a resistência e tolerância ao frio é acompanhada pelo acúmulo de açúcares solúveis e aminoácidos, como a prolina (Palonen & Junttila, 1999). Considera-se que estes solutos protegem as membranas celulares e as enzimas do dano irreversível causado pelas geadas (Moraga et al. 2006), sendo que a diminuição da pressão osmótica em plantas aclimatadas é predominantemente o resultado do aumento na concentração de carboidratos solúveis (Valentini et al. 1990).

Leborgne et al. (1995), comparando o conteúdo de carboidratos solúveis em vários tecidos de *E. gunnii*, exibindo diferentes graus de tolerância ao congelamento, demonstraram que o tecido mais resistente continha uma alta concentração de carboidratos solúveis, sendo possível aumentar a resistência ao frio através da exposição progressiva das células a baixas temperaturas.

A resistência ao frio pode ser expressa como a mais baixa temperatura na qual uma planta pode ser exposta sem ser danificada (Duryea e McClain, 1984). No entanto, o termo tolerância ao frio é mais utilizado, o qual é definido como temperatura mínima onde metade das plantas, ou das células, é danificada, sendo expressa como Temperatura Letal 50 (LT₅₀) (Glerum, 1985; Larcher, 2000). De acordo com os resultados obtidos por Moraga et al. (2006), o LT₅₀ é um bom indicador da tolerância a baixas temperaturas. Estes autores observaram, em *Eucalyptus globulus* Labill subspecies, uma relação inversa entre o LT₅₀ e o nível de carboidratos solúveis na célula, demonstrando que os carboidratos solúveis podem estar envolvidos na proteção às membranas celulares. Isto também está de acordo com os resultados de Johnson e Cline (1991) e de Tinus et al. (2000).

Marshall (1982) menciona que a resistência ao frio é controlada por relações fisiológicas complexas definidas por combinações complexas de genes. Os melhoristas têm usado testes de campo para seleção para resistência ao frio. No entanto, em função da dificuldade de homogeneizar as condições ambientais, esses esforços de seleção geralmente não apresentam bons resultados. Desta forma, uma metodologia apropriada para seleção de espécies mais tolerantes ao frio para plantios florestais pode permitir uma grande redução no tempo para a seleção, bem como uma redução de custos. Marshall (1982) afirma que os fisiologistas têm demonstrado correlações gerais entre estresses causados pela temperatura e várias variáveis, como por exemplo, concentrações de carboidratos e prolina. A correlação entre as concentrações de carboidratos presentes na planta com a tolerância a baixas temperaturas pode ser uma ferramenta para seleção em laboratório de genótipos adaptados ao clima de regiões frias.

Objetivou-se com este trabalho avaliar a tolerância à baixa temperatura (LT_{50}) em mudas das espécies de *Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus benthamii*, *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna*, submetidas a diferentes níveis de rustificação, usando como indicadores de tolerância ao frio às concentrações de carboidratos solúveis totais e prolina nas folhas.

1 RUSTIFICAÇÃO DE PLANTAS DE *EUCALYPTUS DUNNII* MAIDEN E A RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS TOTAIS E PROLINA FOLIAR COM A TOLERÂNCIA AO FRIO

1.1 RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da rustificação sobre a tolerância ao frio de mudas de *Eucalyptus dunnii* Maiden, bem como, sobre o incremento nos teores foliares de carboidratos solúveis totais e prolina e as suas relações com a tolerância ao frio. O delineamento experimental utilizado foram blocos ao acaso com quatro repetições. Os tratamentos consistiram em diferentes níveis de rustificação (0, 7, 21 e 42 dias de exposição) das plantas a temperaturas diurnas de 5°C e noturnas de 1°C. Após cada nível de rustificação, as mudas foram submetidas a quatro gradientes de temperaturas negativas (-2°C, -4°C, -6°C e -8°C), com três horas de exposição em cada temperatura. Ao final de cada período de rustificação, foram coletadas amostras foliares para a determinação dos teores foliares de carboidratos solúveis totais e prolina. Após cada gradiente de temperatura negativa, foram coletadas amostras foliares para a avaliação do LT₅₀. Os dados foram submetidos à análise de regressão linear e teste de correlação de Pearson. As mudas de *E. dunnii* apresentaram aumento nos teores de carboidratos solúveis totais até 35 dias de rustificação, sendo que após este período, a concentração apresentou uma leve redução. Observou-se uma correlação negativa entre a temperatura de LT₅₀ e a concentração de carboidratos solúveis totais no tecido foliar, ocorrendo um aumento na tolerância ao frio com o aumento dos teores de carboidratos solúveis totais.

1.2 ABSTRACT

The purpose of this chapter was to evaluate the effect of the rustification on cold tolerance of *Eucalyptus dunnii* Maiden (as well as, on the increase of total soluble carbohydrates and proline in the leaves and their relationships to the cold tolerance). The experimental design utilized was that of the randomized blocks with four repetitions. The treatments were made up of different rustification levels (0,7,21 and 42 days of plant exposition to the temperatures of 5°C daily and 1°C night.). After each rustification level, the seedlings were submitted to four sub-zero temperature (-2°C, -4°C, -6°C and -8°C), for three hours each temperature. At the end of each rustification period, were collected leaf samples to evaluate the concentrations of total soluble carbohydrates and proline in the leaves. After each sub-zero temperature, were collected leaf samples for the evaluation of the LT₅₀. The data were submitted to the linear regression analysis and Person's correlation test. The *E.dunnii* seedlings showed an increase in the contents of total soluble carbohydrates up to 35 days of rustification, being that after this period the concentration presented a slightly decrease. It was observed that there was a negative correlation between the temperature of LT₅₀ and the concentration of total soluble carbohydrates in the leaf tissues, occurring an increase in the cold tolerance due to the increase of contents of total soluble carbohydrates.

1.3 INTRODUÇÃO

Dentre os fatores mais limitantes à expansão dos plantios de *Eucalyptus* spp., na região do Planalto Catarinense, destaca-se a ocorrência de geadas. As temperaturas quando próximas ou abaixo de 0°C ocasionam danos em espécies do gênero *Eucalyptus*, que vão desde a perda da área foliar até a morte das plantas (Filho e Santos, 2005).

Muitas plantas apresentam a capacidade de desenvolver mecanismos específicos para a sobrevivência em ambientes que apresentam períodos episódicos e prolongados de congelamento (Larcher, 2000). Este autor cita também que os mecanismos de evasão e proteção, para evitar a formação de gelo nos tecidos, definem a capacidade de tolerância e de sobrevivência de uma planta sob um clima frio e que a resistência ou a tolerância ao frio pode ser uma característica genética que as plantas possuem, bem como pode ser adquirida por modificações ambientais que antecedem as primeiras geadas.

A resistência ou tolerância ao estresse por temperaturas abaixo de 0°C depende da espécie, do genótipo e da idade de desenvolvimento da planta (Palva et al., 2002). Para Filho e Santos (2005), *E. dunnii* é indicado para plantios em regiões com temperaturas mínimas absolutas de até -5°C, sob condições de aclimatação prévia mediante gradual redução da temperatura na estação fria, suportando nessas condições até 22 geadas anuais. A maioria das plantas resistentes ou tolerantes ao frio podem ter sua tolerância aumentada através da indução ambiental, em consequência de uma exposição a baixas temperaturas, acima do ponto de congelamento (Larcher, 2000). Segundo Levitt (1980) e Nilsen e Orcutt (1996), a indução pode ocorrer quando a planta é exposta a baixas temperaturas, geralmente entre 0 e 10°C, período este chamado de aclimatação ou de rustificação.

Jacobsen et al. (2007) utilizaram a determinação do LT₅₀ para avaliar a tolerância ao frio e identificaram diferentes mecanismos de resistência ao frio e capacidade de aclimatação em cultivares de quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*), oriundas de diferentes condições agroecológicas do Sul do Peru. Os autores observaram diferenças significativas entre as cultivares, períodos de aclimatação e valores de LT₅₀, além de diferentes concentrações no conteúdo de carboidratos solúveis totais e de prolina. Monteros e Jacobsen (1999) já haviam demonstrado em quinoa que o aumento no nível de carboidratos solúveis totais implica em maior tolerância ao frio. Sendo assim, estes autores afirmam que as diferenças significativas

entre a concentração de carboidratos solúveis totais, temperatura de resfriamento e LT_{50} podem ser utilizados como indicadores de tolerância ao frio.

Objetivou-se avaliar a resistência à baixa temperatura através da temperatura letal em que ocorre 50% da eletrocondutividade máxima (LT_{50}) em mudas de *Eucalyptus dunnii* submetidas a diferentes níveis de rustificação e verificar a existência de correlação entre os teores de carboidratos solúveis totais e prolina com a tolerância ao frio.

1.4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Lages, SC. Foram utilizadas 48 mudas de *Eucalyptus dunnii* Maiden (clone K-1007) com cinco meses de idade, procedentes do viveiro florestal da Empresa Klabin, localizado no município de Telêmaco Borba, PR, sendo utilizadas três plantas por repetição.

As mudas de *Eucalyptus dunnii* Maiden, originárias da Austrália, foram obtidas através de micro propagação vegetativa em Telêmaco Borba, PR. As plantas foram conduzidas em tubetes com volume de 90 cm³, no viveiro da Empresa, onde permaneceram por três meses após a emergência, atingindo no final do terceiro mês 30 cm de altura. O substrato utilizado foi constituído de partes iguais de casca de arroz carbonizada e vermiculita tipo 3 e fertilizadas com 4,0 kg de osmocote (19-06-10) + 1,5 kg de Superfosfato simples + 500 g de MAP (mono-amônio fosfato) + 150 g de Sulfato ferroso + 150 g de FTE BR 12 (“Fried trace elements”– micronutrientes) por metro cúbico. Em seguida, as mudas foram transplantadas para sacos plásticos com volume de 2000 cm³, contendo o mesmo substrato utilizado na semeadura, permanecendo por mais dois meses no viveiro. No final deste período, as mudas atingiram em média 50 cm e foram transferidas para o laboratório para condução do experimento.

Os tratamentos utilizados foram quatro períodos de rustificação (0, 7, 21 e 42 dias de exposição) à temperaturas diurnas de 5°C e noturnas de 1°C, sob fotoperíodo controlado de 12 horas. Ao final de cada nível de rustificação, as mudas foram submetidas a quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8°C), sendo utilizado um período de exposição de três horas cada gradiente. Antes das mudas serem submetidas à rustificação, elas foram mantidas em fotoperíodo controlado de 12 horas, com temperaturas diurnas de 20°C e noturnas de 12°C, durante seis dias para aclimação nas câmaras de crescimento. Após, as temperaturas foram alteradas para temperatura diurna de 15°C e noturna de 9°C, durante sete dias, mantendo-se o fotoperíodo controlado de 12 horas. Em seguida a temperatura diurna foi reduzida para 10°C e noturna para 5°C por mais 10 dias. Após esse período estabeleceu-se o Ponto Zero, onde as mudas passaram por uma rustificação na temperatura diurna de 5°C e noturna de 1°C.

