

TOLERÂNCIA A BAIXAS TEMPERATURAS E ZONEAMENTO CLIMÁTICO DE ESPÉCIES FORRAGEIRAS NO ESTADO DO PARANÁ

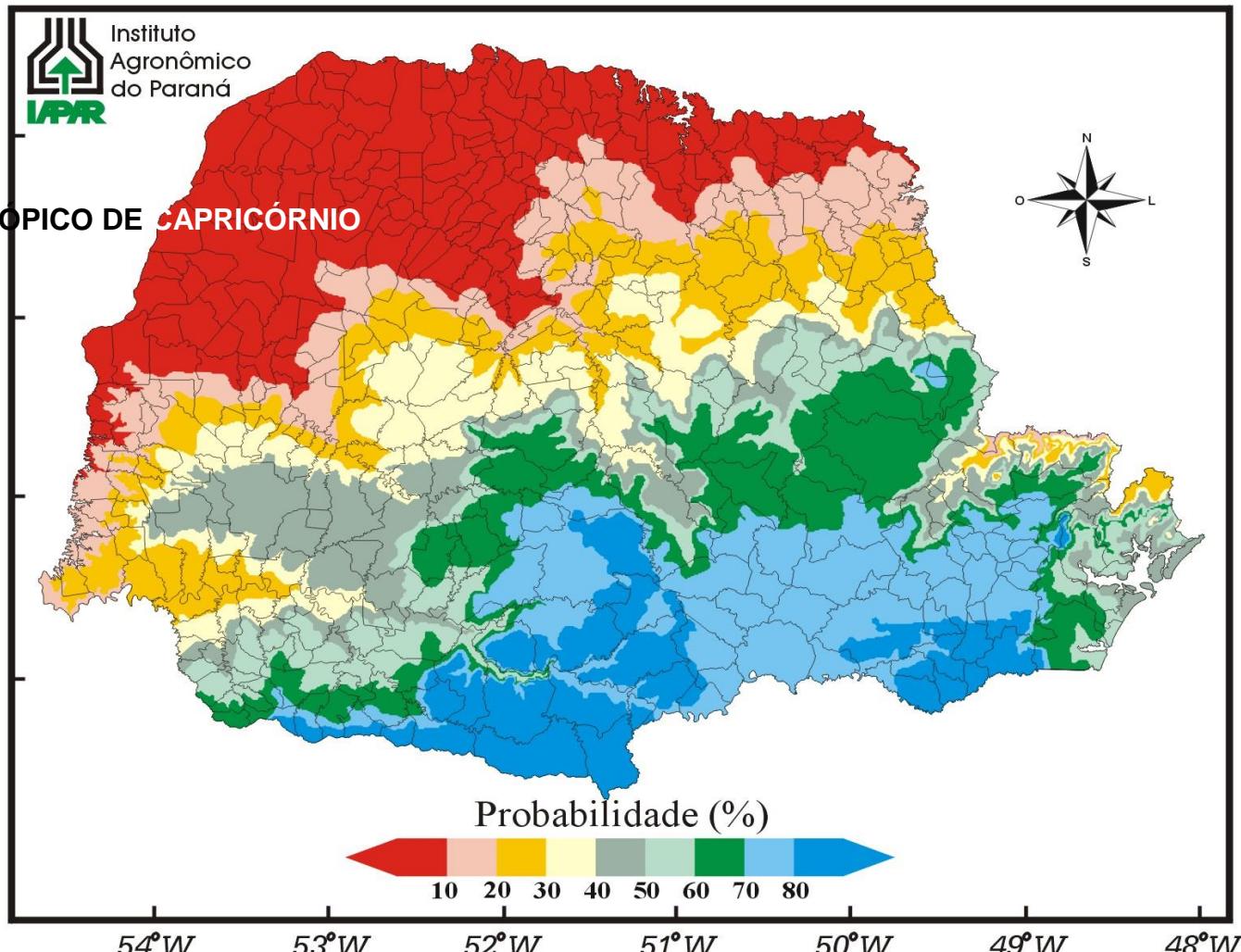
Doutorando: João Manetti Filho

Orientador: Prof. Dr. Fernando Braz Tangerino Hernandez

Co-orientador: Dr. Paulo Henrique Caramori



RISCOS DE GEADA NO PARANÁ



A MAIOR GEADA DO SÉCULO

18 de julho de 1975
Geada dizimou todas as
plantações de café do Paraná
2,6 milhões de pessoas

<http://revistacafeicultura.com.br/?mat=34022>



Estrutura da tese

- 1. Avaliação da tolerância ao frio em ambiente controlado**
- 2. Zoneamento agroclimático das espécies forrageiras estudadas**

Estrutura da tese

- 1. Avaliação da tolerância ao frio em ambiente controlado
 - Avaliação dos danos com base na fluorescência da clorofila e condutividade elétrica.
 - Análises de proteínas associadas ao mecanismo de danos por frio
 - Anatomia foliar de plantas danificadas por baixas temperaturas

Objetivo

- Avaliar a tolerância de espécies forrageiras a temperaturas baixas utilizando metodologia **quantitativa**, com base na fluorescência da clorofila e condutividade elétrica.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies de forrageiras estudadas

Brachiaria brizantha (cv Marandu)



MATERIAL E MÉTODOS

Espécies de forrageiras estudadas

Panicum maximum (cv mombaça)



MATERIAL E MÉTODOS

Espécies de forrageiras estudadas

Pennisetum glaucum (milheto)



MATERIAL E MÉTODOS

Espécies de forrageiras estudadas

Sorghum bicolor (sorgo)



MATERIAL E MÉTODOS

Espécies de forrageiras estudadas

Avena strigosa (aveia preta)



MATERIAL E MÉTODOS

Espécies de forrageiras estudadas

Medicago sativa (alfafa)



MATERIAL E MÉTODOS

Espécies de forrageiras estudadas

Cynodon spp (cv Tifton 85)



Material e Métodos







A photograph showing several potted corn plants. In the foreground, a white plastic marker is stuck into a black pot. The marker has handwritten text that reads: "SORGO", "10/07/13", and "BRS 506". The plants have long, green, blade-like leaves. The pots are arranged on a dark surface, likely a table.

SORGO
10/07/13
BRS 506

Material e Métodos

0°, -1°, -2°, -3°, -4°, -5° e -6° C, durante 1 hora



Material e Métodos

- **Fluorescência:**

Epiderme adaxial

Fluorescência inicial (F_0)

Fluorescência máxima (F_m)

Fluorescência variável (F_v)

Eficiência quântica do PS II (F_v/F_m)

Fluorescência da clorofila

- A relação F_v/F_m estima a eficiência da excitação energética capturada pelo PSII (GENTY et al., 1989)
- 0,75 a 0,85 variação indica alteração no sistema fotoquímico da planta (BOLHÀR-NORDENKAMPF & ÖQUIST, 1993)

GENTY, B. et al. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v.990, n.1, p.87-92, 1989.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; ÖQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: **Photosynthesis and production in a changing environment**. Springer Netherlands, 1993. p.193-206.

Multi-Mode Chlorophyll Fluorometer



Material e Métodos

Condutividade elétrica

- lixiviação dos eletrólitos da membrana celular
após o estresse por baixa temperatura

BARRANCO, D. et al. Frost tolerance of eight olive
cultivars. **HortScience**, v.40, n.3, p.558-560, 2005.

