

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ENGENHARIA  
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

**João Manetti Filho**

**TOLERÂNCIA A BAIXAS TEMPERATURAS E ZONEAMENTO  
CLIMÁTICO DE ESPÉCIES FORRAGEIRAS  
PARA O ESTADO DO PARANÁ**

Ilha Solteira  
2017

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**João Manetti Filho**

**TOLERÂNCIA A BAIXAS TEMPERATURAS E ZONEAMENTO  
CLIMÁTICO DE ESPÉCIES FORRAGEIRAS  
PARA O ESTADO DO PARANÁ**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Agronomia. Especialidade Manejo e Conservação do Solo e da Água.

**Prof. Dr. Fernando Braz Tangerino**  
**Hernandez**  
Orientador

**Dr. Paulo Henrique Caramori**  
Co-orientador

Ilha Solteira  
2017

Esta folha destina-se à inserção da **FICHA CATALOGRÁFICA** que o autor receberá após as correções do trabalho pela biblioteca.

Esta folha destina-se à inserção da **FOLHA DE APROVAÇÃO** que o autor receberá após a apresentação em público.

Os elementos essenciais da folha de aprovação são:

- a) autor;
- b) título;
- c) texto de aprovação;
- d) nome do professor orientador e dos examinadores com as respectivas assinaturas, bem como as instituições a qual pertencem;
- e) local e data da aprovação.

**DEDICO**

Aos meus pais: João Manetti  
(*in memorian*) e Antonia Rosa  
Boaro Manetti (*in memorian*).

À minha esposa Mariléia  
Biazon Manetti e meus filhos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus. À minha querida esposa Marileia Biazon Manetti pelo apoio, incentivo e compartilhamento durante a realização deste sonho. Em seu nome agradeço a todos familiares que sempre estiveram presentes, me apoiando e incentivando nos momentos difíceis.

A meus filhos Danielle, Fábio, Rodrigo (*in memorian*), João Pedro e Vinícius pelo amor e carinho.

Ao Professor Doutor Frenando Braz Tangerino Hernandez, por me aceitar em sua equipe de orientados.

Ao Dr Paulo Henrique Caramori, amigo e co-orientador pelo apoio e orientação constante em todas fases deste trabalho.

À Drª Carolina Maria Gaspar de Oliveira e ao Dr Getúlio Takahashi Nagashima, ambos do IAPAR, pelo apoio e colaboração na obtenção de parte dos resultados desta tese.

À Professora Drª Aline Redondo Martins, da FEIS/UNESP pelo apoio e colaboração na obtenção de parte dos resultados desta tese.

Ao Dr. Wilian da Silva Ricce da EPAGRI e ao Pablo Ricardo Nitsche do IAPAR, pelo valioso auxílio no capítulo de zoneamento.

Ao meteorologista Edmirson Borrozino, responsável pela manutenção da rede de estações meteorológicas do IAPAR, bem como pelo controle de qualidade dos dados meteorológicos que possibilitaram gerar o zoneamento de risco de geadas com alta confiabilidade.

À acadêmica Altamara Viviane de Souza Sartori da UNOPAR e acadêmica Izabeli Bertini Lara Gonçalves, da FEIS/UNESP pela colaboração na obtenção dos resultados.

À estimada amiga Professora Dona Dalva Heiderich, pelo grande apoio e incentivo nesta tarefa. Em seu nome agradeço aos amigos que me incentivaram e mostraram brilho nos olhos por esta conquista.

Aos funcionários da biblioteca da FEIS/UNESP em especial ao amigo João Josué Barbosa pelo apoio bibliotecário.

À Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira/UNESP, pela oportunidade da realização do Curso de Pós-graduação e pelo fantástico ambiente universitário.

Ao Instituto Agronômico do Paraná, órgão ligado à 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.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia. O mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”. Charles Chaplin.