As variáveis dependentes avaliadas foram concentrações foliares de carboidratos solúveis totais e de prolina e LT_{50} .

1.4.1 Determinação de LT_{50} através da condutividade elétrica (CE)

A LT_{50} (temperatura letal onde ocorre 50% da eletrocondutividade máxima) foi determinada através da condutividade elétrica (CE) do tecido foliar após as plantas serem submetidas aos gradientes de temperatura abaixo de zero e após os tecidos serem submetidos a uma temperatura de 90°C por 4 horas. Desta forma, para a análise da condutividade elétrica foram utilizadas 10 folhas coletadas da região mediana do quarto par de inserção de ramos do ápice para a base, sendo retirados dois discos do limbo foliar com 11 mm de diâmetro com perfurador de rolha na região mediana da folha, sem atingir a nervura principal. (Figura 1).

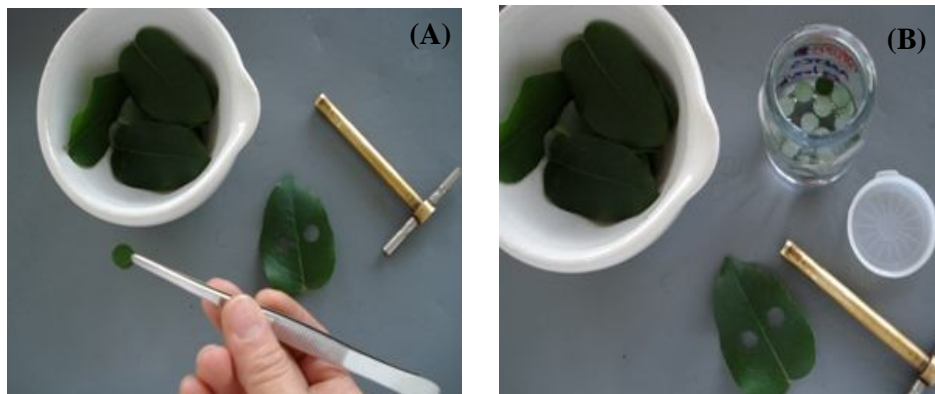


Figura 1 – Corte dos discos foliares de *Eucalyptus dumii* com perfurador de rolha (A), para posterior determinação de condutividade elétrica (B).

Em seguida, os discos foram colocados em frascos de vidro com 30mL de água deionizada, deixando-se em repouso por 24h em temperatura ambiente. Na seqüência, foi realizada a leitura da condutividade elétrica (CE inicial) com condutímetro Mettler Toledo, modelo MPC 227. Após esta leitura, as amostras foram levadas à estufa previamente regulada à temperatura de 90°C, ficando nesta condição por 4h. As amostras permaneceram em temperatura ambiente por 12h e após este período foi realizada nova leitura da condutividade elétrica (CE final). Através dos valores de CE inicial e CE final, obteve-se o LT através da fórmula: $LT = (CE \text{ final} - CE \text{ inicial}) / (CE \text{ inicial}) \times 100$, sendo que o gradiente de temperatura abaixo de zero que resulta num valor de mortalidade do tecido de 50% foi considerada a temperatura letal (LT_{50}), conforme descrito por Flint et al. (1967).

1.4.2 Determinação de Carboidratos Solúveis Totais

As folhas frescas, que foram coletadas para a determinação da condutividade elétrica, foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em temperatura de -20°C, com o objetivo de reduzir o metabolismo celular (Figura 2), para posterior análise do teor de carboidratos solúveis totais.

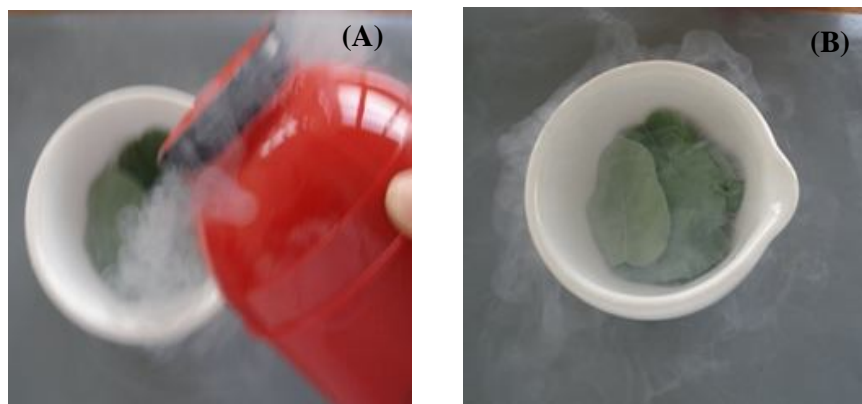


Figura 2 - Congelamento das amostras de folhas em nitrogênio líquido (A) para posterior armazenamento (B).

A extração e a análise dos teores de carboidratos solúveis totais foram realizadas conforme metodologia descrita por Moraga et al. (2006), utilizando-se o método fenol-sulfúrico. As folhas de cada amostra, previamente armazenadas, foram maceradas sem a nervura central com aproximadamente 25 mL de nitrogênio líquido em almofariz e pistilo de porcelana. Após maceradas, foram retiradas 0,3 g de massa seca e colocadas em tubo de ensaio, logo após adicionou-se 3mL de etanol a 80%, agitando-se e colocando-se a mistura por 30 minutos em banho-maria a uma temperatura de 60°C. Posteriormente, a amostra foi agitada manualmente por 30 segundos e centrifugada numa temperatura de 4°C a 4000rpm, por 30 minutos. Após a centrifugação, 1 mL da fase líquida foi transferida para outro tubo de ensaio, adicionando-se a este 1 mL de clorofórmio e 1 mL de água deionizada, deixando a mistura em repouso durante 45 a 60 minutos, obtendo-se a separação de fases, compostas por pigmentos no fundo do tubo e carboidratos dissolvidos em meio aquoso na parte superior (Figura 3).

Em um outro tubo de ensaio pipetou-se 200 μ L da fase aquosa obtida e adicionou-se 1,8 mL de água deionizada (solução 1). Desta solução 1, foram retirados 500 μ L e transferidos para outro tubo de ensaio, onde adicionou-se 500 μ L de fenol (5%) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após, agitou-se em vortex e, em seguida, foi realizada a medição da absorbância da solução em espectrofotômetro, utilizando-se um comprimento de onda de

485 nm. Para obtenção dos valores de concentração de carboidratos solúveis totais utilizou-se a curva de calibração $y = 0,0081x + 0,0744$ (onde: y =absorbância; x =concentração de carboidratos; $R^2=0,9988$).

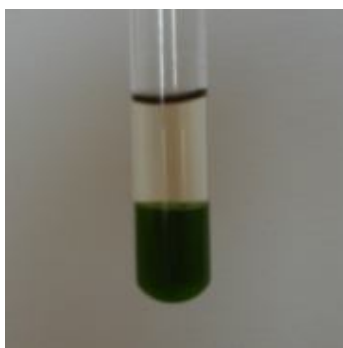


Figura 3 – Pigmentos no fundo do tubo e carboidratos dissolvidos em meio aquoso (fase aquosa superior)

1.4.3 Determinação de Prolina

Para determinação de prolina foi utilizada 0,25g de massa seca de folhas maceradas em nitrogênio líquido sem a nervura principal, juntamente com 5 mL de ácido sulfosalicílico a 3%. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm em temperatura ambiente, sendo após coletado 1 mL de sobrenadante (Figura 4A) e transferidos para um tubo de ensaio, adicionando-se 1 mL de ninidrina ácida e 1 mL de ácido acético glacial. Posteriormente, as amostras foram colocadas em banho-maria por 1h a 100°C. Em seguida, as amostras foram resfriadas em gelo, sendo adicionados em seguida 2 mL de tolueno puro (Figura 4B) e agitado vigorosamente em vortex, por 30 segundos, para separação das fases (o tolueno extrai a substância cromófora formando um complexo com coloração avermelhada). Após a solução atingir a temperatura ambiente, aspirou-se a fase aquosa superior (cromóforo + tolueno), para leitura em espectrofotômetro a 520 nm, conforme descrito por Bates et al. (1973). Para obtenção dos valores de concentração de prolina utilizou-se a curva de calibração $y = 0,0959x - 0,2147$ (onde: y =absorbância; x =concentração de prolina; $R^2=0,9926$).

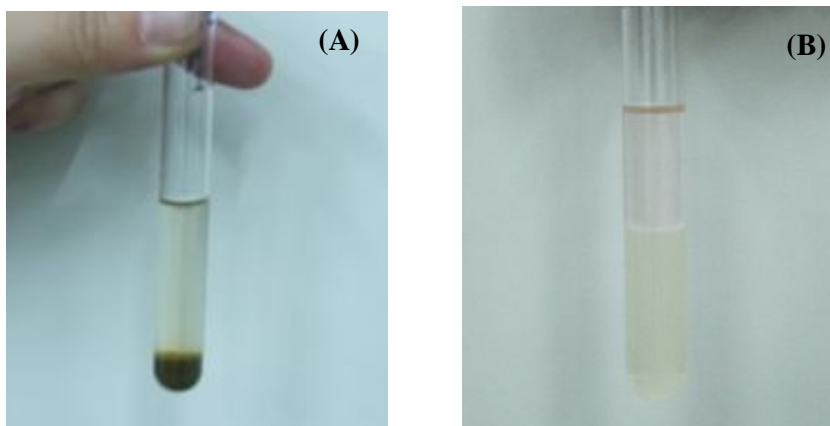


Figura 4 – Líquido sobrenadante após centrifugação da amostra (A) e separação das fases após adição de tolueno (B)

1.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O experimento foi realizado conforme o delineamento de blocos ao acaso, sendo utilizadas quatro repetições para cada tratamento. Os tratamentos utilizados foram quatro períodos de rustificação (0, 7, 21 e 42 dias de exposição das mudas as temperaturas diurnas de 5°C e noturnas de 1°C) e quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8°C). Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e regressão linear (períodos (dias) de rustificação e gradientes de temperatura) e análise de correlação por Pearson (teor foliar de carboidratos solúveis totais e temperatura de LT₅₀).

1.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que as mudas de *Eucalyptus. dunnii* apresentaram aumento nos teores de carboidratos solúveis em resposta ao aumento do período de rustificação até 35 dias (Figura 5). No período de 0 dias de rustificação as concentrações foliares de carboidratos solúveis

totais eram de 15mg.g^{-1} , sendo que após o período de 7 dias, as concentrações passaram a ser de 47mg.g^{-1} , atingindo com 21 dias teores em torno de 75mg.g^{-1} , estabilizando os teores de carboidratos em torno de 80mg.g^{-1} num período de 35 dias de rustificação.