Material e Métodos

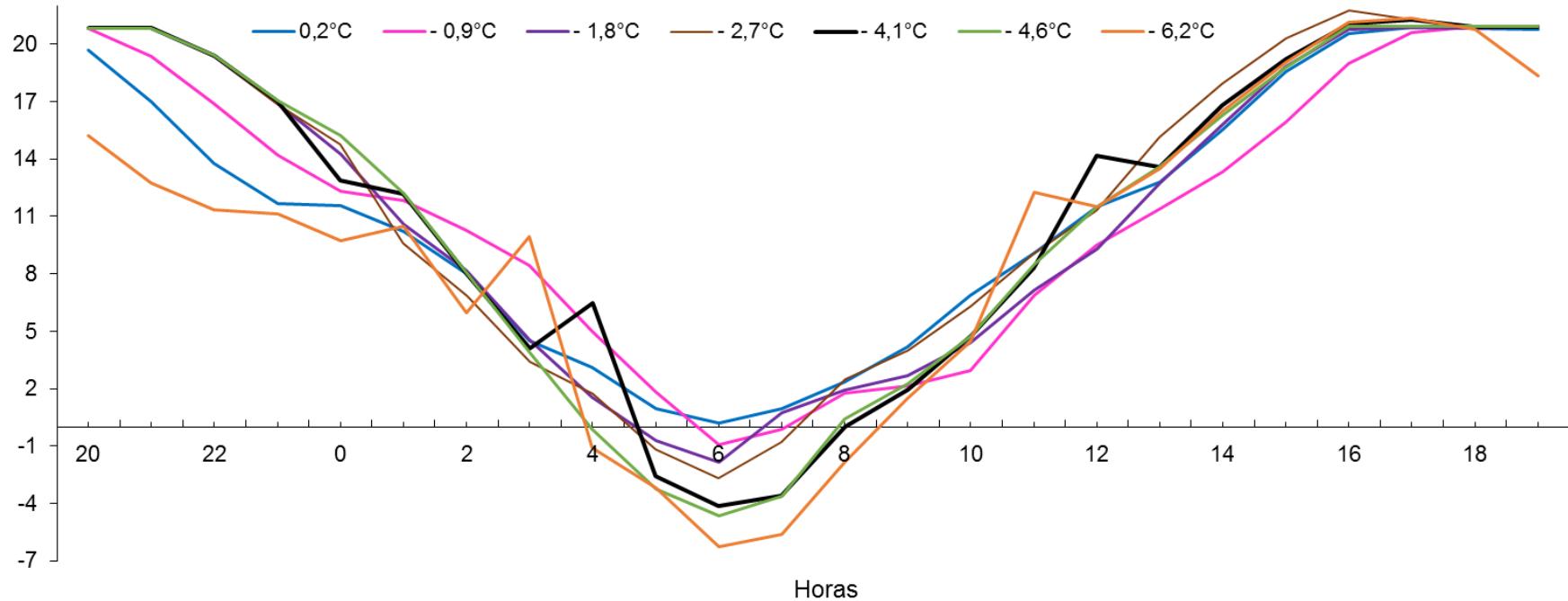
- **Condutividade elétrica:**

Após teste de frio, as folhas foram cortadas em Secções de 1cm²

10 secções/planta, foram imersas em 20mL de água deionizada, a 25°C por 24 horas, ($\mu\text{S cm}^{-1}$)



Temperatura (°C)



Curvas de temperaturas correspondentes aos testes realizados na câmara de crescimento.

Tabela 3.1. Eficiência quântica do fotossistema PSII (Fluorescência - Fv/Fm) em plantas forrageiras submetidas a baixas temperaturas (°C) em câmara de crescimento.

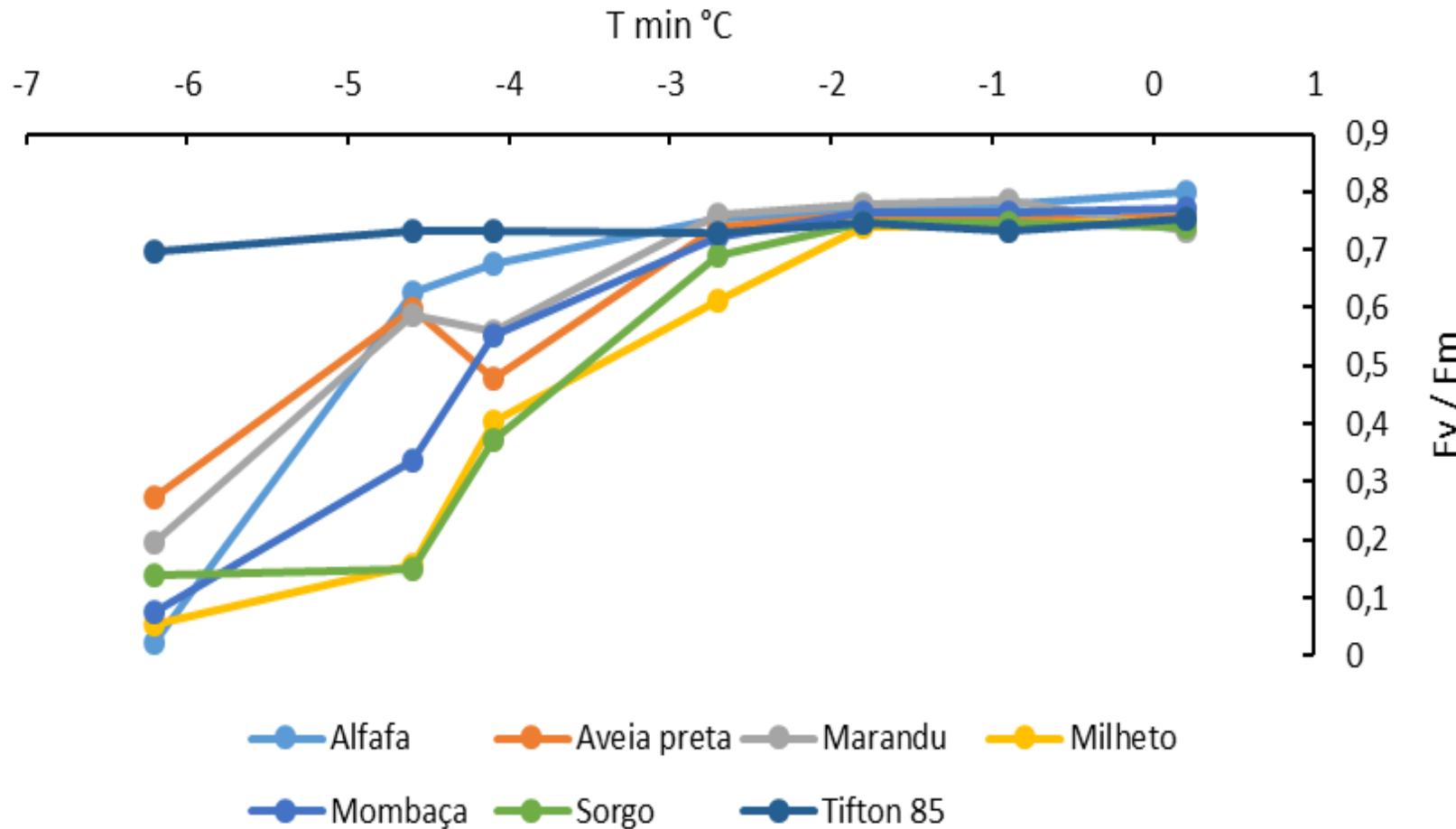
Tratamentos		Espécies						
Temperaturas		Alfafa	Aveia-preta	Marandu	Milheto	Mombaça	Sorgo	Tifton 85
0,2		0,799 a*	0,758 a	0,732 a	0,750 a	0,772 a	0,738 a	0,754a
-0,9		0,778 a	0,755 a	0,784 a	0,742 a	0,764 a	0,746 a	0,734a
-1,8		0,767 a	0,761 a	0,778 a	0,741 a	0,763 a	0,747 a	0,748a
-2,7		0,752 a	0,741 a	0,759 a	0,612ab	0,721 a	0,690 a	0,729a
-4,1		0,677 a	0,477 ab	0,560 a	0,404 b	0,553 ab	0,371 b	0,734a
-4,6		0,628 a	0,598 a	0,587 a	0,155 c	0,338 bc	0,150 b	0,734a
-6,2		0,024 b	0,272 b	0,194 b	0,056 c	0,076 c	0,139 b	0,696a
CV%		20,1	27,4	27,81	25,6	29,4	27,4	6,0
DMS		0,23	0,31	0,32	0,23	0,30	0,25	0,08

*Médias seguidas de letras minúsculas na coluna não diferem estaticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