## RESUMO

A ocorrência de geadas nas pastagens causa perdas de alimento para os animais, reduzindo a produção de leite e carne. Existe uma diversidade de espécies forrageiras com grande potencial produtivo e ampla adaptação térmica, que podem ser cultivadas em áreas de risco desse fenômeno. No entanto é necessário caracterizar a tolerância dessas espécies a baixas temperaturas e as regiões com condições climáticas adequadas. Os métodos de avaliação de danos por baixas temperaturas são predominantemente qualitativos, baseados em critérios visuais que têm o viés da subjetividade. Esta tese teve como objetivos gerais caracterizar a tolerância a baixas temperaturas de espécies forrageiras com base em métodos quantitativos e efetuar o zoneamento de forrageiras no estado do Paraná, com base no risco de geadas, visando intensificar a produção animal em pastejo. Foram incluídas no estudo as forrageiras: Alfafa (*Medicago sativa*), Sorgo (*Sorghum bicolor*), Aveia Preta (*Avena strigosa*), *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, Milheto (*Pennisetum glaucum*), capim Mombaça (*Panicum maximum*) e Tifton 85 (*Cynodon spp*). As plantas foram conduzidas em vasos em casa de vegetação até 60 dias e submetidas a baixas temperaturas no interior de uma câmara de crescimento com condições de luminosidade e temperatura controladas, atingindo valores mínimos de 0,2 -0,9, -1,8, -2,7, -4,1, -4,6 e -6,2°C, durante uma hora. Foram realizadas avaliações quantitativas pós testes de fluorescência da clorofila, condutividade elétrica de solução embebida com discos de folhas e atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), por meio de espectrofotometria. As espécies apresentaram respostas em função da temperatura, que possibilitaram diferenciar a tolerância e nível de dano de cada uma delas. Análises da anatomia foliar comprovaram os danos em função da tolerância de cada espécie. Com base nos resultados desses estudos, foram estabelecidos critérios baseados na temperatura crítica de cada espécie e realizado o zoneamento de risco de geadas no estado do Paraná. Os resultados apresentados nesta tese constituem uma inovação em termos de metodologias de análise de danos por baixas temperaturas em forrageiras, bem como de metodologia de zoneamento agroclimático para cultivo em áreas com risco de geadas.

**Palavras-chave:** Pastagens. Geadas. Avaliação de danos. Fluorescência da clorofila. Condutividade elétrica. Ascorbato peroxidase (APX). Catalase (CAT). Superóxido dismutase (SOD). Risco climático.

## ABSTRACT

### **TOLERANCE TO LOW TEMPERATURES AND CLIMATE ZONING OF FORAGE SPECIES IN PARANA STATE, BRAZIL**

The occurrence of frosts in the pastures causes loss of food for the animals, reducing the production of milk and meat. There is a diversity of forage species with great productive potential and wide thermal adaptation, which can be cultivated in areas at risk of this phenomenon. However, it is necessary to characterize the tolerance of these species at low temperatures and regions with adequate climatic conditions. The methods of evaluation of low temperature damages are predominantly qualitative, based on visual criteria that have the bias of subjectivity. This thesis had as general objectives to characterize the tolerance to low temperatures of forage species based on quantitative methods and to perform the zoning of forages in the state of Paraná, based on the risk of frost, aiming to intensify the animal production in grazing. The forages were: alfalfa (*Medicago sativa*), sorghum (*Sorghum bicolor*), black Oat (*Avena strigosa*), *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, millet (*Pennisetum glaucum*), Mombasa grass (*Panicum maximum*) and Tifton 85 (*Cynodon* spp). The plants were conducted in pots in a greenhouse up to 60 days and subjected to low temperatures inside a growth chamber with controlled light and temperature conditions, reaching the minimum temperatures of 0,2, -0,9, -1,8, -2,7, -4,1, -4,6 and -6,2°C for one hour. Quantitative evaluations were performed after tests, based on chlorophyll fluorescence, electric conductivity on leaf discs and activity of the enzymes ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) by means of spectrophotometry. The species showed responses as a function of temperature, which made it possible to differentiate the tolerance and level of damage of each one of them. Leaf anatomy analysis allowed visualizing the damage as a function of the tolerance of each species. Based on the results of these studies, criteria based on the critical temperature of each species

were established to perform the risk zoning of frosts in the state of Paraná. The results presented in this thesis are an innovation in terms of methodologies for the analysis of damages caused by low temperatures in forages, as well as agroclimatic zoning methodology for cultivation in areas with frost risk.

**Keywords:** Pastures. Frost. Damage assessment. Fluorescence of chlorophyll. Electric conductivity. Ascorbate peroxidase (APX). Catalase (CAT). Superoxide dismutase (SOD). Climatic risk.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
2.1 <i>Importância das forrageiras.....</i>	17
2.2 <i>Descrição das espécies avaliadas .....</i>	18
2.3 <i>Danos por baixas temperaturas em plantas .....</i>	20
2.4 <i>Métodos de avaliação de tolerância ao frio.....</i>	26
2.5 <i>Zoneamento de risco climático .....</i>	32
<b>3 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA PARA IDENTIFICAR DANOS POR FRIO EM ESPÉCIES DE FORRAGEIRAS .....</b>	<b>42</b>
3.1 <b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>44</b>
3.2 <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
3.3 <b>RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
3.4 <b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
3.5 <b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM ESPÉCIES FORRAGEIRAS SUBMETIDAS A BAIXAS TEMPERATURAS.....</b>	<b>58</b>
4.1 <b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>60</b>
4.2 <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
4.2.1 <i>Atividade da catalase (CAT) .....</i>	64
4.2.2 <i>Atividade da ascorbato peroxidase (APX) .....</i>	64
4.2.3 <i>Atividade da superóxido dismutase (SOD).....</i>	65
4.3 <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
4.3.1 <i>Alfafa.....</i>	69
4.3.2 <i>Aveia.....</i>	70

