

Tolerância ao resfriamento e congelamento de folhas de eucalipto

André Luís Lopes da Silva¹
 Yohana de Oliveira¹
 Giovana Bomfim de Alcantara¹
 Maisa dos Santos¹
 Marguerite Quoirin¹

clonageinvitro@yahoo.com.br, yohana@ufpr.br, giobomfim@ufpr.br, maisowisk@hotmail.com, mquoirin@ufpr.br

RESUMO

A maior restrição da cultura do eucalipto nas regiões sul do Brasil é o frio e a incidência de geadas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a tolerância de plantas de eucalipto ao resfriamento e congelamento. Foram testadas as espécies: *Eucalyptus saligna*, *E. camaldulensis* e *E. dunnii* e os híbridos *E. grandis* x *E. urophylla*, *E. maculata* x *E. sp.* e *E. benthamii* x *E. dunnii*. Plantas com 60 cm de altura foram cultivadas em substrato Plantmax[®] HT e mantidas em casa de vegetação. Discos foliares de 1 cm de diâmetro foram obtidos das terceiras e quartas folhas a partir do ápice das plantas. Os discos foliares foram lavados três vezes com água ultra-pura e secados em papel absorvente. Frascos contendo 20 mL de água ultra-pura, com 10 discos foliares, permaneceram 18h no escuro a 25 °C previamente a realização dos tratamentos. Os tubos com os discos foliares foram dispostos em criostato com as temperaturas: 4, 2, 0, -2 ou -4 °C por uma hora. A condutividade elétrica das amostras foi medida antes dos tratamentos (CD), após os tratamentos (CT) e após o armazenamento sob -80 °C por 24h (CF). A condutividade relativa foi estimada pela expressão $CR = (CT - CD)/(CF - CD)$, sendo usada para obtenção da viabilidade das células, estimada pela expressão $V(\%) = (1 - CR) \cdot 100$. A viabilidade das células não diferiu significativamente entre as temperaturas, porém houve diferenças significativas entre as plantas. A viabilidade das células do híbrido *E. maculata* x *E. sp.* foi significativamente inferior ($V=51\%$) às das demais espécies, que não diferiram entre si, variando entre 86,6 e 93,8%.

Palavras-Chave: Vazamento Iônico; *Eucalyptus*; Condutividade Relativa; Choque Térmico; Condutividade Eletrolítica; Estresse Abiótico.

Chilling and frost tolerance in eucalypt leaves

ABSTRACT

The largest restriction to eucalypt culture in the south of Brazil is due to cold and to the incidence of frosts. The aim of this work was to evaluate eucalypt plant tolerance to chilling and freezing. The species *Eucalyptus saligna*, *E. camaldulensis* and *E. dunnii* and the hybrids *E. grandis* x *E. urophylla*, *E. maculata* x *E. sp.* and *E. benthamii* x *E. dunnii* were tested. Plants with 60 cm of height were cultivated in substrate Plantmax[®] HT and maintained in a greenhouse. Leaf disks (1 cm of diameter) were obtained of the third and fourth leaves starting from the apex of the plants. Leaf disks were washed three times with ultra-pure water and dried in absorbent paper. Flasks containing 20 mL of ultra-pure water and 10 leaf disks were maintained at 25 °C in dark for 18h before treatments. The tubes within leaf disks were placed in cold bath at 4°C, 2°C, 0, -2°C and -4 °C for 1 h. Electrolytic conductivity from samples was measured before treatments (CD), after treatments (CT) and after storage at -80 °C for 24h (CF). Relative conductivity was estimated by $CR = (CT - CD)/(CF - CD)$, which was used to obtain cell viability $V(\%) = (1 - CR) \cdot 100$. The viability of the cells did not differ significantly among the temperatures; nevertheless there were significant differences among the plants. The viability of the cells of the hybrid *E. maculata* x *E. sp.* was significantly inferior ($V=51\%$) compared to the other species, that did not differ between them, varying between 86.6 and 93.8%.

Keywords: ionic leakage; *Eucalyptus*; relative conductivity; thermal shock; electrolytic conductivity; abiotic stress.

¹ Laboratório de Micropropagação de Plantas, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brasil.

INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus* é a espécie florestal mais plantada no mundo, chegando a 17,8 milhões de hectares de florestas plantadas, sendo o Brasil o segundo maior produtor. Várias espécies de eucalipto são cultivadas para a produção de madeira, celulose e papel (ALFENAS, et al., 2004). Entretanto, a ocorrência de geadas durante a estação de inverno, fenômeno comum nos estados do sul do Brasil, provoca danos em plantações de eucalipto, trazendo perdas consideráveis para o setor. Contudo, essas perdas podem variar dependendo da intensidade da geada e também da resistência que essas plantas apresentam contra o fenômeno (SELLE & VUADEN, 2008).