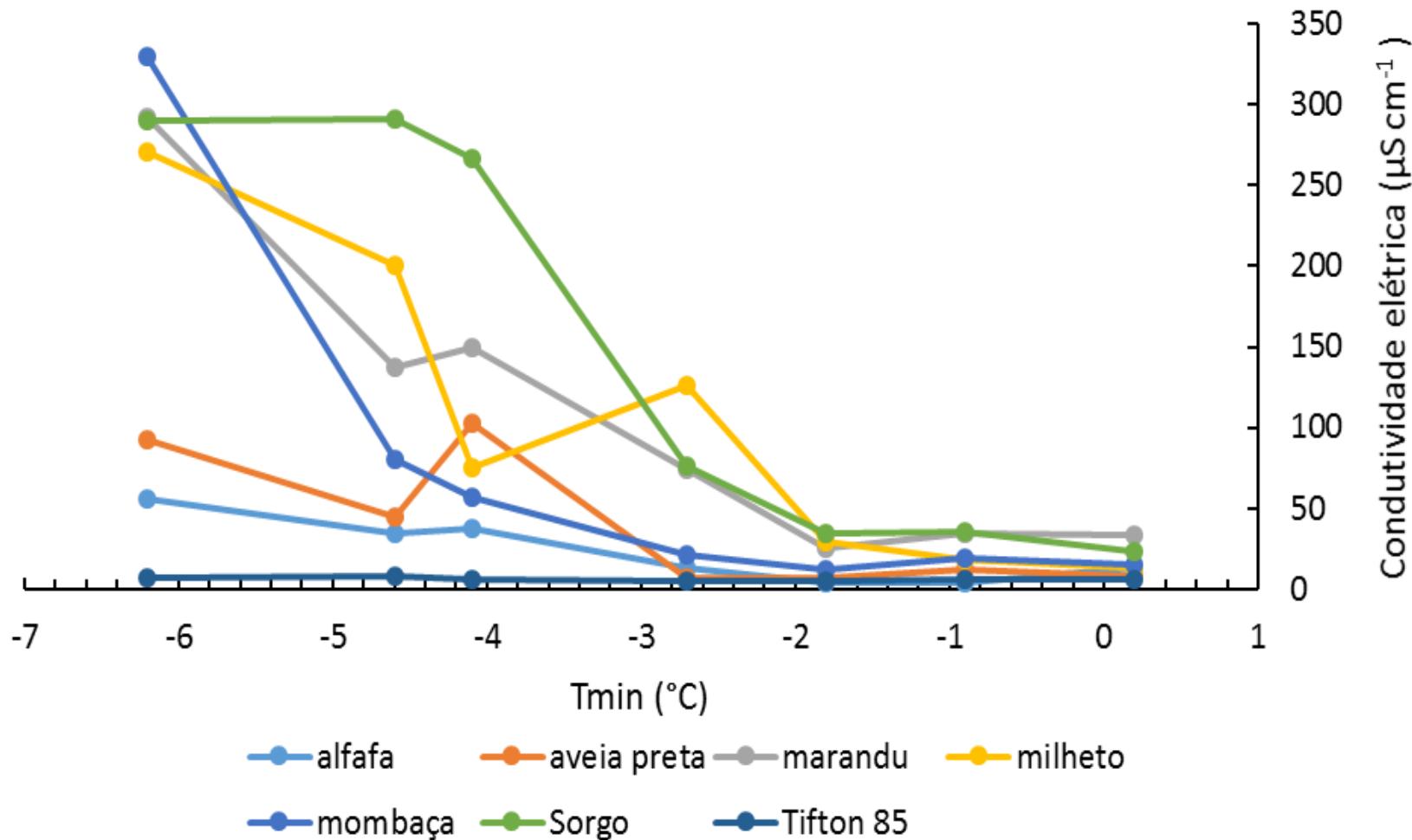
Tabela 3.2. Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) da solução de embebição de folhas de forrageiras submetidas a baixas temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) em câmara de crescimento.

Tratamentos		Espécies						
Temperaturas		Alfafa	Aveia-preta	Marandu	Milheto	Mombaça	Sorgo	Tifton 85
Inicial		6,44 b*	6,24 b	24,08 c	25,11 c	12,30 b	46,46 b	7,41a
0,2		13,23 b	7,84 b	32,97 bc	12,86 c	14,77 b	23,44 b	5,88a
-0,9		4,57 b	11,59 b	34,29 bc	18,35 c	19,38 b	35,68 b	5,79a
-1,8		3,67 b	7,27 b	25,34 c	29,46 c	12,22 b	34,67 b	4,96a
-2,7		12,63 b	7,03 b	73,71 bc	126,51bc	21,18 b	75,74 b	4,74a
-4,1		37,76 ab	102,50 a	149,60 b	75,37 bc	57,20 b	266,38a	5,59a
-4,6		34,10 ab	44,14 ab	137,41bc	200,31ab	80,62 b	291,03a	7,98a
-6,2		55,68 a	92,03 a	292,28 a	270,58 a	329,58 a	290,40a	6,76a
CV%		106,4	98,69	67,44	79,03	80,91	55,06	42,8
DMS		41,28	63,45	96,21	138,32	102,16	135,15	4,85

*Médias seguidas de letras minúsculas na coluna não diferem estaticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Eficiência quântica do PS II (F_v/F_m) para forrageiras submetidas a diferentes temperaturas mínimas.



Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) da solução de embebição de folhas de forrageiras submetidas a baixas temperaturas.

Conclusões

Os métodos empregados revelaram-se adequados para avaliar tolerância ao frio em forrageiras.

As seguintes temperaturas foram identificadas no início dos danos celulares:

- Milheto $-1,8^{\circ}\text{C}$
- Sorgo e Aveia preta $-2,7^{\circ}\text{C}$;
- Marandu e Alfafa $-4,6^{\circ}\text{C}$
- Tifton 85, sem danos até $-6,2^{\circ}\text{C}$.
- Mombaça $-2,7^{\circ}\text{C}$ (Fv/Fm) e $-4,6^{\circ}\text{C}$ (Cond.)

Estrutura da tese

- **1. Avaliação da tolerância ao frio em ambiente controlado**
 - Avaliação dos danos com base na fluorescência da clorofila e condutividade elétrica
 - **Análises de proteínas associadas ao mecanismo de danos por frio**
 - Anatomia foliar de plantas danificadas por baixas temperaturas

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de folhas, armazenadas temperatura de -80 °C.

250 mg de tecido foliar, macerado em 5 mL tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), PVP 4% (p/v), previamente resfriado a 4°C.

**Centrifugou-se por 10 min a 4°C, aceleração de 785,4 rad s⁻¹,
Sobrenadante análises.**

Proteína total, realizada pelo método Bradford (1976).

catalase (CAT). Consumo de H₂O₂ espectrofotometria a 240 nm, (PEIXOTO et al., 1999).

**ascorbato peroxidase (APX) Redução de H₂O₂ a H₂O através da oxidação do ascorbato.
A leitura em 290 nm (PEIXOTO et al., 1999).**

Superóxido dismutase (SOD). Inibir a redução fotoquímica do NBT (Nitroblue tetrazolium), que leva à formação de um precipitado de cor azul denominado formazana. (DEL LONGO et al., 1993). Espectrofotômetro a 560 nm (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977).

Tabela 4.1. Teor de proteína (mg proteína/g de matéria fresca) de plantas de espécies forrageiras submetidas a estresse por baixas temperaturas.

Espécies	Temperatura °C							CV (%)
	0,2	-0,9	-1,8	-2,7	-4,1	-4,6	-6,2	
Alfafa	2,667 c*	2,532 c	2,992 bc	4,487 ab	4,945 a	5,385 a	5,732 a	15,9
Aveia	3,545 a	3,625 a	3,165 a	3,555 a	3,6097 a	3,112 a	3,727 a	24,8
Marandu	1,435 ab	1,497 a	1,496 a	1,235 ab	1,055 b	1,327ab	1,262 ab	12,7
Milheto	1,532 a	1,270 a	1,431 a	1,370 a	1,451 a	1,244 a	1,235 a	30,4
Mombaça	0,955 abc	0,892 bc	0,660c	1,040 abc	1,315 ab	1,052 abc	1,450 a	21,4
Sorgo	1,282 ab	1,147 b	1,187 ab	1,855 a	1,207 ab	1,115 b	1,225 ab	23,2
Tifton	1,687 abc	1,577 abc	1,160 bc	2,310 ab	0,775 c	1,575 abc	2,665 a	31,2

*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 4.2. Atividade da enzima catalase - CAT (mmol H₂O₂.min⁻¹.mg proteína⁻¹) de plantas de espécies forrageiras submetidas ao estresse por baixas temperaturas.

Espécies	Temperatura °C							CV (%)
	0,2	-0,9	-1,8	-2,7	-4,1	-4,6	-6,2	
Alfafa	0,050 a*	0,040 ab	0,021 ab	0,015 b	0,027 ab	0,016 b	0,011 b	49,4
Aveia	0,070 a	0,062 a	0,068 a	0,063 a	0,055 a	0,063 a	0,047 a	24,9
Marandu	0,035 ab	0,029 ab	0,020 b	0,024 ab	0,041 a	0,021 ab	0,036 ab	29,4
Milheto	0,016 bc	0,025 ab	0,012 c	0,036 a	0,025 ab	0,006 c	0,005 c	29,9
Mombaça	0,018 a	0,016 a	0,021 a	0,021 a	0,033 a	0,018 a	0,018 a	50,3
Sorgo	0,027 a	0,030 a	0,013 ab	0,018 ab	0,019 ab	0,007 b	0,007 b	50,2
Tifton	0,048 a	0,025 ab	0,025 ab	0,021 b	0,021 b	0,007 b	0,009 b	51,0

*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 4.3. Atividade da enzima ascorbato peroxidase - APX ($UA \cdot min^{-1} \cdot mg MF^{-1}$) de plantas de espécies forrageiras submetidas ao estresse por baixas temperaturas.

Espécies	Temperatura °C							CV (%)
	0,2	-0,9	-1,8	-2,7	-4,1	-4,6	-6,2	
Alfafa	0,745 a*	0,502 ab	0,360 b	0,590 ab	0,680 ab	0,710 a	0,577 ab	25,6
Aveia	0,777 a	0,595 ab	0,365 b	0,535 ab	0,830 a	0,537 ab	0,552 ab	29,4
Marandu	1,192 a	0,990 ab	0,707 bc	0,670 bc	0,372 c	0,472 c	0,422 c	26,0
Milheto	0,587 b	0,435 ab	0,357 b	0,352 b	0,357 b	0,330 b	0,280 b	23,6
Mombaça	1,112 ab	1,442 a	1,510 a	1,017 ab	0,550 b	0,575 b	0,552 b	34,3
Sorgo	0,680 a	0,550 ab	0,337 b	0,312 b	0,310 b	0,295 b	0,325 b	33,9
Tifton	0,630 a	0,427 ab	0,310 b	0,425 ab	0,332 b	0,372 ab	0,270 b	28,8

*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 4.4. Atividade da enzima superóxido dismutase - SOD (UA.min⁻¹.mg proteína⁻¹) de plantas de espécies forrageiras submetidas ao estresse por baixas temperaturas.