4.3.3 <i>Marandu</i> .....	71
4.3.4 <i>Milheto</i> .....	71
4.3.5 <i>Mombaça</i> .....	72
4.3.6 <i>Sorgo</i> .....	73
4.3.7 <i>Tifton 85</i> .....	74
<b>4.4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>74</b>
<b>5 ANÁLISE COMPARATIVA DA ANATOMIA FOLIAR DE FORRAGEIRAS SUBMETIDAS A BAIXAS TEMPERATURAS .....</b>	<b>79</b>
<b>5.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>81</b>
<b>5.3 RESULTADOS .....</b>	<b>82</b>
<b>5.4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>5.5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>91</b>
<b>6 ZONEAMENTO DO RISCO DE GEADAS PARA ESPÉCIES FORRAGEIRAS NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL .....</b>	<b>93</b>
<b>6.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>95</b>
<b>6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>96</b>
<b>6.4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>109</b>
<b>7 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>111</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As pastagens ocupam áreas expressivas destinadas aos cultivos no Brasil, com cerca de 172 milhões de hectares (IBGE, 2007). No estado do Paraná compreendem aproximadamente um terço da área total cultivada e são a principal fonte de alimentos para a pecuária bovina. O baixo custo representado pelas forrageiras em pastejo, em relação a outras fontes de nutrientes, justifica esta ampla utilização. Contudo, as produtividades observadas são relativamente baixas. A utilização de forrageiras inadequadas para as condições edafoclimáticas das regiões produtoras, o manejo inadequado, a falta de alimentos nas diferentes épocas do ano e a falta de fertilização têm levado as pastagens à degradação e limitado a produção animal.

Escolher as espécies/cultivares mais adequadas para determinada região e, de preferência, que possibilitem compor um sistema de forrageamento dos animais durante o ano todo, é um dos principais fatores que determinam sustentabilidade e produtividade de carne e leite em pastagens. A indicação equivocada da espécie a ser utilizada, em associação com um manejo inadequado dos componentes: solo, planta e animal, contribuem para a rápida degradação do pasto, queda na fertilidade do solo e baixa produtividade animal, que reduzem consideravelmente a competitividade e lucratividade de empreendimentos de pecuária. Essa ideia deve ser mudada, sendo necessário que os produtores encarem a pastagem como uma cultura agrícola. O solo e a pastagem são as principais fontes de renda do produtor, a carne ou o leite são apenas os produtos finais. A produção de leite e carne a pasto é a forma mais econômica de alimentação dos animais, com diferenças de produtividade de carne conforme a gramínea empregada para pastejo. Aguiar et al. (2001a), trabalhando com engorda de novilhos em pastagens de capim Mombaça, Tanzânia e Tifton 85 apresentaram produtividade de carne 1.289; 1.178 e 2.306 kg de peso vivo  $ha^{-1} ano^{-1}$ , respectivamente e a análise econômica do sistema apresentado por Aguiar et al. (2001b) mostrou que o retorno sobre o capital investido (RCI) foi de 8% para Tanzânia, 9,5% para Mombaça e 22% para Tifton 85.

Em forragicultura, nem sempre se busca a maior produtividade como nos cultivos agrícolas. Num sistema de produção de leite ou carne em pastejo interessa

sobremaneira o forrageamento dos animais durante o ano inteiro. Uma produção de 3.000 kg de matéria seca da parte aérea (MS) de Milheto em março, por exemplo, pode ser mais relevante para o sistema do que 6.000 kg em janeiro. Assim, é importante contar com espécies de diferentes faixas de adaptação térmica e tolerância a estresses ambientais.

A ocorrência de geadas tem sido um dos principais problemas das forrageiras tropicais e subtropicais nas regiões sudeste e sul do Brasil. Dependendo da localização e altitude, os riscos de geadas ocorrem no período de abril até final de setembro. Os meses com maiores riscos são junho, julho e agosto (WREGE et al., 2004). O conceito de geada para a agricultura está ligado aos danos que ocorrem a cada espécie. Assim, embora sob o ponto de vista físico possa haver formação de geadas, a temperatura letal para as plantas expostas é que vai determinar se houve a geada agronômica (CARAMORI; MANETTI FILHO, 1993).

O período com temperaturas favoráveis ao crescimento de forrageiras perenes de verão, as quais são a base do forrageamento dos animais nos Estados, pode ser afetado com a ocorrência de temperaturas mais baixas. Regiões mais quentes podem possibilitar um maior período de utilização destas pastagens e, consequentemente, ter um menor período de escassez de forragem, necessitando de um menor volume de suplementação.

O clima exerce grande influência sobre o ciclo de vida das plantas. As forrageiras sofrem com as alterações climáticas podendo paralisar o crescimento e produção ou mesmo morrer. O crescimento das plantas e o consequente acúmulo de matéria seca é o que possibilita disponibilizar forragem para a alimentação animal. Portanto, verificar a tolerância a baixas temperaturas e a adaptabilidade de forrageiras tropicais e subtropicais é um problema relevante de pesquisa.