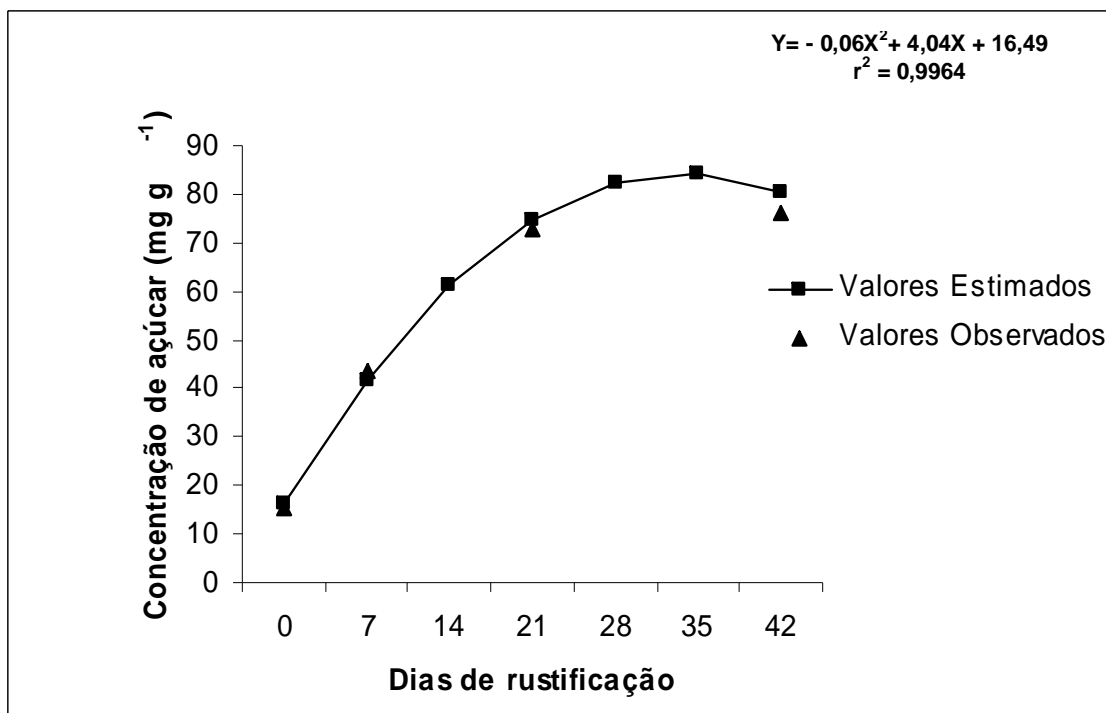


Figura 5 - Concentração foliar de carboidratos solúveis totais (mg g^{-1}) em *Eucalyptus dunnii* em resposta a rustificação.

O incremento no teor de carboidratos solúveis totais em resposta à rustificação, está de acordo com os obtidos por Shvaleva et al. (2008), que observaram em *Eucalyptus globulus*, aumento no teor de carboidratos solúveis totais com a rustificação das plantas. Segundo Larcher (2000), nas plantas lenhosas, a rustificação é iniciada pela exposição a temperaturas um pouco acima de 0°C por muitos dias ou até por semanas e que neste estágio de rustificação, os carboidratos e outras substâncias protetoras são acumuladas, as células tornam-se menos túrgidas e o vacúolo central reparte-se em muitos vacúolos pequenos. Ainda, este autor cita que, após esse período, o protoplasma está pronto para a próxima fase,

onde as biomembranas e as enzimas são modificadas, de forma que as células são capazes de tolerar a perda de água em decorrência da formação de gelo. Embora nem todas as espécies sejam capazes de apresentar aumento de tolerância ao frio em resposta a rustificação (Moraga et al., 2006), o nível mais alto de rustificação é alcançado pela exposição ininterrupta das plantas a temperaturas de 0°C a 10°C (Levitt, 1980; Nilsen e Orcutt, 1996) ou de 5°C a 15°C, uma vez que essa faixa de temperatura pode variar entre espécies (Larcher, 2000).

Com relação ao dano causado pelas baixas temperaturas, observou-se que de maneira geral, houve uma redução na temperatura letal (mortalidade de 50%) com o aumento no período de rustificação até 21 dias (Figura 6). Nas temperaturas de -2°C, -4°C, -6°C e -8°C as mudas que foram submetidas a períodos de 0 e 7 dias de rustificação apresentaram resultados de dano muito semelhantes, em torno de 35%, 50%, 75% e 80%, respectivamente. Já as mudas submetidas a 21 dias de rustificação a -2°C, -4°C, -6°C e -8°C, apresentaram uma mortalidade menor, em torno de 20%, 25%, 60% e 70%, respectivamente. Desta forma, observou-se que o melhor período de rustificação das mudas de *E. dunnii* (clone K-1007) seria de 21 dias para diminuir a intensidade de dano causado pelas baixas temperaturas.

Os valores de concentrações foliares de carboidratos solúveis totais variaram de 15 mg.g⁻¹ a 80 mg.g⁻¹ no período de até 35 dias de rustificação e observou-se que o aumento das concentrações neste período refletiu em um valor de LT₅₀ menor, onde no período de 21 dias de rustificação, o LT₅₀ ficou em torno de -5,34°C (Tabela 1). Este resultado demonstra que existe uma relação no aumento da concentração foliar de carboidratos solúveis com uma maior tolerância das mudas de *Eucalyptus dunnii* (clone K-1007) ao frio. No entanto, aos 42 dias de rustificação, surpreendentemente o valor de LT₅₀ aumentou (Tabela 1), causando um percentual de dano de 55%, 60%, 75% e 80%, nas temperaturas de -2°C, -4°C, -6°C e -8°C respectivamente (Figura 6). Observou-se a estabilização no aumento dos teores de carboidratos solúveis totais. (Figura 5).

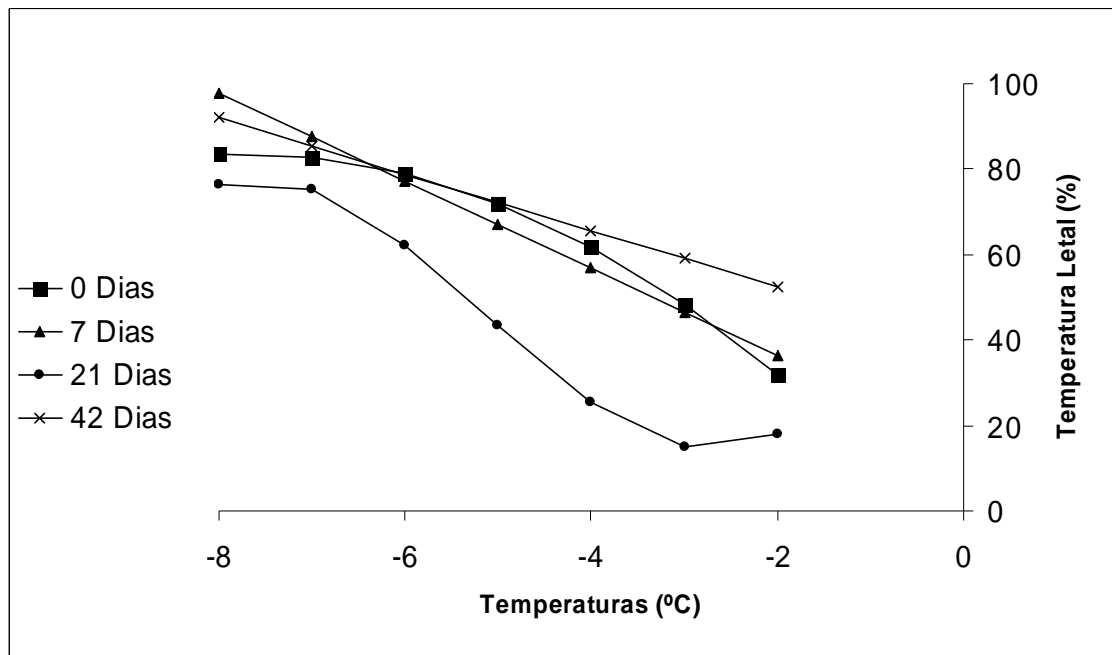


Figura 6 – Relação do Percentual de dano (%) em *Eucalyptus dumii* submetidos a diferentes gradientes de temperatura abaixo de zero (°C) e períodos de rustificação.

$$(y_{0 \text{ dias}} = -1,61x^2 - 24,63x - 11,09 \quad r^2 = 0,9663; \quad y_{7 \text{ dias}} = -10,25x + 15,84 \quad r^2 = 0,9384; \\ y_{21 \text{ dias}} = 1,08x^3 + 16,63x^2 + 65,88x + 92,03 \quad r^2 = 1; \quad y_{42 \text{ dias}} = -6,61x + 39,16 \quad r^2 = 0,8090).$$

Tabela 1 - Temperaturas de LT_{50} (°C) em função de diferentes períodos de rustificação (dias de exposição) das mudas de *Eucalyptus dumii* a temperaturas diurnas de 5°C e noturnas de 1°C.

Períodos de Rustificação (dias)	Carboidratos (mg.g ⁻¹ MS)	LT_{50} (°C)
0	15,08	-2,48
7	47,17	-3,33
21	75,75	-5,34
42	76,34	-1,64

Levitt (1980) e Nilsen e Orcutt (1996) observaram que a indução a resistência ao frio, pode ocorrer quando a planta é exposta a baixas temperaturas, geralmente entre 0 e 10°C, período este chamado de aclimatação ou rustificação. A resistência ao frio em mudas é

determinada por mecanismos de fuga e tolerância (Larcher 2000; Nilsen e Orcutt,1996). O primeiro corresponde a um mecanismo onde a planta evita a formação de gelo nos seus tecidos e o segundo permite o congelamento nos tecidos da planta, no entanto, sem conseqüências letais (Larcher 2000; Nilsen e Orcutt,1996). Larcher (2000) afirma que os danos causados pelo congelamento podem ser evitados por mecanismos de proteção e evasão nas células, os quais inibem ou retardam o congelamento do tecido. Um destes processos pode envolver um maior conteúdo de solutos dissolvidos nas células, reduzindo o ponto de congelamento e tornando a célula mais tolerante a baixas temperaturas (Jacobsen et al. 2007). Para as plantas que devem atravessar com sucesso um período de temperaturas abaixo do ponto de congelamento é essencial que seu protoplasma seja tolerante ao congelamento, sendo essa condição alcançada pela elevada incorporação de fosfolipídios estáveis nas biomembranas e pela acumulação de carboidratos solúveis, polióis, aminoácidos, poliaminas (Palonen and Junttila, 1999) e também proteínas hidrossolúveis (Larcher, 2000).

Nos resultados da análise de correlação, houve uma correlação significativa e negativa entre a temperatura de LT50 e a concentração de carboidratos solúveis no tecido foliar de *E. dunnii* submetido aos quatro períodos de rustificação (Figura 7).