Espécies	Temperatura °C							CV (%)
	0,2	-0,9	-1,8	-2,7	-4,1	-4,6	-6,2	
Alfafa	15,39 a*	13,47 a	13,72 a	10,58 a	12,92 a	11,50 a	13,18 a	47,1
Aveia	22,66 a	32,75 a	37, 30 a	30, 27 a	38, 22 a	22, 32 a	28, 08 a	40,5
Marandu	96,14 ab	62,91 ab	52,16 bc	107,82 a	30,61 c	58,32 abc	32,76 c	34,9
Milheto	26,83 a	53,30 a	70,41 a	54,60 a	46,16 a	28,19 a	61,89 a	44,0
Mombaça	9,28 d	122,67 bc	240,21 a	165,79 ab	59,29 cd	55,50 cd	39,87 cd	39,8
Sorgo	88,12 ab	42,00 b	125,02 a	39,82 b	48,86 b	71,04 ab	70,08 ab	46,3
Tifton	60,33 ab	59,65 ab	62,38 ab	46,14 ab	102,37 a	56,36 ab	30,44 b	48,5

*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

CONCLUSÕES

A metodologia utilizada mostrou-se adequada para avaliações quantitativas.

O estresse por baixas temperaturas tem um ponto inicial diferente para cada espécie.

Observa um estímulo distinto na produção de enzimas antioxidantes.

sorgo -1,8°C

Milheto, Marandu e Mombaça -2,7°C

aveia -4,1°C;

alfafa -4,6°C;

tifton, -6,2°C.

Estrutura da tese

- **1. Avaliação da tolerância ao frio em ambiente controlado**
 - Avaliação dos danos com base na fluorescência da clorofila e condutividade elétrica
 - Análises de proteínas associadas ao mecanismo de danos por frio
 - **Anatomia foliar de plantas danificadas por baixas temperaturas**

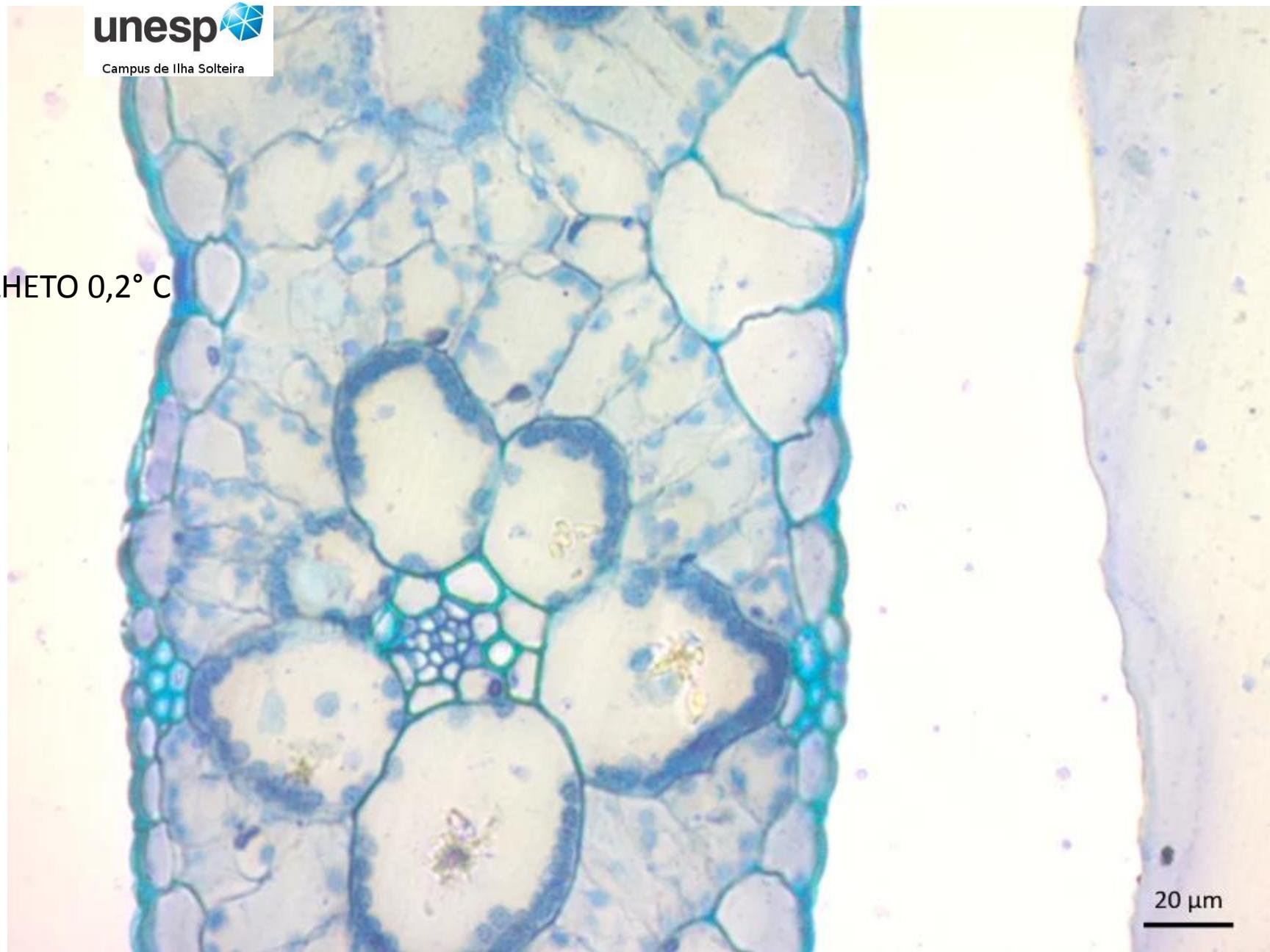
MATERIAL E MÉTODOS

- O material vegetal foi fixado FAA (Johansen, 1940).
- Desidratadas em série etílica.
- Incluídas em hidroxi-etil-metacrilato
- Blocos obtidos foram seccionados a 8-10 μM
- Corado com azul de toluidina (Sakai, 1973).
- As lâminas montadas em resina sintética
- A biometria foi realizada software : Image J
(<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>)

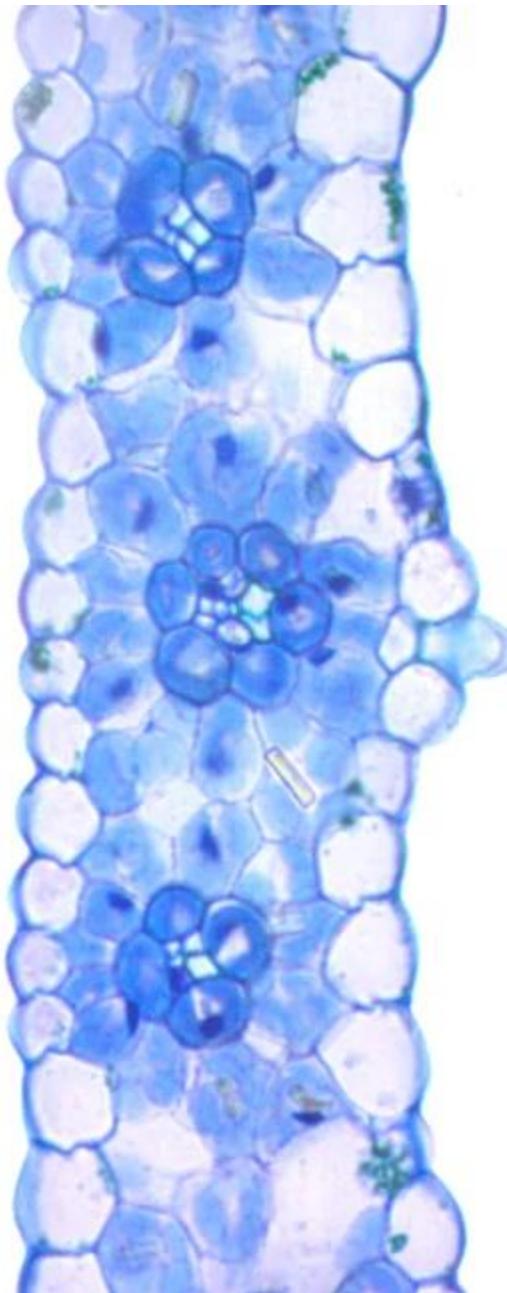
Tabela 5.7. Espessura média para epiderme adaxial e abaxial, célula buliforme, parênquima radiado e espessura total da folha de capim Mombaça para as temperaturas de 0,2 -4,1, -4,6 e -6,2°C.