Existem espécies que aparentemente se comportam bem em toda essa extensão territorial do Brasil, como *Eucalyptus grandis*, *E. saligna* e *E. urophylla*, porém são sujeitas aos efeitos da geada (GOLFARI, et al., 1978). Algumas geadas que foram registradas no sul do Brasil provocaram perdas de até 100% em talhões de espécies suscetíveis, comprometendo o abastecimento de indústrias de base florestal (HIGA et al., 1994). Árvores de eucalipto afetadas por geada apresentam desde a queima de ponteiros até a morte total da parte aérea (SELLE & VUADEN, 2008).

O estresse a baixas temperaturas pode ser dividido em resfriamento, no qual a temperatura é suficientemente fria para causar injúria, mas não fria o bastante para congelar a planta, e o congelamento, que causa injúrias na planta quando a temperatura atinge o ponto de congelamento, ocorrendo à formação de cristais de gelo (TAIZ & ZEIGER, 2004). As primeiras consequências das injúrias provocadas pelo resfriamento são os danos causados nas membranas celulares, especialmente na membrana plasmática (STEPONKUS, 1979), como lesões e interrupção do suprimento de energia celular (LARCHER, 2000). Em seguida ocorre a morte celular. O objetivo desse trabalho foi avaliar a tolerância ao frio e ao congelamento de três espécies e três híbridos de *Eucalyptus* mediante a medição da condutividade eletrolítica.

MATERIAL E MÉTODOS

1 ESPÉCIES E HÍBRIDOS DE EUCALIPTO

Foram utilizados representantes de populações das espécies de *Eucalyptus saligna* Smith, *E. camaldulensis* Dehnh., *E. dunnii* Maiden e dos híbridos *E. grandis* Hill ex Maiden x *E. urophylla* Blake, *E. maculata* Hook x *E. sp.* e *E. benthamii* Maiden & Cambage x *E. dunnii* Maiden com ca. 60 cm de altura da parte aérea, cultivadas em sacos plásticos com 1400 cm³ do substrato Plantmax[®] HT. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação. Foram usados dez representantes de cada híbrido ou espécie.

2 TÉCNICA DE CONDUTIVIDADE ELETROLÍTICA

Discos foliares de 1,0 cm de diâmetro foram obtidos das terceiras e quartas folhas a partir do ápice de plantas de eucalipto. Os discos foliares foram lavados três vezes com água ultra pura e secados em papel absorvente. Tubos contendo 20 mL de água ultra pura e 10 discos foliares permaneceram 18 horas no escuro a 25° C antes da realização dos tratamentos com frio. Os tubos (contendo os discos foliares) foram submergidos em criostato nas temperaturas de 4°, 2°, 0°, -2° ou -4°C durante 1 hora (cada tratamento constou de uma única temperatura). A condutividade elétrica das amostras foi medida antes dos tratamentos (CD), após 18 horas da exposição aos tratamentos (CT) e 18 horas após o armazenamento sob -80°C por 24 horas (CF). A condutividade relativa (CR) foi estimada pela expressão:

$$CR = \frac{CT - CD}{CF - CD}$$

A condutividade relativa foi usada para estimar a viabilidade das membranas (V%) estimada pela seguinte expressão:

$$V(\%) = (1 - CR) \cdot 100$$

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições de dez discos foliares. Os experimentos foram conduzidos três vezes, e para as análises estatísticas foram usadas as três médias gerais como repetições. Os dados foram transformados para arco-seno $\sqrt{x/100}$. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. As análises foram realizadas com auxílio do programa computacional GENES (CRUZ, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferenças estatísticas entre os resultados para as temperaturas na faixa de 4° até -4° C (Tab. 1 e Fig.1). Entretanto, para as espécies e híbridos houve diferenças significativas (Tab. 1 e Fig. 2), porém não houve interação entre os fatores temperaturas e plantas (Tab. 1). As espécies *E. saligna*, *E. camaldulensis*, *E. dunnii* e os híbridos *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. benthamii* x *E. dunnii* não diferiram estatisticamente entre si, porém a viabilidade das membranas do híbrido *E. maculata* x *E. spp.* foi significativamente inferior às demais (Fig. 2).