De acordo com os resultados, as mudas entram no período de rustificação com concentrações foliares em torno de 15 mg.g⁻¹ e um LT50 em média de -2,5°C, chegando, no final do período de rustificação, a 80 mg.g⁻¹ e um LT50 de aproximadamente -6°C. Esses resultados demonstram que se as mudas fossem expostas aos gradientes de temperaturas -2°C, -4°C, -6°C e -8°C, já possuindo inicialmente uma concentração foliar de carboidratos solúveis totais de 80 mg.g⁻¹, a mortalidade nas mudas seria menor, ou seja, seriam mais tolerantes ao frio. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Jacobsen et al. (2007), que afirmam que o aumento no nível de carboidratos solúveis implica em uma maior tolerância ao frio, sendo que as diferenças significativas entre conteúdo de açúcares totais e temperatura de

resfriamento e LT_{50} podem ser utilizados como indicadores de tolerância ao frio. Tinus et al. (2000) e Moraga et al. (2006) também afirmam que os teores de carboidratos solúveis totais são um bom indicativo da resistência a baixas temperaturas e apresentam correlação significativa com LT_{50} . Hekneby et al. (2006), em leguminosas, também observaram que a aclimação ao frio diminuiu o LT_{50} e aumentou a concentração de carboidratos solúveis totais nas folhas de todas as espécies avaliadas. Uma correlação negativa entre o conteúdo de carboidratos solúveis e a temperatura de LT_{50} também foi obtida em *E. gunnii* (Leborgne et al., 1995). Da mesma forma, Bravo et al. (1998) afirmam que, em quinoa, o conteúdo foliar de carboidratos solúveis teve correlação com a temperatura de congelamento e de LT_{50} . Em diferentes subespécies de *Eucalyptus globulus* foi observado uma correlação inversa entre o conteúdo de carboidratos solúveis totais e o LT_{50} após passarem por um período de aclimação (Moraga et al, 2006), confirmando os resultados obtidos no presente trabalho.

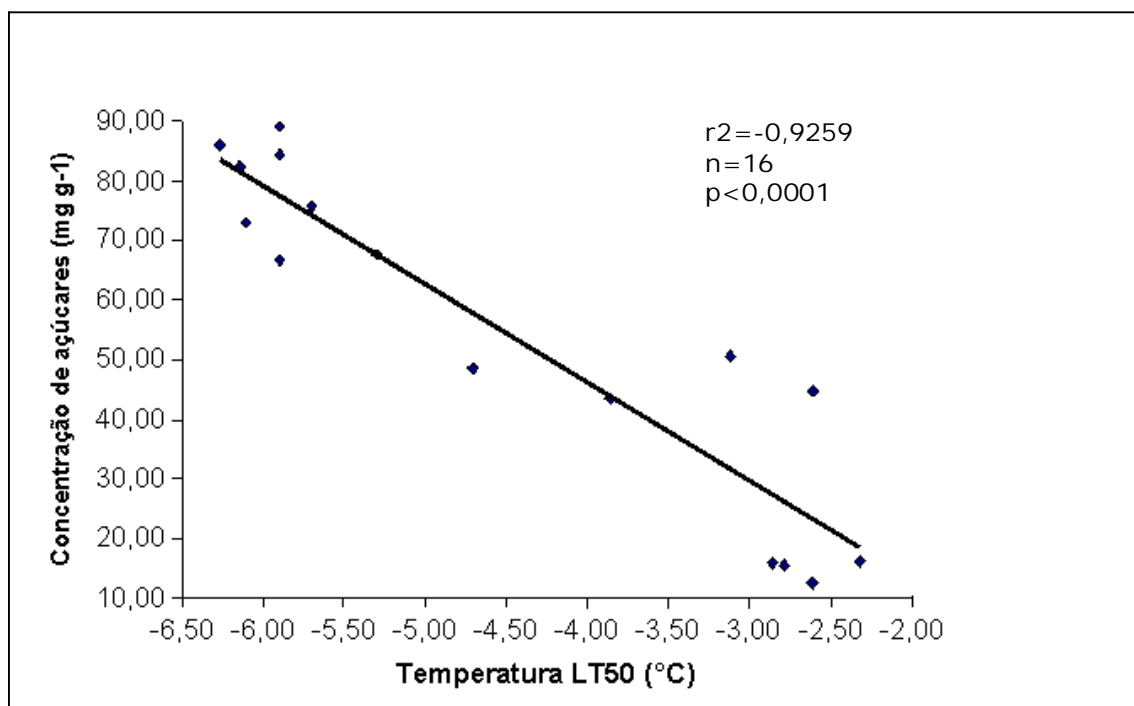


Figura 7 – Correlação entre LT_{50} (°C) e concentrações de carboidratos solúveis totais ($mg\ g^{-1}$) em *Eucalyptus dunnii* submetidos a quatro períodos de rustificação.

Nas análises de prolina identificou-se nos tecidos das plantas uma concentração média de $2,42 \text{ mg.g}^{-1}$ de MS, a qual não foi influenciada pelo período de rustificação (dados não apresentados). Isto demonstra que o incremento na tolerância ao frio, em *Eucalyptus dunnii*, em resposta ao aumento no período de rustificação não possui relação com os teores foliares de prolina. Almeida et al. (1993) avaliaram a resistência ao frio e a capacidade de rustificação de mudas de diferentes genótipos de *Eucalyptus globulus* e híbridos (*E.gunnii* X *E. globulus* e *E. viminalis* X *E. globulus*), concluindo que o aumento na resistência em *Eucalyptus* pode ser relacionado com o aumento na concentração de carboidratos solúveis totais e que a concentração do teor de prolina não aumentou em resposta a aclimatação ao frio, estando de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho. No entanto, no híbrido *E. cypellocarpa* X *E. globulus*, estes autores observaram uma relação entre o conteúdo foliar de prolina e a tolerância ao frio, demonstrando que esta relação depende do genótipo a ser considerado.

De maneira geral, os resultados do presente trabalho demonstram que a tolerância ao frio em *E. dunnii* está fortemente relacionada ao aumento nos teores foliares de carboidratos solúveis totais e não com o conteúdo foliar de prolina. Este resultado está de acordo com os obtidos por Jacobsen et al. (2007). Estes autores observaram que a tolerância ao frio em cultivares de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), oriundas de diferentes condições agroecológicas do Sul do Peru, apresentam correlação significativa entre o conteúdo de carboidratos solúveis totais, porém o conteúdo foliar de prolina não apresentou correlação.

1.7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- 1) A exposição de plantas de *Eucalyptus dunnii* (clone K 1007) à rustificação aumenta a sua tolerância ao frio até 35 dias de exposição a temperaturas diurnas de 5°C e noturnas de 1°C, sendo que esta tolerância a baixas temperaturas está fortemente relacionada à concentração foliar de carboidratos solúveis totais.
- 2) Em *Eucalyptus dunnii* (clone K 1007), o teor foliar de prolina não contribui para a tolerância ao frio.

2 COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES FOLIARES DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS TOTAIS E DE PROLINA EM DIFERENTES ESPÉCIES DE EUCALYPTUS E SUAS RELAÇÕES COM A TOLERÂNCIA AO FRIO

2.1 RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da rustificação sobre a tolerância ao frio nas espécies de *Eucalyptus dunnii* Maiden, *E. benthamii* Maiden & Cabbage, *E. grandis* W. Hill ex Maiden e *E. saligna* Sm., bem como sobre o incremento nos teores foliares de carboidratos solúveis totais e de prolina, verificando suas relações com a tolerância ao frio. Os tratamentos foram compostos por dois níveis de rustificação (0 e 21 dias) combinados com quatro espécies de *Eucalyptus* (*E. dunnii*, *E. benthamii*, *E. grandis* e *E. saligna*). Foram avaliados, após cada período de rustificação e em cada espécie, três gradientes de temperaturas negativas (-2, -5 e -8°C). Não foi identificada a presença de prolina nos tecidos foliares das espécies avaliadas. No entanto, observou-se diferenças entre as espécies quanto à concentração foliar inicial de carboidratos. Inicialmente, *E. benthamii* apresentou as maiores concentrações, seguido pelo *E. dunnii* e *E. grandis* e *E. saligna*, respectivamente. A rustificação causou um aumento na concentração foliar de carboidratos de 2,9; 2,5; 2,8 e 1,3 vezes em *E. dunnii*, *E. benthamii*, *E. saligna* e *E. grandis*, respectivamente. A temperatura de LT₅₀, nas mudas que não foram submetidas à rustificação, foi mais baixa em *E. benthamii*, seguido por *E. dunnii*, *E. grandis* e *E. saligna*. No entanto, com a rustificação das plantas não houve diferenças entre as espécies quanto à temperatura de LT₅₀. Observou-se que a LT₅₀ diminuiu com a rustificação, exceto no *E. benthamii*. Houve correlação negativa entre a temperatura de LT₅₀ e a concentração foliar de carboidratos solúveis totais nas espécies avaliadas.

2.2 ABSTRACT

The purpose of this chapter was to evaluate the effect of the rustification on the cold tolerance in *Eucalyptus dunnii* Maiden, *E. benthamii* Maiden & Cabbage, *E. grandis* W. Hill ex Maiden e *E. saligna* Sm., as well as, to compare the leaf contents of total soluble carbohydrates in these species and verify their possible relationships to the cold tolerance. The experimental design utilized was that of the three repetition randomized blocks. The treatments were made up of two rustification levels (0 and 21 days of exposition of the plants to 5°C daily and 1°C night temperatures, applying a photoperiod of 12h) combined to four species of *Eucalyptus* (*E. dunnii*, *E. benthamii*, *E. grandis* and *E. saligna*). As well, were evaluated, after each rustification level and in each species, three temperature gradients (-2°, -5°, and -8°C). The variables evaluated were the leaf concentrations of carbohydrates and proline, the damage index and the LT₅₀. Differences were observed among the species evaluated regarding to the leaf concentration of total soluble carbohydrates. The *E. benthamii* showed the highest values of total soluble carbohydrates, followed by *E. dunnii* species. All the species showed an increase in the leaf concentration of total soluble carbohydrates due to the rustification, occurring an increase of 2.9, 2.5, 2.8 and 1.3 times in *E. dunnii*, *E. benthamii*, *E. saligna* and *E. grandis*, respectively. The temperature of LT₅₀, in the seedlings which were not submitted to the rustification, was lower in *E. benthamii*, followed by the *E. dunnii*, being that, the *E. grandis* and *E. saligna* showed the highest temperatures of LT₅₀. However, due to the rustification of the plants there was no differences among the species regarding to the temperature of LT₅₀. It was, also, observed that the LT₅₀ got lower due to the rustification, except in *E. benthamii*. There was a negative correlation between the temperature of LT₅₀ and the leaf concentration of total soluble carbohydrates of *Eucalyptus* genotypes evaluated. Were

not identified proline concentrations in the leaf tissues of the *E. dunnii*, *E. benthamii*, *E. saligna* and *E. grandis* species.