Temperatura (°C)	Epiderme Adaxial (μm)	Epiderme Abaxial (μm)	Célula Buliforme (μm)	Parênquima Radiado (μm)	Espessura Total (μm)
0,2	11,29 a	8,69 a	38,36 a	17,65 a	108,12 a
-4,1	8,40 b	8,57 a	26,84 b	14,04 b	85,95 b
-4,6	8,48 b	8,33 a	21,06 c	12,14 c	75,099 c
-6,2	6,71 c	6,16 b	0,00 d	0,00 d	64,42 d
CV (%)	26,66	24,57	13,00	13,08	10,58

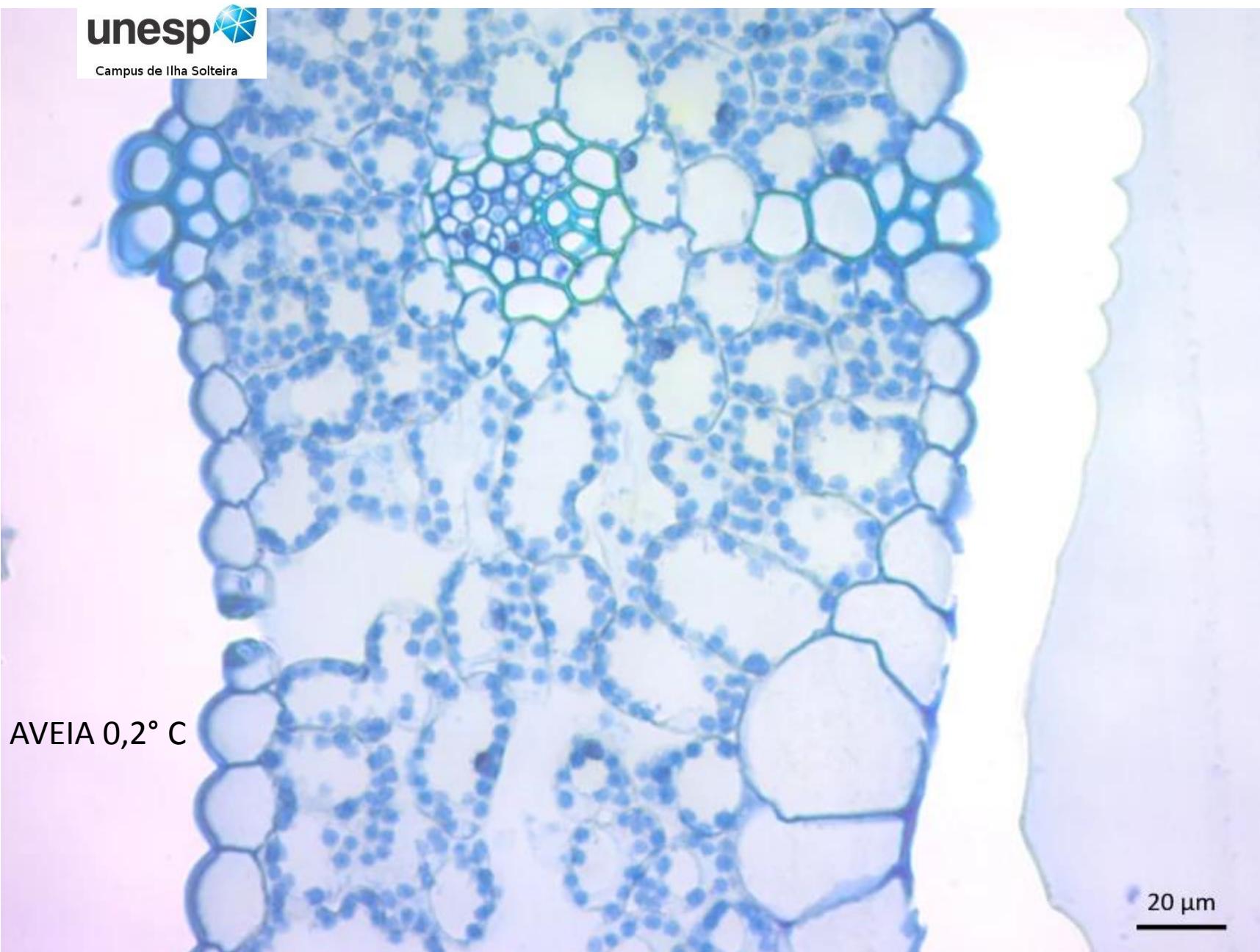
MILHETO 0,2° C

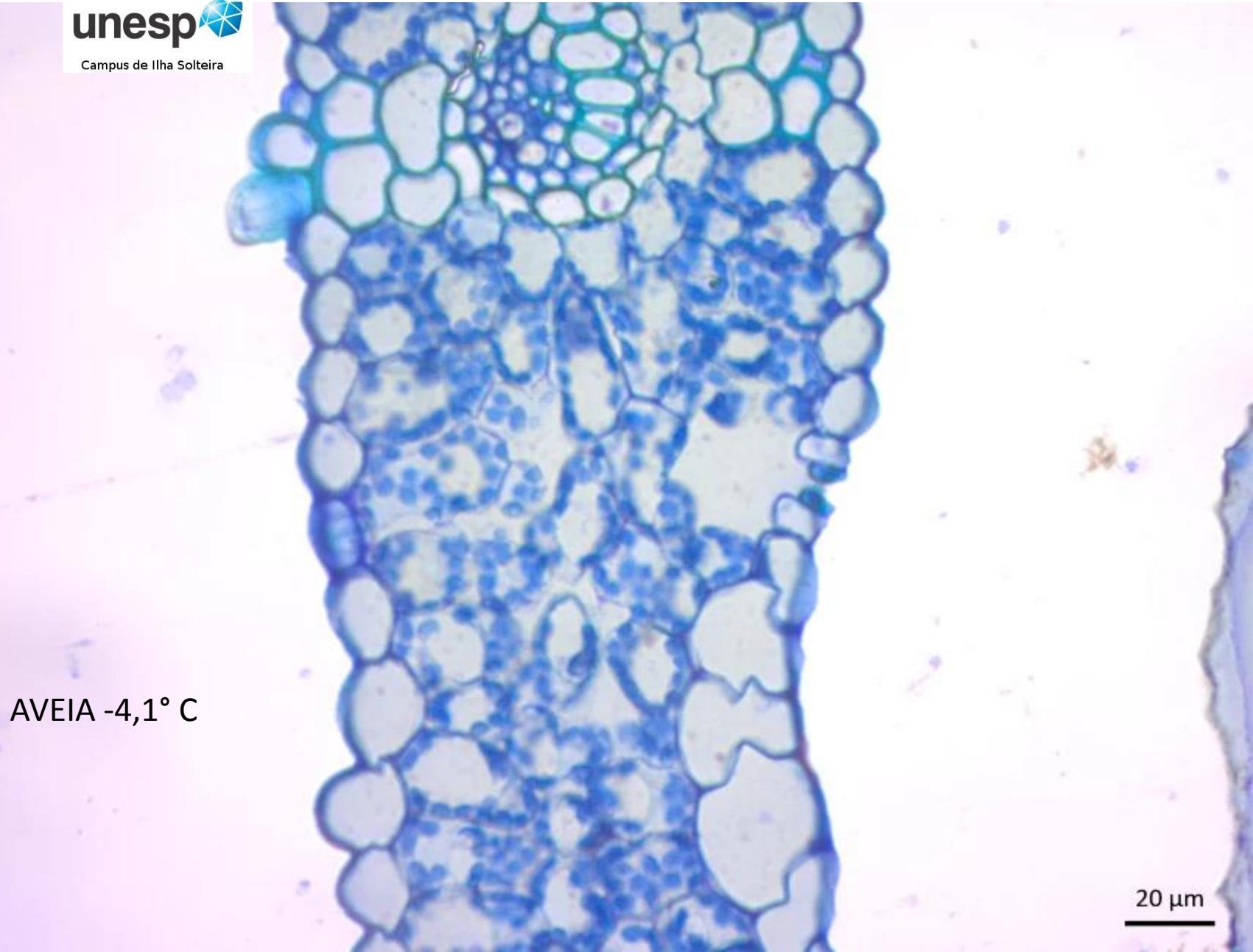


MILHETO -2,7° C



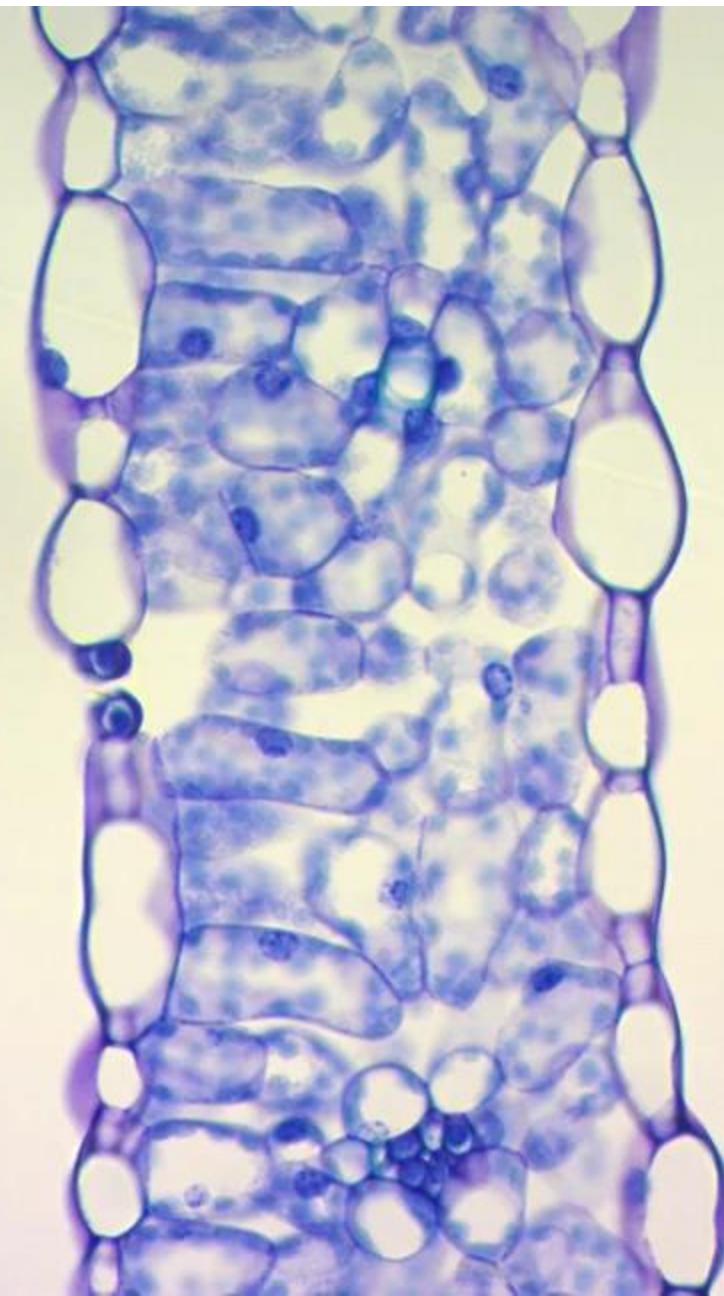
20 μ m







ALFAFA -6,2° C

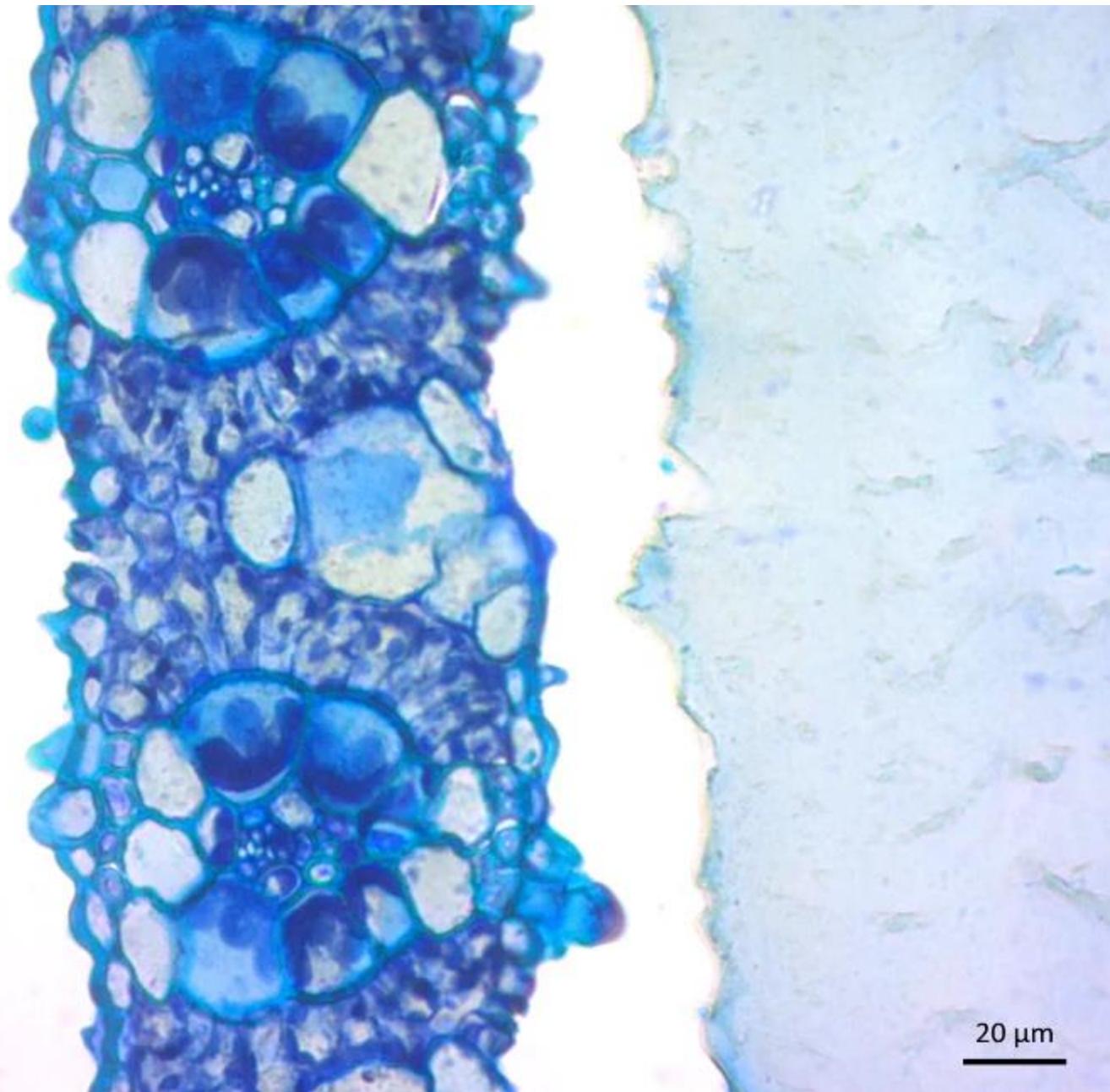


20 μ m



20 μ m

TIFTON -6,2°C



Anatomia		
Alfafa	-4.1	
Tifton 85	-6.2	
Mombaça	-4.1	
Sorgo	-2.7	
Milheto	-2.7	
Marandu	-2.7	
Aveia	-4.1	

RESUMO DE TODOS TRABALHOS

	Fv/Fm	Condutiv.	Bioquímica	Anatomia	GRAF.FL	GRAF.LIX	Geral
Alfafa	-4.6	-4.6	-4.6	-4.1	-2.7	-2.7	-4.6
Tifton 85	-6.2	-6.2	-6.2	-6.2	-4.6	-6.2	-6.2
Mombaça	-2.7	-4.6	-2.7	-4.1	-2.7	-2.7	-2.7