Objetivou-se, neste trabalho, determinar as temperaturas mínimas letais para seis espécies forrageiras e efetuar o zoneamento de risco de geadas para o estado do Paraná.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. P. A.; AMARAL, G. C.; DATENA, J. L. F.; YOUNES, R. J.; COSTA, R. O.; MOTA, J.; VIVIAN, W. S. O. Produtividade de carne em sistemas intensivos nas pastagens de Mombaça, Tanzânia e Tifton-85 na região do Cerrado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., Piracicaba, 2001. **Anais...** Piracicaba: SBZ, 2001a. p. 1461-1462.
- AGUIAR, A. P. A.; ALMEIDA, B. H. P. J. F.; AMARAL, G. C.; DATENA, J. L. F.; YOUNES, R. J.; COSTA, R. O.; MOTA, J.; VIVIAN, W. S. O. Viabilidade econômica da produção de carne em sistemas intensivos de pastagens na região do Cerrado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., Piracicaba, 2001. **Anais...** Piracicaba: SBZ, 2001. p. 1462-1464.
- CARAMORI, P. H.; MANETTI FILHO, J. **Proteção dos cafeeiros contra geadas.** Londrina: IAPAR, 1993. 28 p. (IAPAR, Circular, 79).
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 1920/2006.** Rio de Janeiro: IBGE, 2007. Disponível em: <<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 25 nov. 2016.
- CHAPLIN, C. S. Ator, diretor, produtor, humorista, empresário, escritor, comediante, dançarino, roteirista e músico britânico. (Londres, 16 de abril de 1889 — Corsier-sur-Vevey, 25 de dezembro de 1977). [https://pt.wikipedia.org/wiki/Charlie\\_Chaplin](https://pt.wikipedia.org/wiki/Charlie_Chaplin)
- WREGE, M. S.; CARAMORI, P. H.; GONÇALVES, A. C. A.; BERTONHA, A.; CAVIGLIONE, J. H.; FARIA, R. T. de; FERREIRA, R. C.; FREITAS, P. S. L. de; GONÇALVES, S. L. Ocorrência da primeira geada de outono e última de primavera no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 12, n. 1, p. 143-150, 2004.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância das forrageiras

As pastagens naturais e plantadas ocupam uma área de aproximadamente 172 milhões de hectares no território brasileiro (BRASIL, 2016), constituindo a principal forma de utilização do solo para produção. Deste total, estima-se que 55% podem ser consideradas pastagens bem manejadas, sendo que o restante apresenta um certo grau de degradação que requer manejo adequado para melhorar a eficiência do sistema (DIAS FILHO, 2014; BRASIL, 2016). Um dos pontos importantes é o conhecimento da adaptação de cada espécie/cultivar às condições regionais de clima e solo, para que os demais ‘inputs’ tecnológicos possam ser potencializados. No caso do Paraná, esse conhecimento é ainda mais crítico, devido à transição climática presente no estado, com climas tropicais, subtropicais e temperados (CAVIGLIONE et al., 2000).

A alimentação adequada do rebanho prioritariamente em pastagens é uma alternativa de menor custo, que pode reduzir os custos de produção e melhorar a rentabilidade da atividade. Um dos fatores importantes é poder contar com disponibilidade de alimento durante a maior parte do ano, explorando o potencial climático regional e as características das espécies forrageiras.

Considerando a grande diversidade genética existente, é possível escolher espécies adaptadas aos mais diversos ambientes, visando compor um sistema de forrageamento mais estável e distribuído durante o ano. Os aspectos mais críticos são a tolerância a baixas temperaturas, incluindo geadas e temperaturas sub-ótimas para crescimento, bem como a tolerância ao estresse hídrico, tanto na fase de implantação como no final da estação de crescimento, quando as chuvas diminuem (CAVIGLIONE et al., 2000; WREGE et al., 2005). Neste contexto é importante caracterizar o comportamento de espécies adaptadas às condições de primavera/verão, com temperaturas mais elevadas, e outono/inverno, com menores temperaturas, maior deficiência hídrica e geadas.

## 2.2 Descrição das espécies avaliadas

Nesta tese foram enfocadas espécies com características de crescimento e produção de primavera/verão e outono/inverno, visando auxiliar na viabilização de um sistema de forrageamento em pasto durante todo o ano. Existem diversas espécies que têm comportamentos semelhantes às avaliadas neste estudo, porém não foi feita uma avaliação exaustiva de todas as opções disponíveis devido a limitações de espaço experimental. A seguir é feita uma breve descrição das espécies avaliadas.