2.3 INTRODUÇÃO

A ocorrência de geadas é um dos principais fatores climáticos que limitam a expansão dos plantios comerciais de *Eucalyptus* na região Sul do Brasil. Segundo Higa et al. (1994), as geadas registradas em 1972 causaram, em algumas regiões, perdas de até 100% em talhões de espécies florestais suscetíveis. Os efeitos potencialmente prejudiciais de temperaturas abaixo de 0°C na estrutura das células de plantas têm sido extensivamente descritos (Palta et al., 1993; Steponkus et al., 1993). Em espécies de *Eucalyptus*, as temperaturas quando próximas ou abaixo de 0°C ocasionam danos que podem causar a perda da área foliar, limitando e modificando o crescimento, podendo causar até a morte das plantas (Filho e Santos, 2005).

Os danos nas plantas são causados pelo congelamento do líquido presente nos espaços intercelulares que causam a ruptura de membranas por compressão e extravasamento irreversível do citoplasma, sendo que normalmente a formação de gelo, nos tecidos, ocorre em temperaturas abaixo de -3°C ou -4°C (Higa et al., 1994). De acordo com esses autores, quanto menor for a adaptação da planta ao abaixamento de temperatura, mais severo será o dano causado pelo congelamento.

Higa et al. (2000) salientam que a escolha da espécie adequada é um dos principais itens para o sucesso do reflorestamento, sendo que entre os vários fatores que influenciam na tomada de decisão sobre a espécie a ser plantada, destacam-se a finalidade do plantio, o solo e o clima do local do plantio. Com relação às espécies de *Eucalyptus*, a seleção, em programas de melhoramento genético, tem sido realizada no intuito de obter plantas resistentes ou tolerantes ao frio (Higa et al., 1997).

A tolerância ao frio, que permite às plantas sobreviverem a condições adversas de baixas temperaturas, é um fenômeno complexo com diferentes mecanismos envolvidos, que depende das espécies envolvidas (Leborgne et al. 1995). Para Larcher (2000), muitas plantas apresentam a capacidade de desenvolver mecanismos específicos para a sobrevivência em ambientes que apresentam períodos episódicos e prolongados de congelamento. Ainda, segundo este autor, os mecanismos de evasão e proteção, para evitar a formação de gelo nos tecidos, definem a capacidade de tolerância e de sobrevivência de uma planta sob um clima frio. A resistência ou tolerância ao frio pode ser uma característica genética que as plantas possuem, bem como pode ser uma característica induzida por modificações ambientais que antecedem as primeiras geadas (Larcher, 2000).

A maioria das plantas resistentes ou tolerantes ao frio pode ter sua tolerância aumentada através da indução ambiental causada por temperaturas baixas, acima do ponto de congelamento (Levitt, 1980; Nilsen e Orcutt, 1996). Segundo estes autores, a indução pode ocorrer quando a planta é exposta a temperaturas entre 0 e 10°C, período este chamado de aclimação ou rustificação. Monteros e Jacobsen (1999) demonstraram, em quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*), que o aumento no nível de carboidratos solúveis totais, em resposta a rustificação das plantas, implica em maior tolerância ao frio.

Para a região Sul do Brasil, a Embrapa (1988) demonstrou que *E. dunnii* e *E. benthamii* são espécies promissoras para plantios em regiões com ocorrência de geadas. Alguns estudos têm evidenciado que o *E. benthamii* apresenta um bom crescimento e resistência a geadas em plantios experimentais de 2 e 3 anos no estado de Santa Catarina (Higa e Pereira. 2003). Para Higa (1997), o *E. dunnii* possui grande potencial para plantios em áreas de ocorrência de geadas e *E. grandis* e *E. saligna* apresentam sobrevivência inferior a 30% ao oitavo ano de idade, mostrando baixo potencial de uso nessas áreas.

Objetivou-se com este trabalho foi avaliar o efeito da rustificação sobre a tolerância ao frio nas espécies de *Eucalyptus dunnii*, *E. benthamii*, *E. grandis* e *E. saligna* e comparar os teores foliares de carboidratos solúveis totais e prolina nestas espécies e verificar suas possíveis relações com a tolerância ao frio.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Lages, SC. Foram utilizadas seis mudas de cada espécie de *Eucalyptus* (*E. dunnii* – clone KF 09, *E. benthamii* – clone ARV 116, *E. saligna* – clone 2864 e *E. grandis* – clone 360), com quatro meses de idade, procedentes do viveiro florestal da empresa Klabin, localizado no município de Telêmaco Borba, PR, sendo utilizadas duas plantas por repetição.

As mudas de *E. dunnii* (clone KF 09), *E. benthamii* (clone ARV 116), *E. saligna* (clone 2864) e *E. grandis* (clone 360), originárias da Austrália, foram obtidas através de micro propagação vegetativa em Telêmaco Borba, PR. As plantas foram conduzidas em tubetes com volume de 90 cm³, no viveiro da empresa, onde permaneceram por três meses após a emergência, atingindo no final do terceiro mês 30 cm de altura. O substrato utilizado foi constituído de partes iguais de casca de arroz carbonizada e vermiculita tipo 3 e fertilizadas com 4,0 kg de osmocote (19-06-10) + 1,5 kg de Superfósforo simples + 500 g de MAP (mono-amônio fosfato) + 150 g de Sulfato ferroso + 150 g de FTE BR 12 (“Fried trace elements” - micronutrientes) por metro cúbico. Em seguida, as mudas foram transplantadas para sacos plásticos com volume de 2000 cm³, contendo o mesmo substrato utilizado na semeadura, permanecendo por mais um mês no viveiro. Ao final deste período, as mudas atingiram 50 cm e foram transferidas para o laboratório para condução do experimento.

Os tratamentos utilizados foram dois períodos de rustificação (0 e 21 dias de exposição a temperaturas diurnas de 5°C e noturnas de 1°C) com fotoperíodo controlado de 12 horas em câmaras de crescimento. Ao final de cada período de rustificação, as mudas foram submetidas a três diferentes gradientes de temperatura abaixo de zero (-2°C, -5°C e -8°C) por três horas cada gradiente.

No entanto, antes das mudas serem submetidas à rustificação, elas foram mantidas em fotoperíodo controlado de 12 horas com temperaturas diurnas de 20°C e noturnas de 12°C, durante três dias para aclimação nas câmaras de crescimento. Após, as temperaturas foram alteradas para temperatura diurna de 10°C e noturna de 5°C, durante quatro dias, mantendo-se o fotoperíodo controlado de 12 horas. A partir daqui, estabeleceu-se o Ponto Zero, onde as mudas passaram por 21 dias de rustificação intensa, tendo temperaturas de 5°C dia e 1°C noite.

As variáveis avaliadas foram: concentrações foliares de carboidratos solúveis totais e de prolina, LT_{50} (temperatura onde ocorre 50% da eletrocondutividade máxima) e o índice de dano pelo frio, adaptado de Flint et al. (1967), de acordo com a fórmula abaixo:

$$ID = \{[(CEf / CEk) - (CEc / CEk)] / (1 - CEc / CEk)\}$$

Onde:

ID = Índice de Dano

CEf = Condutividade Elétrica do tecido celular após exposição à temperatura abaixo de zero;

CEc = Condutividade Elétrica do tecido celular antes da exposição à temperatura abaixo de zero;

CEk = Condutividade Elétrica do tecido celular após exposição a temperatura de 90°C por 4 horas (Condutividade Elétrica máxima);

2.4.1 Determinação de LT_{50} através da condutividade elétrica (CE) e índice de dano

A LT_{50} (temperatura letal onde ocorre 50% da eletrocondutividade máxima) foi determinada através da condutividade elétrica (CE) do tecido foliar após as plantas serem submetidas a diferentes gradientes de temperatura abaixo de zero e após os tecidos foliares serem submetidos a uma temperatura de 90°C por 4 horas. Para a análise da condutividade elétrica foram utilizadas 10 folhas coletadas da região mediana do quarto par de ramos, sendo retirados dois discos do limbo foliar com 11 mm de diâmetro com perfurador de rolha na região mediana da folha, sem atingir a nervura principal.

Após, os discos foram colocados em frascos de vidro com 30mL de água deionizada, deixando-se em repouso por 24h em temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a leitura da condutividade elétrica (CE inicial) com condutivímetro Mettler Toledo, modelo MPC 227. Após esta leitura, as amostras foram levadas para estufa previamente regulada à temperatura de 90°C, ficando nesta condição por 4h. Após, as amostras permaneceram em temperatura ambiente por 12h e após este período foi realizada nova leitura da condutividade elétrica (CE final). Através dos valores de CE inicial e CE final, obteve-se o LT através da fórmula: $LT = (CE \text{ final} - CE \text{ inicial}) / (CE \text{ inicial}) \times 100$, sendo que o gradiente de temperatura abaixo de zero que resultou num valor de 50% de mortalidade celular foi considerada a temperatura letal (LT_{50}).

O índice de dano pelo frio foi determinado utilizando-se os valores de condutividade elétrica antes e depois de submeter às plantas aos diferentes gradientes de temperatura e da condutividade elétrica máxima (célula morta), conforme descrito por Flint et al. (1967).

2.4.2 Determinação de carboidratos solúveis totais

As folhas frescas, que foram coletadas para a determinação da condutividade elétrica, foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a uma temperatura de -20°C, com o objetivo de reduzir o metabolismo celular, para posterior análise do teor de carboidratos solúveis totais.

A extração e a análise da concentração foliar de carboidratos solúveis totais foram realizadas conforme metodologia descrita por Moraga et al. (2006), utilizando-se o método fenol sulfúrico. As folhas de cada amostra, previamente armazenadas, foram maceradas sem a nervura central com aproximadamente 25 mL de nitrogênio líquido em almofariz e pistilo de porcelana. Após maceradas, foi retirada 0,3 g de massa seca, e foi colocada em tubo de ensaio, onde adicionou-se 3mL de etanol a 80%, agitando-se e colocando-se a mistura por 30 minutos em banho-maria a uma temperatura de 60°C. Posteriormente, a amostra foi agitada manualmente, por 30 segundos, e centrifugada numa temperatura de 4°C a 4000rpm, por 30 minutos. Após a centrifugação, 1mL da fase líquida foi transferida para outro tubo de ensaio, adicionando-se a este 1 mL de clorofórmio e 1 mL de água deionizada, deixando a mistura em repouso por 45 a 60 minutos, obtendo-se a separação de fases, estando os pigmentos no fundo do tubo e os carboidratos dissolvidos na parte aquosa superior.

Em outro tubo de ensaio pipetou-se 200 µL da fase aquosa obtida e adicionou-se 1,8 mL de água deionizada (solução 1). Desta solução 1, foram retirados 500 µL e transferidos para outro tubo de ensaio, onde adicionou-se 500 µL de fenol (5%) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após, agitou-se em vortex e, em seguida, foi realizada a medição da absorbância da solução em espectrofotômetro, utilizando-se um comprimento de onda de 485 nm. Para obtenção dos valores de concentração de carboidratos solúveis totais utilizou-se a curva de calibração: $y = 0,0081x + 0,0744$ (onde: y =absorbância; x =concentração de carboidratos; $R^2=0,9988$).