Sorgo	-2.7	-2.7	-1.8	-2.7	-1.8	-2.7	-1.8
Milheto	-1.8	-1.8	-2.7	-2.7	-1.8	-1.8	-1.8
Marandu	-4.6	-4.6	-2.7	-2.7	-2.7	-1.8	-2.7
Aveia	-2.7	-2.7	-4.1	-4.1	-2.7	-2.7	-4.1

Estrutura da tese

- 2. Zoneamento agroclimático das espécies forrageiras estudadas

Etapas do Zoneamento

TEMPERATURA DE CORTE

Geral	
Alfafa	-4.6
Tifton 85	-6.2
Mombaça	-2.7
Sorgo	-1.8
Milheto	-1.8
Marandu	-2.7
Aveia	-4.1

Etapas do Zoneamento

- PARA CADA MÊS, DEFINIR A TEMPERATURA MÍNIMA ABSOLUTA ANO A ANO PARA TODA A SÉRIE

- PALMAS –PR Julho

Ano	Tmin_Absol °C
1976	-4,8
1977	-3,8
1978	-3,8
1979	-1,6
1980	0,3
1981	-1,6
1982	-4,2

Etapas do Zoneamento

AJUSTAR OS DADOS À DISTRIBUIÇÃO DE EXTREMOS

$$f(X) = \frac{1}{\beta} e^{-\frac{X-\alpha}{\beta}} e^{-e^{-\frac{X-\alpha}{\beta}}}$$

função densidade de probabilidade

$$F(X) = e^{-e^{\pm \frac{X-\alpha}{\beta}}}$$

cumulativa

Parâmetros α e β são estimados pelo método de Lieblein.