### 2.2.1 Alfafa (*Medicago sativa* L.)

É uma leguminosa forrageira perene da família *Fabaceae*, cujo centro de origem é o sudoeste da Ásia, de onde foi disseminada para a Europa, Oriente médio, China e, posteriormente, com a navegação, para a América do Norte, Peru e Chile (FERRAGINE, 2003). Daí foi introduzida na Argentina por via terrestre, onde se expandiu e constituiu a segunda maior área cultivada no planeta, com cerca de 7,5 milhões de hectares. A introdução no Brasil se deu a partir do Rio Grande do Sul, de onde se disseminou para Santa Catarina e Paraná e, mais tarde, em áreas esparsas de outros estados (NUERNBERG et al., 1990). Possui sistema radicular muito profundo, o que lhe confere alta resistência à seca. Os caules são folhosos e se propagam a partir da coroa da planta, próximo da superfície do solo, podendo atingir cerca de 1 m de altura (BALL et al., 2007). As folhas são trifolioladas, compostas de folíolos oblongos. As flores se distribuem em racemos de 15 a 30 cm com coloração azulado a violáceo. Os legumes possuem formato espiralado, com 2 a 5 sementes. É, provavelmente, a leguminosa de mais ampla adaptação no mundo, produzindo em climas temperado, tropical e subtropical (BALL et al., 2007). Devido a isso e sua grande qualidade e preferência animal, é considerada a “rainha das forrageiras”

### 2.2.2 Aveia Preta (*Avena strigosa* L.)

É uma gramínea de inverno, da família *Poaceae*, com centro de origem no Oriente Médio, de onde se difundiu para a Europa e posteriormente para as

Américas. Gramínea cespitosa, com colmos cilíndricos, eretos e glabra ou pouco pilosa, e com raiz fasciculada ou em cabeleira. A inflorescência é em panícula com glumas aristadas e o grão é uma cariopse indeiscente encoberto pelo lema e páleas. A Aveia pode ser utilizada para cobertura do solo, forragem ou produção de grãos. A Aveia-preta é considerada mais rústica e possui maior capacidade de perfilhamento, do que a branca e a amarela. Além disso, é mais resistente à seca e menos exigente em fertilidade. A Aveia-preta pode ser cultivada solteira ou consorciada com azevém, ervilhaca, centeio, trevo, tremoço, etc.

#### 2.2.3 *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex. A. Rich) cv. Marandu

É uma gramínea perene da família Poaceae, com caule subterrâneo do tipo rizoma. Tem crescimento ereto, atingindo de 1,5 a 2,5 metros de altura. Suas folhas possuem lâminas lineares lanceoladas, pilosas na face ventral e glabras na face dorsal. Apresenta colmos prostrados com perfilhos eretos ao longo do crescimento da touceira, com perfilhamentos mais intensos nos nós superiores, promovendo a multiplicação de inflorescências, principalmente sob o regime de pastejo ou corte (NUNES et al. 1985; MEDEIROS, 2004). Dependendo da região possui as denominações populares de Braquiário, braquiária do alto, braquiária do morro e capim-Marandum (VILELA, 2005; MOREIRA e BRAGANÇA, 2010). É uma das forrageiras mais utilizadas em pastejo no Brasil (EMBRAPA, 2005), com mais de 50% das áreas de pastagens cultivadas na região Centro-Oeste do País (MACEDO, 2006) e aproximadamente 65% na região Norte (DIAS-FILHO e ANDRADE, 2005). Também é utilizada como alimento animal nas formas de verde picado, silagens e fenos (MEDEIROS, 2004).

#### 2.2.4 Capim Mombaça (*Panicum maximum* Jacq.)

Gramínea perene da família Poaceae, originária da Tanzânia, África. Possui folhas quebradiças, podendo atingir até 1,65m de altura. É uma planta cespitosa, desenvolvendo-se em touceiras, exigente em fertilidade do solo, apresentando boa resposta a adubação.

#### 2.2.5 Sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench.)

Pertence à família *Poaceae*. Seu centro de origem é a África, com uma possível segunda área de dispersão na Índia. Foi introduzido no Brasil em meados do século XX. É a quinta espécie mais cultivada do mundo, servindo de fonte de alimentos para muitos países da África. O Sorgo é uma planta de porte alto que apresenta perfilhamento (MAGALHÃES et al., 2008).