2.4.3 Determinação de Prolina

Para determinação de prolina foi utilizada 0,25g de matéria seca de folhas maceradas em nitrogênio líquido sem a nervura principal, juntamente com 5 mL de ácido sulfosalicílico a 3%. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm em temperatura ambiente, sendo após coletado 1mL de sobrenadante e transferidos para tubos de ensaio, adicionando-se 1 mL de ninidrina ácida e 1 mL de ácido acético glacial. Posteriormente, as amostras foram colocadas em banho-maria por 1h a 100°C. Após esse período as amostras foram resfriados em gelo, sendo adicionadas em seguida 2 mL de tolueno (Figura 4) e agitado vigorosamente em vortex, por 30 segundos, para separação das fases (o tolueno extrai a substância cromófora formando um complexo colorido avermelhado). Após a solução atingir a temperatura ambiente, aspirou-se a fase aquosa superior (cromóforo + tolueno), para leitura em espectrofotômetro a 520 nm, conforme descrito por Bates et al. (1973). Para obtenção dos valores de concentração de prolina utilizou-se a curva de calibração: $y = 0,0959x - 0,2147$ (onde: y=absorbância; x=concentração de prolina; $R^2=0,9926$).

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O experimento foi realizado conforme o delineamento de blocos ao acaso, num esquema bifatorial, com 2 períodos de rustificação e 4 espécies (2 x 4), sendo utilizadas três repetições para cada tratamento. Os tratamentos utilizados originaram-se da combinação entre os fatores “períodos de rustificação” (0 e 21 dias de exposição das plantas as temperaturas de 5°C dia e 1°C noite) e “espécies de *Eucalyptus*” (*E. dunnii*, *E. benthamii*, *E. saligna* e *E. grandis*). Também foram avaliadas, em cada espécie e período de rustificação, três gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -5 e -8°C) por 3 horas cada gradiente. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e após a análise de regressão linear (gradientes de

temperatura), análise de correlação por Pearson (teor foliar de carboidratos solúveis totais e temperatura de LT_{50}) e teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$) (períodos de rustificação e espécies de *Eucalyptus*).

2.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados, observou-se que houve uma interação significativa entre as espécies e o tempo de rustificação para as variáveis concentração foliar de carboidratos solúveis totais e temperatura de LT_{50} (Tabela 2). Foram observadas diferenças entre as espécies avaliadas quanto ao teor foliar de carboidratos solúveis totais iniciais. Inicialmente o *E. benthamii* apresentou os maiores valores de teores foliares de carboidratos solúveis totais ($21,69 \text{ mg.g}^{-1}$), seguido pelo *E. dunnii* ($12,95 \text{ mg.g}^{-1}$), que não diferiu do *E. grandis* ($12,96 \text{ mg.g}^{-1}$) e *E. saligna* ($8,87 \text{ mg.g}^{-1}$) que apresentou a menor concentração inicial de carboidratos solúveis totais das quatro espécies avaliadas. Todas as espécies apresentaram incremento na concentração foliar de carboidratos solúveis totais com a rustificação. No entanto, as espécies *E. dunnii* ($38,15 \text{ mg.g}^{-1}$), *E. benthamii* ($53,87 \text{ mg.g}^{-1}$) e *E. saligna* ($25,17 \text{ mg.g}^{-1}$) apresentaram os maiores incrementos nos teores foliares de carboidratos solúveis totais quando comparadas com *E. grandis* ($16,93 \text{ mg.g}^{-1}$), havendo um aumento de 2,9; 2,5; 2,8 e 1,3 vezes em *E. dunnii*, *E. benthamii*, *E. saligna* e *E. grandis*, respectivamente (Tabela 2). Bravo et al. (1998), em cevada e Jacobsen et al. (2007), em quinoa, também verificaram incremento no conteúdo de carboidratos solúveis totais com o aumento no tempo de rustificação das plantas.

Tabela 2 - Concentração foliar de carboidratos solúveis totais (mg g^{-1}) e LT_{50} ($^{\circ}\text{C}$) em quatro espécies de *Eucalyptus* submetidas a dois períodos de rustificação

Espécies	Concentração foliar de carboidratos solúveis (mg g^{-1})			LT_{50} ($^{\circ}\text{C}$)	
	Tempo de rustificação (dias)		Incremento (vezes)	Tempo de rustificação (dias)	
	0	21		0	21
<i>E. benthamii</i>	21,69Ba*	53,87Aa	2,5	-4,56Aa	-5,08Aa
<i>E. dunnii</i>	12,95Bb	38,15Ab	2,9	-3,87Bb	-5,03Aa
<i>E. grandis</i>	12,96Bb	16,93Ad	1,3	>-2,00Bc	-4,72Aa
<i>E. saligna</i>	8,87Bc	25,17Ac	2,8	>-2,00Bc	-5,02Aa
CV (%)		4,29		5,57	

*Médias não seguidas pela mesma letra, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A temperatura de LT_{50} , nas mudas que não foram submetidas à rustificação, foi mais baixa para o *E. benthamii* ($-4,56^{\circ}\text{C}$), seguido por *E. dunnii* ($-3,87^{\circ}\text{C}$), sendo que *E. grandis* ($>-2,00^{\circ}\text{C}$) e *E. saligna* ($>-2,00^{\circ}\text{C}$) apresentaram as maiores temperaturas de LT_{50} (Tabela 02). Outros autores, através de observações a campo, afirmam que as espécies *E. benthamii* e *E. dunnii* apresentaram maior resistência ao frio do que *E. grandis* e *E. saligna* (Higa et al., 1997), estando de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho. No entanto, com a rustificação as quatro espécies avaliadas não diferem entre si, quanto à temperatura de LT_{50} , sendo que as espécies apresentaram respectivamente após 21 dias de rustificação, as temperaturas de LT_{50} de $-5,08$; $-5,03$; $-4,72$; e $-5,02$ para as espécies: *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. grandis* e *E. saligna*, respectivamente (Tabela 2). Com base neste resultado e no fato de que, no campo, mesmo com a diminuição gradativa das temperaturas antes da ocorrência das primeiras geadas, estas espécies possuem diferentes tolerâncias a baixas temperaturas, pode-se supor que a rustificação, que ocorre no campo, não é suficiente para conferir tolerância ao

frio nas espécies *E. grandis* e *E. saligna*, ou então a rustificação pode ser perdida por algum fator ambiental.

Observou-se também que a temperatura de LT_{50} diminuiu com a rustificação, exceto no *E. benthamii* que não apresentou diferenças significativas entre 0 e 21 dias de rustificação (Tabela 02). Levitt (1980) e Nilsen e Orcutt (1996) também observaram maior tolerância ao frio (menor LT_{50}) quando a planta foi exposta a rustificação em temperaturas entre 0 e 10°C. No entanto, embora o *E. benthamii* tenha apresentado a menor temperatura LT_{50} não houve um aumento significativo na indução da tolerância ao frio com a rustificação. Segundo Larcher (2000), a tolerância ao frio pode ser uma característica genética ou induzida pelo ambiente. Como o *E. benthamii* apresentou uma baixa temperatura LT_{50} mesmo sem rustificação, talvez a tolerância ao frio nesta espécie seja uma característica controlada geneticamente e pouco influenciada pelo ambiente.

Houve correlação negativa entre a temperatura de LT_{50} e a concentração foliar de carboidratos solúveis totais dos genótipos de *Eucalyptus* avaliados (Figura 8), sendo este resultado de acordo com os obtidos por Moraga et al. (2006). Estes autores afirmam que a concentração foliar de carboidratos solúveis totais apresenta, na maioria das plantas avaliadas, correlação significativa com a temperatura de LT_{50} . Bravo et al. (2001) observaram, em *Deschampsia antarctica* e *Colobanthus quitensis* duas espécies da Antártida, que o principal mecanismo de resistência destas plantas ao frio foi através do aumento em até sete vezes nos teores foliares de carboidratos solúveis, com conseqüente redução da temperatura de LT_{50} . Estes autores também sugeriram que a sobrevivência de plantas na Antártida poderia ser no mínimo explicada pela acumulação de algumas substâncias como os carboidratos solúveis. Considerando os resultados obtidos no presente trabalho e em outros trabalhos (Bravo et al., 2001; Moraga et al., 2006; Jacobsen et al., 2007) a concentração foliar de carboidratos solúveis totais pode ser um bom indicativo da tolerância de plantas a baixas temperaturas.

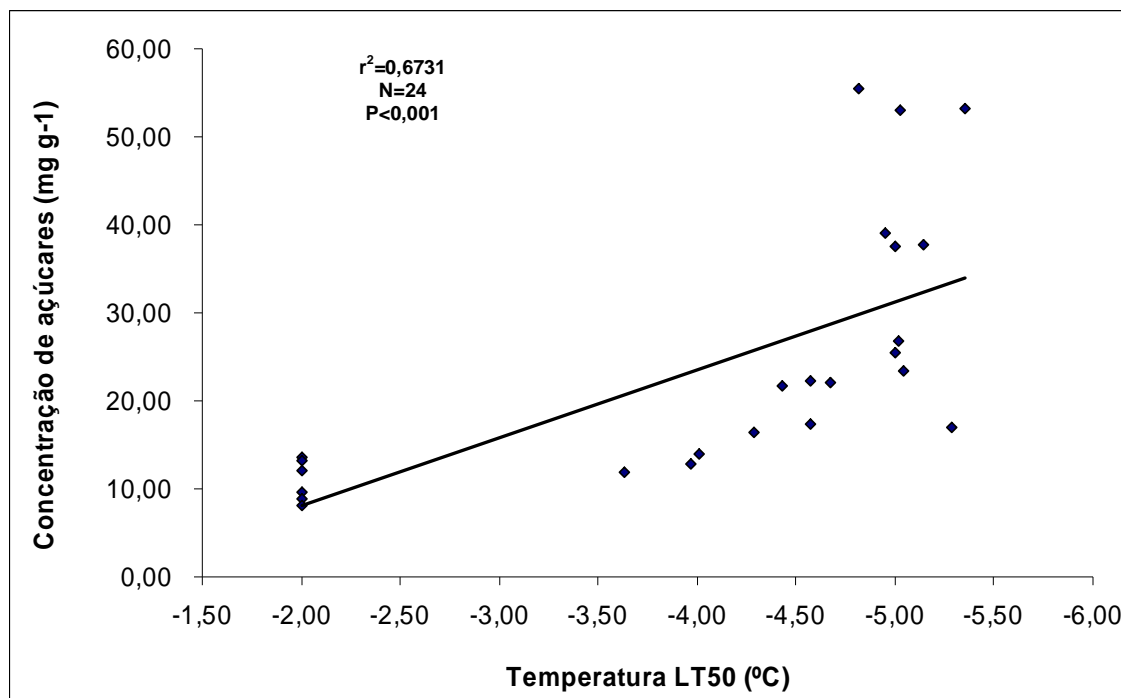


Figura 8 – Correlação entre LT_{50} (°C) e a concentração de carboidratos solúveis totais ($mg\ g^{-1}$) em *Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus benthamii*, *Eucalyptus saligna* e *Eucalyptus grandis* submetidos a dois períodos de rustificação.