O híbrido *E. maculata* x *spp.* apresentou suscetibilidade ao resfriamento a partir dos 4° C ao contrário das

demais plantas testadas que apresentaram tolerância ao resfriamento e até -4° C para congelamento. Entretanto, a espécie *E. maculata* que foi progenitora do híbrido *E. maculata* x sp., pertence ao subgênero *Corymbia* e é sistematicamente muito distante das demais espécies testadas e que foram usadas como progenitoras dos demais híbridos, as espécies *E. saligna*, *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. camaldulensis*, que pertencem ao subgênero *Symphyomyrtus*.

As espécies, *E. saligna*, *E. camaldulensis*, *E. dunnii*, os híbridos *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. benthamii* x *E. dunnii* apresentaram tolerância ao resfriamento e ao congelamento até -4° C (menor temperatura testada), medida pela condutividade eletrolítica. Contudo, temperaturas inferiores a -3 ou -4 °C causam danos nas plantas decorrentes do congelamento dos líquidos presentes nos espaços intercelulares, conseqüentemente levando a ruptura de membranas por compressão e extravasamento irreversível do citoplasma. (HIGA, et al., 1994).

A condutividade relativa não é uma medida direta do dano causado na célula e não é válida para simplesmente afirmar que o percentual de viabilidade da membrana é equivalente à percentagem de células mortas na amostra de disco foliar (PALTA & LI, 1978). Entretanto, a técnica de condutividade eletrolítica é uma poderosa ferramenta para discriminar genótipos em termos de resistência ao resfriamento e congelamento (BARTOLOZZI & FONTANAZZA, 1999).

CONCLUSÃO

Em conclusão, as células das espécies *E. dunnii*, *E. saligna*, *E. camaldulensis* e dos híbridos *E. benthamii* x *E. dunnii* e *E. grandis* x *E. urophylla* são tolerantes ao resfriamento e congelamento até -4°C, enquanto que as do híbrido *E. maculata* x *E. sp.* são suscetíveis. Sugere-se testes com temperaturas abaixo de -4°C para as espécies e híbridos tolerantes estudadas nesse trabalho.

AGRADECIMENTOS

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo do primeiro autor e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa do segundo autor. A EMBRAPA Colombo pela concessão das plantas.

REFERÊNCIAS

- [1] ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do Eucalipto**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 2004, 442p.
- [2] BARTOLOZZI, F.; FONTANAZZA, G. Assessment of frost tolerance in olive (*Olea europaea* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 81, p. 309-319, 1999.
- [3] CRUZ, C. D. **Programa Genes: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 2001, 648p.
- [4] GOLFARI, L.; CASER, R.L.; MOJRA, V.P.G. Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil. **Série técnica PRODEPEF**, v. 11 p. 1-66, 1978.
- [5] HIGA, A. R.; GARCIA, C. H.; SANTOS, E. T. Geadas, prejuízos à atividade florestal. **Silvicultura**, v.15, n. 58, p. 40-43, 1994.
- [6] LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000, 531p.
- [7] PALTA, J. P.; LI, P. H. Cell membrane properties in relation to freezing injury. In: LI, P. H.; SAKAI, A. **Plant cold hardiness and freezing stress**, vol. II. London: Academic Press, 1978. p. 93-115.
- [8] SELLE, G. L.; VUADEN, E. Efeitos da geada sobre plantações de *Eucalyptus grandis*. **Caderno de Pesquisa Série Biologia**, v. 20, n. 1, p. 36-44, 2008.
- [9] STEPONKUS, P. L. Effects of freezing and cold acclimation on membrane structure and function. In: MUSSEL, H.; STAPLES, R. C. **Stress Physiology in Crop Plants**. New York: Wiley-InterScience Publication, 1979, p. 143-158.
- [10] TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719p.

Tabela 1: Resumo da análise de variância da viabilidade das membranas celulares (%). Experimento bifatorial (6x5). Fator A (Espécies *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus dunnii* e os híbridos *E. grandis* x *E. urophylla*, *E. maculata* x *E. sp.* e *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*) e Fator B (temperatura, 4, 2, 0, -2 e -4 °C).

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Temperaturas	4	142,7	36,6	1,98 ^{ns}
Eucaliptos	5	20544,3	4108,8	229,05 [*]
Eucaliptos x Temperaturas	20	358,7	17,9	,0986 ^{ns}
Resíduo	60	1090,9	18,2	
CV(%)			5,05	

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F, ^{ns} não significativo.