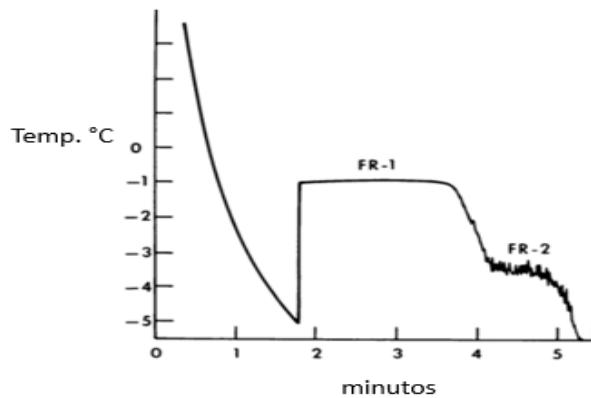
#### 2.2.6 Tifton 85 (*Cynodon* spp)

O Tifton 85 é um híbrido estéril, produto da espécie Bermuda Grass da África do Sul (PI 290884) com TIFTON - 68. Foi desenvolvido na Universidade da Geórgia, estação experimental de Coastal, localizada na cidade de Tifton, EUA. Possui caules subterrâneos na forma de rizomas, onde são mantidas as reservas de carboidratos e nutrientes que o tornam rústico, resistente a pastejo intensivo, seca, geada e fogo. Foi introduzido no Brasil em 1993.

### **2.3 Danos por baixas temperaturas em plantas**

Dano por frio é uma das maiores causas de perdas por culturas e o maior fator limitante para a distribuição natural de plantas (Parker, 1963). Por esta razão plantas tropicais não sobrevivem em locais de clima temperado devido aos rigores do inverno.

Durante a fase inicial de perda de calor pelo tecido vegetal, quando a temperatura cai abaixo do ponto de congelamento do citoplasma e do vacúolo sem a formação de gelo, a fase líquida do citoplasma e do vacúolo são ditas supercongeladas. Brown et al. (1974) confirmou esse fato em frutos de pepino, conforme ilustrado na Figura 1. Os tecidos sofrem um supercongelamento inicial, indicado pelo aumento da temperatura na primeira região de congelamento (FR-1). A segunda região de congelamento é caracterizada por um grande número de oscilações de temperatura (FR-2).



**Figura 2.1.** Curva típica de congelamento em pepinos. Adaptado de Brown et al. (1974).

A formação de gelo no espaço intercelular causa movimento de vapor d'água através da membrana plasmática, oriundo do citoplasma para parede celular causando o crescimento dos cristais de gelo no espaço intercelular. Esta desidratação lenta concentra os solutos no interior da célula, diminuindo o ponto de congelamento em 2 a 3°C (TAIZ; ZEIGER, 2009). Esse fenômeno pode ser motivo de escape da planta a geada.

Os mecanismos de danos podem ser divididos em injúria intracelular e extracelular. Os danos por congelamento intracelular normalmente ocorrem de forma muito rápida célula por célula com formação de milhares pequenos grãos de gelo através do apoplasto e do vacúolo. Quase sempre ocorre de forma letal e a destruição das membranas é a manifestação aparente rapidamente observada. Por outro lado, a injúria ou dano por congelamento extracelular normalmente é associado a tolerância ao frio ou congelamento. Formação de gelo extracelular frequentemente está associado a desidratação da célula pela remoção de água. A morte da planta as vezes está associada a desidratação e não ao dano pelo frio. As alterações comumente observadas são devido a dano de membrana pela diminuição da permeabilidade, diminuição de atividade enzimática ou desnaturação de proteínas. Protoplastos de célula de plantas tolerantes normalmente são mais elásticos.

O congelamento requer a presença de pontos de nucleação para dar início à formação dos cristais de gelo. Margaritis; Bassi (1991), reportaram que certas bactérias gran-negativo, incluindo *Pseudomonas syringae* possuem uma proteína de membrana que são capazes de nuclearem cristalização em água supercongelada.

Por outro lado, certos vegetais adquiriram a habilidade de suprimir os pontos de nucleação, permitindo supercongelamento muitos graus abaixo de zero, sem a consequente formação de gelo. Entretanto, o supercongelamento profundo da água intercelular pode atingir -40°C, onde ocorre a formação espontânea de gelo (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A aclimatação ao frio promove mudanças em vários processos físicos e bioquímicos, permitindo que a planta trabalhe em baixas temperaturas. Pode ocorrer a indução de proteínas anti-congelamento, alterações na composição da membrana, acúmulo de osmoprotetores, ou mudanças no potencial de redução (JANDA et al, 2014). Koster; Lynch, (1992) afirmaram que o potencial osmótico intracelular de plantas de centeio praticamente dobra durante o processo de aclimatação. A concentração de glicinabetaína salta de 290 para 1.300 microgramas por grama de tecido vivo durante as quatro semanas de aclimatação e que a concentração de prolina não se alterou nas três primeiras semanas de aclimatação, no entanto, saltou de 27 para 580 microgramas por grama de tecido fresco durante as três semanas seguintes e que a quantidade de açúcares solúveis mais que dobrou durante a segunda semana de aclimatação, passando de 11 para 26 miligramas por grama de tecido vivo. Os autores atribuem a maioria desse aumento ao acúmulo de sacarose e rafinose.