Para os resultados de índice de dano, observou-se que as espécies *E. grandis* (0,73) e *E. saligna* (0,79) apresentaram inicialmente (0 dias de rustificação), os maiores índices de dano a temperatura de $-2^{\circ}C$, comparados com *E. benthamii* (0,04) e *E. dunnii* (0,17), (Tabela 3 e Figura 9). Esses resultados confirmam os resultados obtidos por Higa et al. (1997), que observaram que *E. grandis* e *E. saligna* mostram baixo potencial de uso em regiões de ocorrência de geadas severas. Em *E. grandis* e *E. saligna* sem rustificação as plantas apresentaram um índice de dano muito alto. No entanto, o *E. saligna*, quando rustificado num período de 21 dias com temperaturas diurnas de $5^{\circ}C$ e noturnas de $1^{\circ}C$, apresentou maior acúmulo de carboidratos solúveis totais nas folhas, o que aparentemente fez com que o índice de dano à $-2^{\circ}C$ e $-5^{\circ}C$ fosse menor, 0,04 e 0,48, respectivamente, quando comparado ao índice de dano inicial sem rustificação, 0,79 e 0,78, respectivamente. As espécies *E. benthamii*, *E.*

dunnii e *E. saligna* apresentaram em temperaturas de -5°C , após rustificação, índices de dano muito próximos, 0,46; 0,47 e 0,48, respectivamente, indicando que o acúmulo de carboidratos solúveis totais permitiu maior tolerância ao frio nestas espécies, quando rustificadas. *E. grandis*, numa temperatura de -2°C após período de rustificação de 21 dias, apresentou um índice de dano de 0,15, mostrando que houve maior tolerância da espécie ao frio quando rustificada. Já com temperatura de -5°C , *E. grandis* não apresentou o mesmo desempenho quanto ao índice de dano (0,71).

Tabela 3 - Índice de dano das espécies de *Eucalyptus.benthamii*, *Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus grandis* e *saligna*

Índice de dano			
Dias de Rustificação	-2	-5	-8
<i>E. benthamii</i>			
0	0,04a	0,78a	0,86a
21	0,09a	0,46b	0,92a
CV		8,94	
<i>E. dunnii</i>			
0	0,17a	0,92a	0,98a
21	0,05a	0,47b	0,95a
CV		4,38	
<i>E. grandis</i>			
0	0,73a	0,86a	0,88a
21	0,15b	0,71b	0,85a
CV		4,21	
<i>E. saligna</i>			
0	0,79a	0,78a	0,98a
21	0,04b	0,48b	0,91b
CV		2,86	

*Médias não seguidas pela mesma letra, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

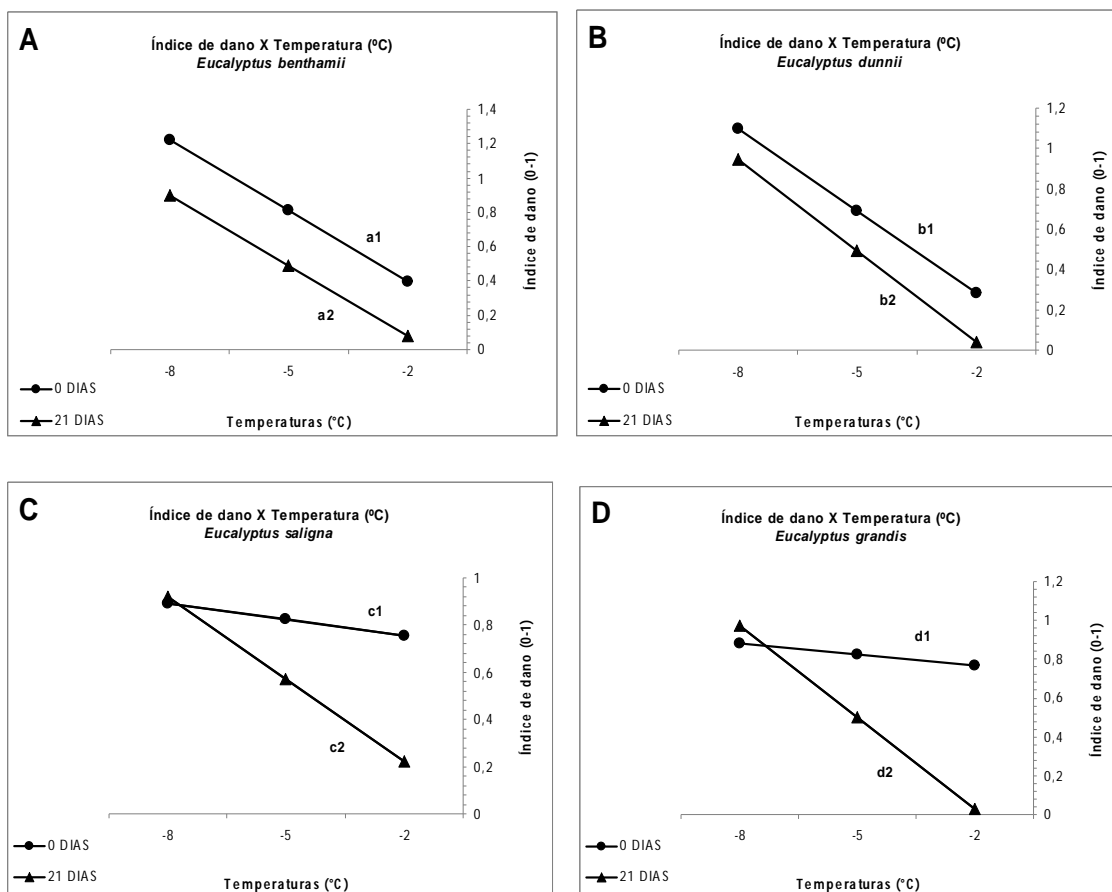


Figura 9 – Relação do Índice de dano (°C) em *Eucalyptus benthamii* (A), *Eucalyptus dunnii* (B), *Eucalyptus saligna* (C) e *Eucalyptus grandis* (D) submetidos a diferentes gradientes de temperaturas abaixo de zero (°C) e períodos de rustificação. ($y_{0\text{dias}(E.benthamii)}$) a1 = $0,1244 - 0,1370x$ $r^2 = 0,8286$; $y_{21\text{dias}(E.benthamii)}$ a2 = $0,1972 - 0,1372x$ $r^2 = 0,9954$; ($y_{0\text{dias}(E.dunnii)}$) b1 = $0,0109 - 0,1361x$ $r^2 = 0,8067$; $y_{21\text{dias}(E.dunnii)}$ b2 = $-0,2605 - 0,1506x$ $r^2 = 0,9987$; ($y_{0\text{dias}(E.saligna)}$) c1 = $0,7102 - 0,0229x$ $r^2 = 0,8545$; $y_{21\text{dias}(E.saligna)}$ c2 = $-0,0098 - 0,1161x$ $r^2 = 0,8860$; ($y_{0\text{dias}(E.grandis)}$) d1 = $0,7265 - 0,0197x$ $r^2 = 0,6656$; $y_{21\text{dias}(E.grandis)}$ d2 = $-0,2861 - 0,1572x$ $r^2 = 0,9981$)

Para explicar o alto índice de dano a -2°C da espécies de *E. grandis* e *E. saligna*, pode-se supor que essas espécies passaram por uma intensificação muito rápida do estressor (frio), antes que os mecanismos de defesa fossem ativados para permitir a tolerância ao frio. No entanto, quando essas espécies passaram pelo período de rustificação (21 dias), elas apresentaram índices de dano muito próximos a *E. dunnii* e *E. benthamii*. Segundo Larcher (2000), os danos causados pelo congelamento podem ser evitados por mecanismos de

proteção e evasão nas células, os quais inibem ou retardam o congelamento do tecido. Um destes processos pode envolver um maior conteúdo de solutos dissolvidos nas células, reduzindo o ponto de congelamento e tornando a célula mais tolerante a baixas temperaturas (Jacobsen et al., 2007). Para as plantas que devem atravessar com sucesso um período de temperaturas abaixo do ponto de congelamento é essencial que seu protoplasma seja tolerante ao congelamento, sendo essa condição alcançada pela elevada incorporação de fosfolipídios estáveis nas biomembranas e pela acumulação de carboidratos solúveis, polióis, aminoácidos, poliaminas (Palonen and Junttila, 1999) e também proteínas hidrossolúveis (Larcher, 2000).

Observa-se que para *E. benthamii* e *E. dunnii*, aos 0 dias de rustificação, os valores de índice de dano na temperatura de -8°C , estimados pelas equações ajustadas, apresentaram valores acima dos observados. No entanto, isso pode ocorrer devido ao ajuste nas equações, conforme já reportado por Brackmann et al. (2004).

Não foram identificadas concentrações de prolina nos tecidos foliares das espécies de *E. dunnii*, *E. benthamii*, *E. saligna* e *E. grandis* (dados não apresentados), como observado por Jacobsen et al. (2007), em quinoa, e por Brigas et al. (1989), em brotos e raízes de *Juniperus chinensis*. No entanto, Swaaij et al. (1985) observaram acúmulo de prolina em brotos de clones de batata expostos a baixa temperatura e estresse hídrico, estando este acúmulo relacionado à tolerância ao frio. Estes autores sugerem que as possíveis funções da prolina seriam de osmorregulação e proteção das membranas celulares e das enzimas durante aumento do estresse. Porém, a importância dos altos níveis de prolina para tolerância de plantas ao estresse por baixas temperaturas tem sido questionada, pois o acúmulo poderia ser simplesmente consequência do estresse hídrico (Hanson et al. 1979, Hanson e Hitz, 1982).

2.7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- 1) Nas espécies *Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus benthamii*, *Eucalyptus saligna* e *Eucalyptus grandis* existe correlação negativa entre a temperatura de LT_{50} e a concentração foliar de carboidratos solúveis totais;
- 2) A concentração foliar de carboidratos solúveis totais pode ser utilizada como indicador de tolerância ao frio para *E. dunnii* (clone KF 09), *E. benthamii* (clone ARV 116), *E. saligna* (clone 2864) e *E. grandis* (clone 360);
- 3) A concentração foliar de prolina não possui relação com a tolerância ao frio nas quatro espécies de *Eucalyptus* estudadas; e
- 4) Nenhuma das espécies mostrou-se tolerante na temperatura de -8°C , mesmo após passar pelo período de rustificação.