Assis; Arruda; Pereira (1996)

Palmas-PR

Probabilidade %	Tmin °C
100	-2,33
90	-2,06
80	-1,76
70	-1,43
60	-1,04
50	-0,57
40	-0,01
30	0,72
20	1,74
10	3,50

Etapas do Zoneamento

- Regressões lineares múltiplas entre Tmin vs altitude, latitude e longitude para cada mês

$$\text{Tmin} = a \text{ Alt} + b \text{ Lat} + c \text{ Lon}$$

a, b, c = coeficientes

- Dados de Tmin ajustados à Distribuição de Extremos transferidos para o SIG ArcGis
- Geração dos valores de Tmin por pixel de 900 x 900m Shuttle Radar Topography Mission (FARR; KOBRICK, 2000)

ESTAÇÃO	Lat	Lon	Alt	P100
ANTONINA	-25,22	-48,80	60	4,91
APUCARANA	-23,50	-51,53	746	3,57
BANDEIRANTES	-23,10	-50,35	440	4,00
BELA V. PARAÍSO	-22,95	-51,20	600	5,06
CÂNDIDO DE ABREU	-24,63	-51,25	645	1,49
CAMBARÁ	-23,00	-50,03	450	2,55
CASCAVEL	-24,88	-53,55	660	0,78
CERRO AZUL	-24,82	-49,25	360	2,54
CIANORTE	-23,67	-52,58	530	3,15
CLEVELÂNDIA	-26,42	-52,35	930	-1,78
FRANCISCO BELTRÃO	-26,08	-53,07	650	-0,50
GUARAPUAVA	-25,38	-51,50	1026	-2,13

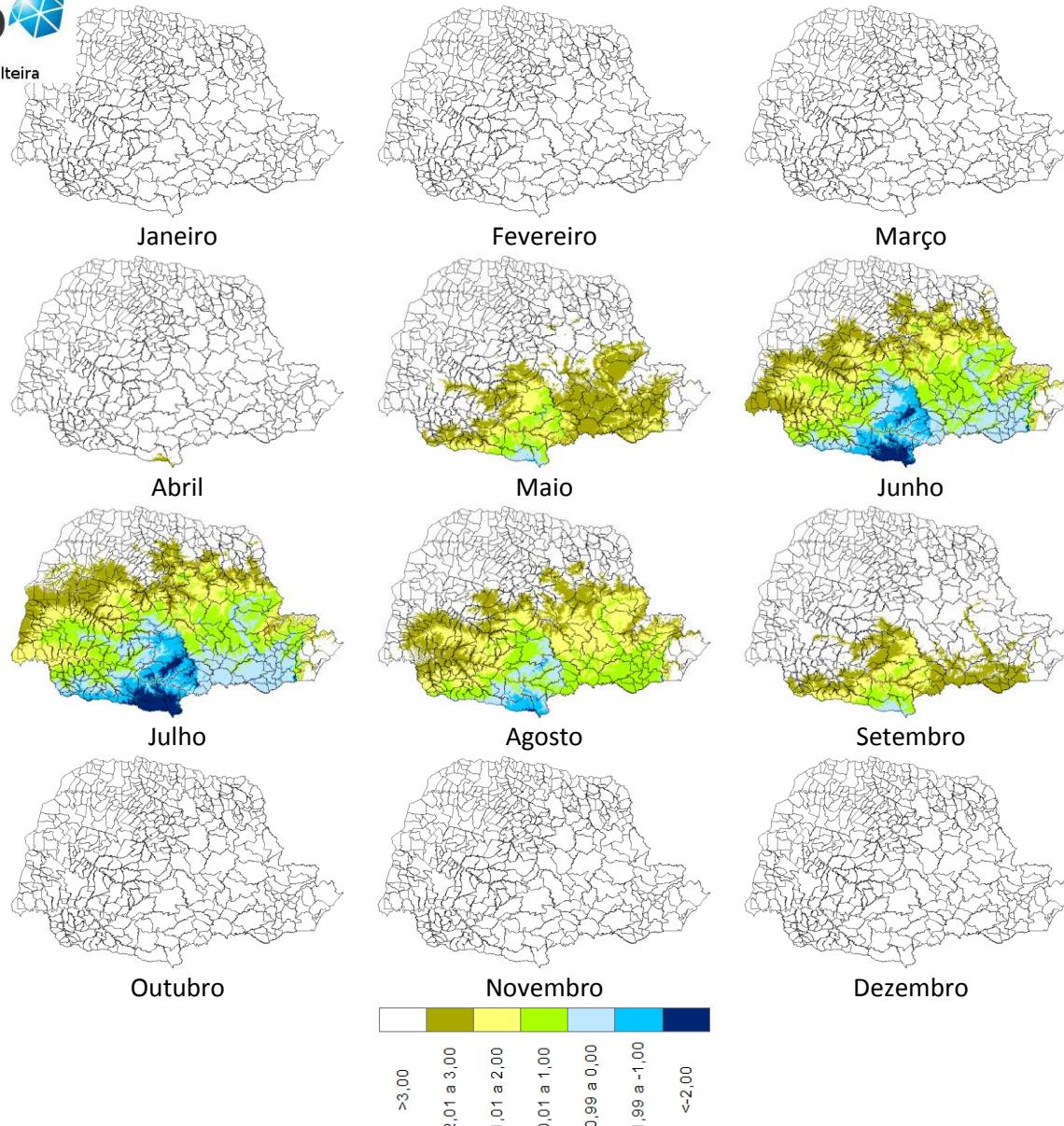


Figura 6.1. Riscos de ocorrência de geadas por mês no Estado do Paraná, de acordo com as probabilidades de ocorrência de temperaturas mínimas de abrigo.

Regiões com riscos de ocorrerem temperaturas mínimas de **abrigó** abaixo de 3, 2, 1, 0, -1 e -2°C para o estado do Paraná.

Gradiente médio de 4°C entre o abrigó e a relva (SENTELHAS et al., 1995; ROSISCA et al., 2015).

Correspondem: -1, -2, -3, -4, -5 e -6°C.

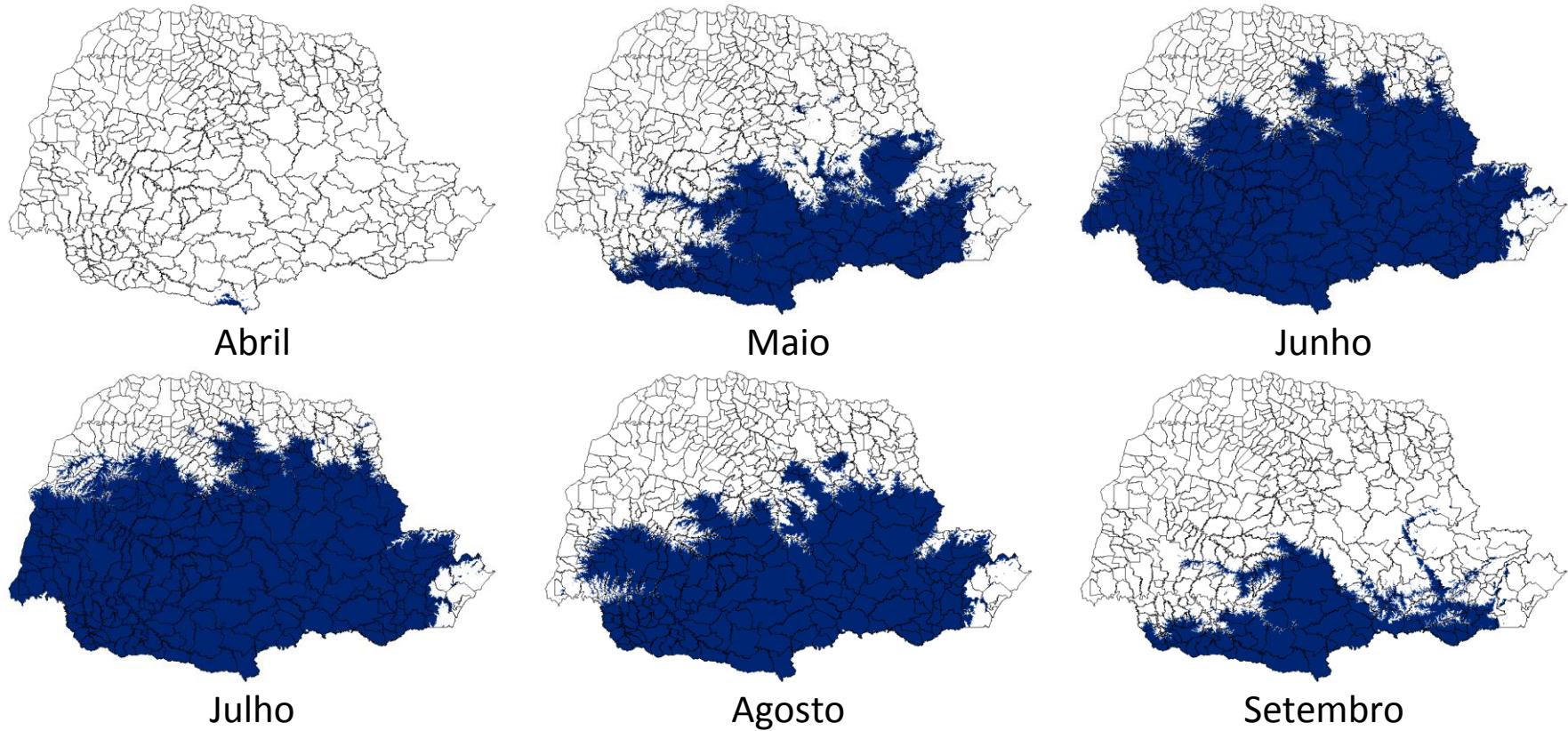
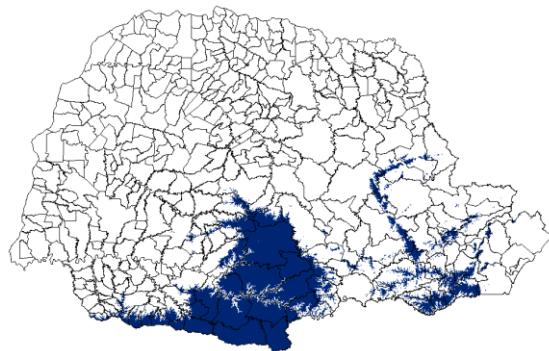