Análises bioquímicas podem apresentar bons resultados para avaliação de tolerância ao frio, como observado por Cerqueira (2011) em videira e Floriani et al. (2011) em eucalipto, que avaliaram a atividade das enzimas ascorbato peroxidase e superóxido dismutase. A ação da enzima peroxidase em plantas constitui proteção oxidativa. A atividade desta enzima pode aumentar em plantas submetidas a estresse, e às vezes, é a primeira enzima a ter atividade alterada (SIEGEL, 1993). Isso porque, em resposta ao estresse as plantas podem acumular espécies reativas de oxigênio (EROS) que afetam o metabolismo celular através da oxidação de membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucléicos, além de inibir processos fisiológicos como fotossíntese e respiração (SCANDALIOS, 2005; SOARES; MACHADO, 2007). Enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), além de compostos não-enzimáticos, compõem sistemas antioxidantes efetivos na proteção contra o estresse oxidativo (PERL-TREVES; PERL, 2002). Durante o estresse pelo frio tem sido detectado a formação

de ácido gama amino butírico (GABA). Mazzucotelli et al. (2006), estudando o metabolismo de amino ácidos de plantas de cevada e trigo em condições de estresse pelo frio observaram pequena variação no conteúdo de amino ácidos, no entanto, houve substancial conversão de glutamato em GABA, proporcionalmente à intensidade do dano pelo frio. O acúmulo de prolina tem sido associado a mecanismos de tolerância ao frio através de modulação osmótica. A literatura sobre estresse provocado pelo frio apresenta elevação das concentrações de prolina e gaba, sugerindo uma possível conexão entre ambos, conforme sugerido por Signorelli et al. (2015). Estes autores propuseram uma rota metabólica não enzimática para síntese de GABA a partir de prolina com radicais hidroxila (-OH). Prolina reage favoravelmente com -OH pela subtração de hidrogênio (H) do grupamento amina da prolina. Em seguida ocorre descarbolixilação espontânea da prolina, conduzindo a formação de pirrolidina que pode ser convertida em pirrolina e esta, por sua vez, produz o ácido gama amino butírico (GABA).

Outro tema que tem merecido atenção de cientistas é o estado nutricional das plantas em relação aos mecanismos de estresse pelo frio. Plantas crescendo em solo com deficiência mineral normalmente apresentam maior susceptibilidade ao dano por frio. Gunes et al. (2016) reportaram que a aplicação de boro (B) no solo ou foliar, em plantações de morangueiro (*Fragaria vesca* cv. Fern), promoveu elevação da produtividade em 55,91%, associado a aumento da atividade das enzimas catalase, peroxidase e superóxido dismutase e diminuição de danos do frio em 27,41%. Evans et al. (2016) sugeriram que alta concentração de cloro na seiva celular aumentou a tolerância ao frio em plantas jovens de canola (*Brassica napus* L.). Plantas de espécies tropicais de florestas do México aumentaram a tolerância ao frio quando suplementadas com potássio (GOMES et al., 2016). Emprego de adubação potássica juntamente com calcário promoveu maior tolerância ao frio em plantas adultas de café (*Coffea arabica*), como demonstraram Chaves; Manetti Filho (1990). Sarikhani et al. (2014) obtiveram bom resultado de aumento de tolerância ao frio com aplicação foliar de potássio em plantas de uva (*Vitis vinifera* L.). Hansen (1992) mostrou que aclimatação ao frio era influenciado pela duração do período de aplicação dos fertilizantes em *Larix leptolepis* (Sieb;& Zucc) Gord e que não encontraram efeito especial para nitrogênio, fósforo ou potássio.

A literatura menciona a relação entre poliaminas e reações de plantas quanto a tolerância ao frio. Gondor et al. (2016) relataram o efeito de espermidina na sinalização da aclimatação de plantas de cereais.

O papel do etileno também tem sido objeto de estudos quanto a tolerância ao frio. Hu et al. (2016) mostraram ação positiva do emprego de etileno sobre atividade enzimática antioxidante em gramíneas do gênero *Cynodon dactylon* L. Pers submetidas a estresse por baixa temperatura.

Gás sulfureto de hidrogênio ( $H_2S$ ) tem sido mencionado apresentar ação sobre tolerância a estresses abióticos. Shi et al. (2013) submeteram plantas de grama bermuda (*Cynodon dactylon* L. Pers) a estresses salino, osmótico e temperatura baixa e observaram indução nos níveis de  $H_2S$  endógenos, associados com aumento da tolerância a estresses salinos e de baixas temperaturas. Além disso houve diminuição das espécies reativas de oxigênio (ROS), aumento de atividade dos sistemas enzimáticos antioxidantes da catalase, peroxidase e glutationa redutase e acúmulo de prolina, sacarose e açúcares solúveis totais.

Ácido salicílico também está associado a estresse provocado pelo frio. Mutlu et al. (2016), trabalhando com plantas de cevada, concluíram que os teores internos de ácido salicílico ou aplicados externamente desempenham papel importante sobre tolerância ao frio através da regulação de espécies reativas de oxigênio e atividade das enzimas antioxidantes em cultivares sensíveis e tolerantes ao frio.