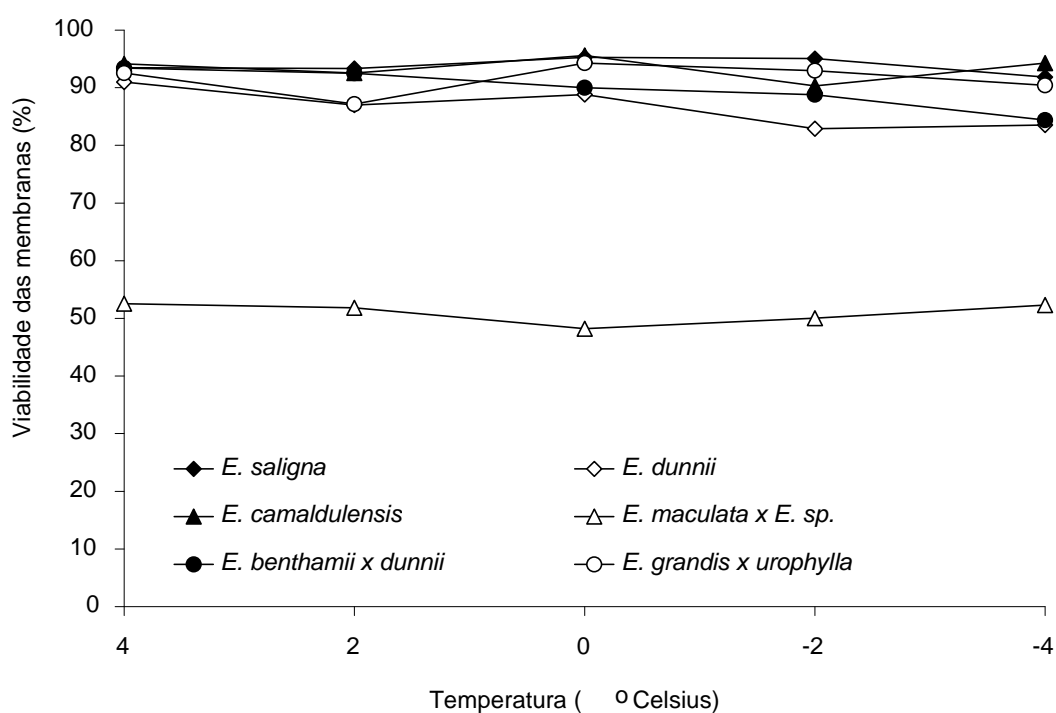


Figura 1: Viabilidade das membranas celulares (%) estimada pelo método da condutividade eletrolítica em espécies e híbridos de eucalipto sob resfriamento (4 e 2°C) e congelamento (0, -2 e -4°C).

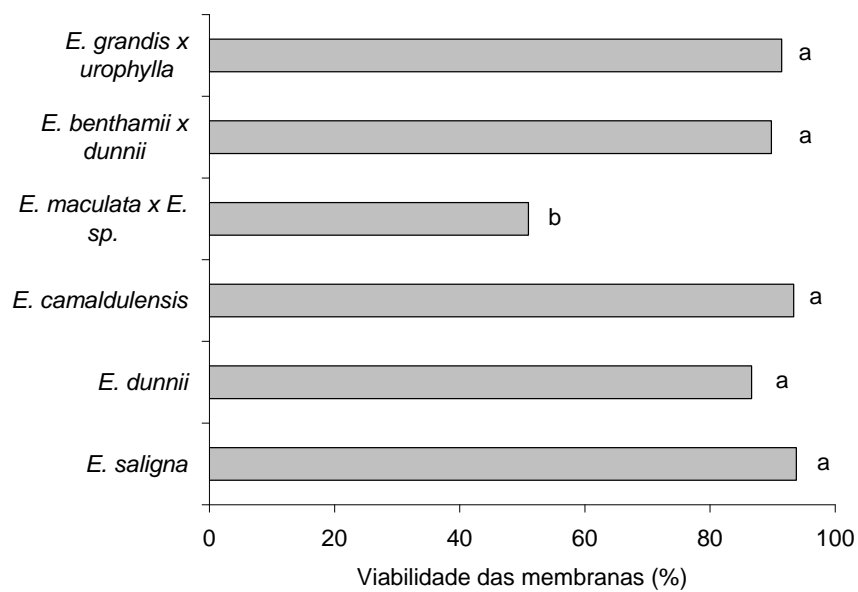


Figura 2: Média geral da viabilidade das membranas (%) dos híbridos e espécies de *Eucalyptus* avaliadas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.