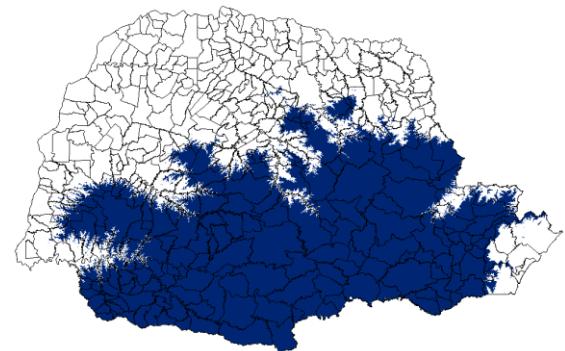
Figura 6.2. Temperaturas mínimas no abrigo inferiores a 3°C, mostradas em azul, no período de abril a setembro, para o estado do Paraná.



Abril



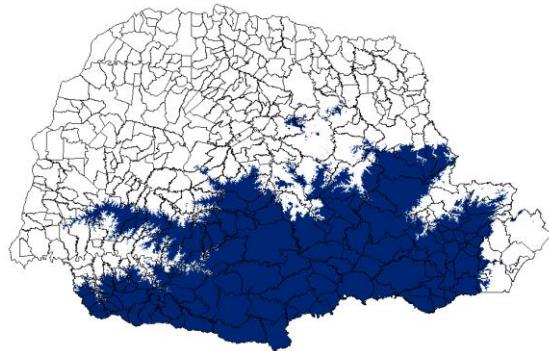
Maio



Junho



Julho



Agosto



Setembro

Figura 6.3. Temperaturas mínimas no abrigo inferiores a 2°C , mostradas em azul, no período de abril a setembro, para o estado do Paraná.

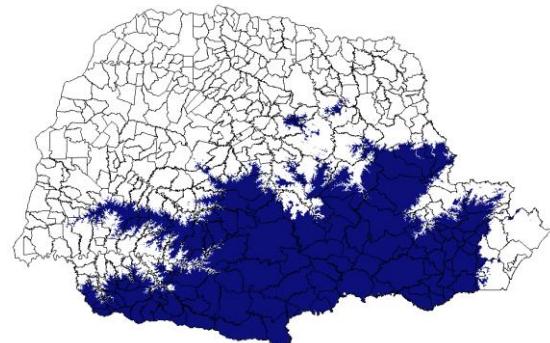
Marandu e Mombaça -2,7°C



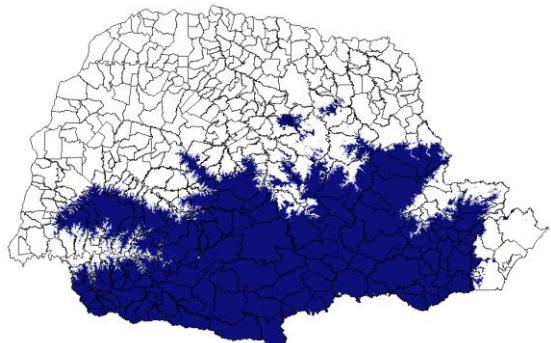
Abril



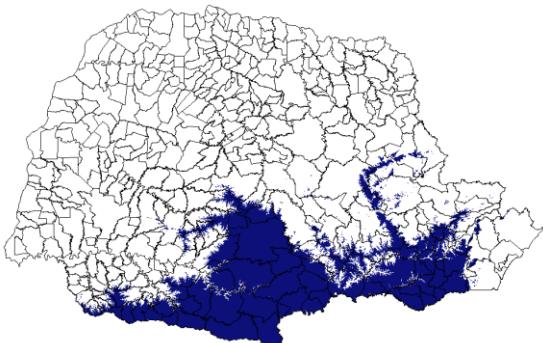
Maio



Junho



Julho



Agosto



Setembro

Figura 6.4. Temperaturas mínimas no abrigo inferiores a 1°C, mostradas em azul, no período de abril a setembro, para o estado do Paraná.

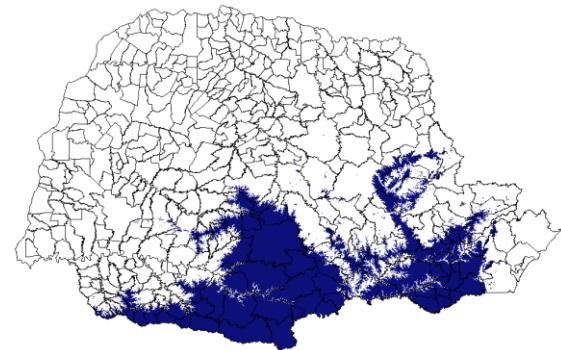
Aveia preta -4,1°C



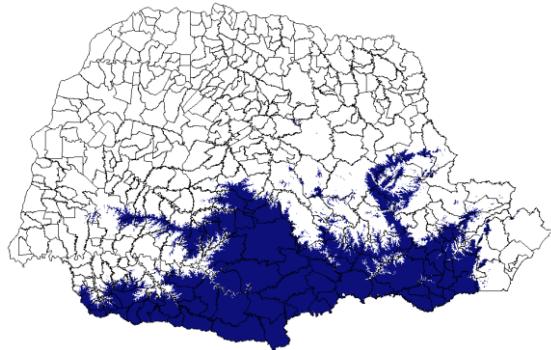
Abril



Maio



Junho



Julho



Agosto



Setembro

Figura 6.5. Temperaturas mínimas no abrigo inferiores a 0°C, mostradas em azul, no período de abril a setembro, para o estado do Paraná.

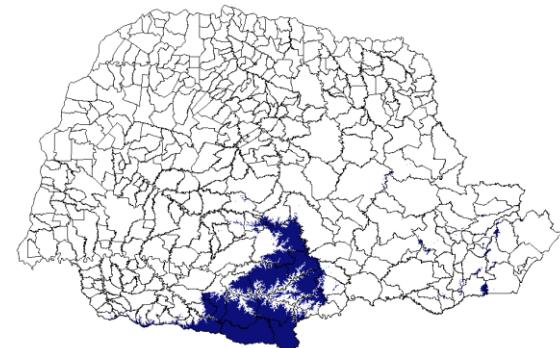
Alfafa -4,6°C



Abril



Maio



Junho



Julho



Agosto



Setembro

Figura 6.6. Temperaturas mínimas no abrigo inferiores a -1°C, mostradas em azul, no período de abril a setembro, para o estado do Paraná.

Tifton 85 sem danos até -6,2°C.



Abril



Maio



Junho



Julho



Agosto



Setembro

Figura 6.7. Temperaturas mínimas no abrigo inferiores a -2°C , mostradas em azul, no período de abril a setembro, para o estado do Paraná.

Conclusão geral

- De forma quantitativa: Sorgo e Milheto $-1,8^{\circ}\text{C}$; Marandu e Mombaça $-2,7^{\circ}\text{C}$; Aveia Preta $-4,1^{\circ}\text{C}$, Alfafa $-4,6^{\circ}\text{C}$ e Tifton 85 sem danos até $-6,2^{\circ}\text{C}$.
- Anatomia permitiu confirmar os resultados.
- Riscos de ocorrência desses valores críticos no Paraná.
- Delimitar o período do ano de baixo risco de danos para essas espécies.

AGRADECIMENTOS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Secretaria de Agricultura e do Abastecimento do Estado do Paraná, pelas facilidades para realização desta tese, sem as quais não teria sido possível sua conclusão.