CONCLUSÕES GERAIS

Observa-se que há uma correlação entre a temperatura de LT_{50} e a concentração foliar de carboidratos solúveis totais em *E. dunnii* (clone K 1007), apresentando desta forma, uma relação de tolerância ao frio com o incremento de carboidratos até cerca de 35 dias de rustificação, sem apresentar incremento nos teores foliares de prolina.

As mudas de *E. dunnii* (clone KF 09), *E. benthamii* (clone ARV 116), *E. saligna* (clone 2864) e *E. grandis* (clone 360), submetidas à rustificação por 21 dias, apresentam maiores concentrações foliares de carboidratos solúveis totais do que sem rustificação. Além disso, a rustificação proporcionou maior tolerância ao frio, exceto em *E. benthamii*. Existe relação entre a temperatura de LT_{50} e a concentração foliar de carboidratos solúveis totais nas espécies de *Eucalyptus* avaliados, apresentando uma relação de tolerância ao frio com o incremento de carboidratos solúveis totais. Não foram identificadas concentrações de prolina nos tecidos foliares em *E. dunnii* (clone KF 09), *E. benthamii* (clone ARV 116), *E. saligna* (clone 2864) e *E. grandis* (clone 360).

Os resultados dos dois experimentos sugerem que a determinação da concentração foliar de carboidratos solúveis totais em mudas de *Eucalyptus* pode ser uma característica quantitativa a ser considerada na seleção de espécies resistentes ou tolerantes ao frio em programas de melhoramento.

REFERÊNCIAS

ALBERDI, M.; CORCUERA, L. Cold acclimation in plants. **Phytochemistry**. n. 10, p. 3177-3184, 1991.

ALMEIDA, M.H.; CHAVES, M.M.; SILVA, J.C. Cold acclimation in eucalypt hybrids. **Three Physiology**. n.14, p. 921-932. 1993.

ALVES, M. V. G.; KOEHLER, H. S.; MELO FILHO, B. **Perspectives and Tendencies of the Brazilian Forestry Sector**. In: Segundo Congresso Latinoamericano IUFRO, La Serena: INFOR. p. 4-4, 2006.

BARCELLOS, D. C.; COUTO, L. C.; MULLER, M.D.; COUTO, L. O Estado-da-arte da Qualidade da Madeira de Eucalipto para produção de Energia: Um enfoque nos tratamentos silviculturais. **Biomassa e Energia**. Viçosa, MG. n.2, p. 141-158, 2005.

BARROS, N. F. DE; NOVAIS, R. F. de. **Relação solo-eucalipto**. Viçosa, Ed. Folha de Viçosa, 1990.

BATES, L. S. WALDRENR.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water – stress studies. **Plant and Soil**. p. 205-207, 1973.

BRACKMANN, A.; BELLÉ, R.A.; STEFFENS, C. A.; SESTARI, I.; MELLO, A.M. Qualidade de *Zinnia elegans* ‘SCARLET’ EM SOLUÇÕES CONSERVANTES COM SACAROSE. **Revista Brasileira de Agrociências**. n.1, p.127-129, 2004.

BRAVO, L.A., ZÚÑIGA, G.E., ALBERDI, M., CORCUERA, L.J., The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimation in barley. **Physiologia Plantarum**. p.17–23, 1998.

BRAVO, L.A.; ULBOA, N.; ZÚÑIGA, E.G.; CASANOVA, A.; CORCUERA, L.J. ALBERDI, M. Cold resistance in Antarctic angiosperms. **Physiologia Plantarum**. n.11, p. 55-65, 2001.

BRIGAS, F.J.PAGUIN,R. RIOUX,J.A. THERRIEN, H.P. Influence of photoperiod and temperature on the development of frost tolerance, growth and contents of water, sugars, starch and proline of shoots and roots of juniper (*Juniperus chinensis* L. 'Pfitznerana') **Canadian Journal Plant Science.** n. 69, p. 305-3016. 1989.

CEPA/EPAGRI. Disponível em:<<http://www.cepa.epagri.sc.gov.br>> Acesso em: 17 out. 2008.

COUTO, L. C. et al. Vias de valorização energética da biomassa. **Biomassa e Energia.** n.1, p.93-104, 2004.

DURYEA, M.; McCLAIN, K. Altering seedling physiology to improve reforestation success. In: Proceedings of the Physiology Working Group Technical Session, Seedling Physiology and Reforestation Manual, Success I. (16th - 20th October, 1983, Oregon, USA). **Society of American Foresters National Convention Portland.** DURYEA, M. and BROWN, G. eds., p. 77-114, 1984.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. (Colombo, PR). **Zoneamento ecológico para plantios florestais no estado de Santa Catarina.** Colombo, 113p. (EMBRAPA-CNPF. Documentos, 21). 1988.

FILHO, E.P.; SANTOS, P.E.T. **Considerações sobre o plantio de *Eucalyptus dunnii* no estado do Paraná.** Comunicado Técnico Embrapa, Colombo, PR, n. 141, 2005.

FLINT, H.L.; BOYCE, B.R.; BEATTIE, D.J. Index of Injury – a useful expression of freezing injury to plant tissues as determined by the electrolytic method. **Canadian Journal Plant Science.** n.47, p.229-230, 1967.

GLERUM,C. Frost hardiness of coniferous seedlings: Principles and applications. **Ministry of Natural Resources.** Ontario, p. 107-122, 1985.

HANSON,A.D. and HITZ, W.D. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. **Plant Physiology.** n.33, p.163-203, 1982.

HANSON,A.D.; NELSON,C.E.;PEDERSEN,A.R. and EVERSON, E.H.; Capacity for proline accumulation during water stress in barley and its implication for breeding for drought resistance. **Crop Science.** n.19, p.489-493, 1979.

HEKNEBY, M.; ANTONÍN, M.C.; SÁNCHEZ-DIAS, M. Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. **Environmental and Experimental Botany**. n.55, p.305-314, 2006.

HIGA, R.C.V.; PEREIRA, J.C.D. **Usos Potenciais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage**. Comunicado Técnico Embrapa. Colombo, PR, n. 100. 2003

HIGA, A. R.; HIGA, R. C. V. Indicação de espécies para reflorestamento. In: GALVÃO, A. P. M. (Ed.). Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais: um guia para ações municipais e regionais. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, **Embrapa Florestas**. Colombo, PR, p. 101-124, 2000.

HIGA, R.C.V.; HIGA, A.R.; TREVISAN, R.; SOUZA, M.V.R. DE. Comportamento de vinte espécies de *Eucalyptus* em área de ocorrência de geadas na região sul do Brasil. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPT, 1997, Salvador. **Proceedings**. Colombo: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, p.106-110, 1997.

HIGA, A.R.; GARCIA, C.H.; SANTOS, E.T. Geadas, prejuízos à atividade florestal. **Silvicultura**. São Paulo. n.58, p.40-43, 1994.

JACOBSEN, S.-E.; MONTEROS, C.; CORCUERA, L.J; BRAVO, L.A.; CHRISTIANSEN, J.L.; MUJICA, A. Frost resistance mechanisms in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) **European Journal of Agronomy**. n.26, p. 471-475, 2007.

JOHNSON, J. CLINE, M. Seedlings quality of southern pines. In: DURYEY, M. DOUGHERTY, P. eds. **Forest Regeneration Manual**. Dordrecht, Netherlands, p. 143-159, 1991.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 398 p.

LEBORGNE, N.; TEULIERES, C.; TRAVERT, S.; ROLS, M.P.; TEISSIE, J. BOUDET, A.M. Introduction of specific carbohydrates into *Eucalyptus gunnii* cells increases their freezing tolerance. **European Journal of Biochemistry**. n. 3, p. 710-717, 1995.

LEVITT, J. **Responses of Plants to Environmental Stresses: Chilling, Freezing and High Temperatures Stresses**. New York: Academic Press, 1980. 344p.

MARSHALL, H. G. Breeding for tolerance to heat and cold. Christiansen M.N. & Lewis, C. F. (ed). **Breeding plants for less favourable environments** John Wiley & Sons, New York, p. 4-70, 1982.

MORAGA S. P.; ESCOBAR, R.; VALENZUELA, A. S. Resistance to freezing in three *Eucalyptus globulus* Labill subspecies. **Electronic Journal Biotechnology**. v.9, n.3, p.310-314, 2006.

MONTEROS, C.; JACOBSEN, S.-E. **Resistance of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to frost, In: Proceedings of COST 814- Workshop: Alternative Crops for Sustainable Agriculture**, Turku, Finland, p. 319-325, 1999.

NILSEN, E; ORCUTT, D. **The physiology of plants under stress**. John Wiley & Sons, INC. United States of America, p.704, 1996.

PALONEN, P.; JUNTILA, O. Cold hardening of raspberry plants in vitro is enhanced by increasing sucrose in the culture medium. **Physiologia Plantarum**. n. 4, p. 386-392, 1999.

PALTA, J. P., WEISS, L. S., HARBAGE, J. F., BAMBERG, J. B. STONE, J. M. Molecular mechanisms of freeze-thaw injury and cold acclimation in herbaceous plants: merging physiological and genetic approaches. **NATO AS**, n.16, p. 659-680,1993.

PALVA, E.T.; THITIHARJU, S.; TAMMINEN, I.; PUHAKAINEN, T.; LAITINEN, R.; SVENSSON, J.; HELENIUS, E. and HEINO, P. Biological mechanism of low temperature stress response: Cold acclimation and development of freezing tolerance in plants. **Japan International Research Center for Agricultural Sciences**. p.9-19. 2002.

SHVALEVA A., SILVA F.C.E., SCOTTI P., UFIR M.O. , HAUSMAN J.F. , CEDRIC G., RAMOS P. , ALMEIDA M.H., RODRIGUES M.L., PEREIRA J.S. , CHAVES M.M. Physiological and biochemical responses to low non-freezing temperature of two *Eucalyptus globulus* clones differing in drought resistance. **Annals of Forest Science**. n.2, 2008.

STEPONKUS, P. L., UEMURA, M. WEBB, M. S. Redesigning crops for increased tolerance to freezing stress. **NATO ASI Ser I** , n.16, p.697- 714, 1993.

SWAAIJ, van A.C.; JACOBSEN E.; FEENSTRA W.J.; Effect of cold hardening, wilting and exogenously applied proline on leaf proline content and frost tolerance of several genotypes of *Solanum*., **Physiologia Plantarum**. n.64, p. 230-236,1985.

TINUS, R.W.; BURR, K.E.; ATZMON, N.; RIOV, J. Relationship between carbohydrate concentration and root growth potential in coniferous seedlings from three climates during cold hardening and dehardening. **Three Physiology**. n.16, p.1097-1104, 2000.

VALENTINI, R., G. SCARASCIA-MUGNOZZA.; E. KUZMINSKY. Influence of cold hardening on water relations of three Eucalyptus species. **Three Physiology**. n.6, p.1-10, 1990.