O papel dos fitohormônios Ácido Abscísico (ABA), Citocinina (CIT) e Brassinosteroides também tem sido, largamente, associado aos mecanismos de tolerância ao frio.

Zhang et al. (2008) estudaram o papel do ABA e uma proteína de 25 kDa chamada dehidrina, normalmente associada aos mecanismos de tolerância a seca, com tolerância ao frio em plantas de grama bermuda. Os autores reportaram que o teor de ABA aumentou substancialmente, nas folhas e em estolões durante a aclimatação ao frio e permaneceu em nível elevado. As cultivares mais tolerantes ao frio ('Patriot' e 'Riviera') apresentaram teores maiores de ABA em menor vazamento de eletrólitos nos estolões, quando comparado com as cultivares mais sensíveis ao frio ('Tifway' e 'Princess'). A expressão da dehidrina aumentou durante o processo

de aclimatação para as quatro cultivares, evidenciando a ligação entre os mecanismos de tolerância ao frio ao de tolerância a seca.

Zhang et al. (2011) analisaram as alterações metabólica de Citocinina (CIT) e Ácido Abscísico (ABA) durante a aclimatação e desaclimatação de cinco variedades de grama bermuda. Os autores apresentaram resultado que indicam que os teores de ABA aumentaram enquanto que os teores de CIT diminuíram durante o período de aclimatação. Os autores afirmam ainda que os teores de ABA durante o período de aclimatação ao frio devem estar associados com tolerância ao frio, e que os níveis de CIT durante o período de desaclimatação devem estar associados ao aumento da coloração esverdeada de plantas de grama bermuda.

Kagale et al. (2007) demonstraram que o emprego de 2,4-epibrassinolide, um brassinosteroide, aumentou a tolerância ao estresse provocado pelo frio e pela seca de mudas jovens de *Arabidopsis thaliana* e *Brassica napus*, além de superar inibição induzida por salinidade de germinação de sementes. Espécies reativas de oxigênio também estão associadas ao metabolismo de brassinosteroides. Xia et al, (2009) sugerem que os níveis elevados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultantes da atividade da enzima NADPH oxidase estão envolvidos com tolerância ao frio induzida por brassinosteroides.

Burke et al. (1976) classificaram as plantas quanto a tolerância ao frio em quatro categorias:**1. Plantas com pouca ou sem tolerância ao frio:** são as que sofrem danos pelo frio em temperaturas que variam de zero a 14°C (denominados “Chilling”), ou até mesmo aquelas que são danificadas pelo frio em temperaturas entre -1 a -3°C. Supercongelamento e abaixamento do ponto de congelamento podem oferecer leve proteção nestes casos. Milho, cucurbitas e feijões são classificados como exemplos desta categoria. Cafeeiros também podem ser incluídos nesta classe de plantas. Após uma geada a folhagem adquire característica flácida em função da perda de permeabilidade das membranas e os compartimentos intracelulares mostram-se danificados. **2. Plantas com limitada tolerância ao frio.** São aquelas que sobrevivem ao congelamento por tolerarem a formação de gelo em seus tecidos com capacidade de se aclimatarem e sobreviverem em temperaturas de -25°C durante o inverno. Cereais de inverno compõe estes tipos de plantas. **3. Plantas com supercongelamento profundo.** Através desse mecanismo de escape são capazes de tolerar temperaturas de -40°C,

porém podem ser danificadas entre -2 a -3°C durante a fase de crescimento ativo. Os autores citam que macieira é um exemplo típico destas plantas e **4. Plantas que não apresentam supercongelamento profundo, porém são plantas extremamente tolerantes ao frio**, capazes de sobreviver a temperatura de -196°C. São plantas nativas da floresta Boreal do Norte dos Estados Unidos. São plantas que suportam extrema desidratação das células. Nestas condições toda molécula de água da planta encontra-se congeladas extracelularmente.

Tolerância ao frio está associada à capacidade da planta sobreviver com a presença de gelo fora da célula, quer seja na parede celular, vasos e outras estruturas. Enquanto algumas espécies são mortas com temperaturas pouco abaixo do ponto de congelamento, outras toleram temperaturas extremamente baixas de até -196°C (Sakai, 1960). Esta tolerância ocorre quando as plantas adquiriram condições de aclimatação ao frio e se encontram em estádio dormente. Porém essas mesmas espécies podem ser danificadas em -3°C durante o estágio de crescimento ativo na primavera.

O Estado do Paraná, cortado pelo Trópico de Capricórnio, que delimita a máxima declinação Sul do Sol, localiza-se numa região de transição climática, caracterizada pelas diferenças de altitude e latitude. Regiões de maiores latitudes e altitudes, localizadas ao Sul do paralelo 24 °S apresentam estação de crescimento bem definida, com invernos rigorosos e geadas frequentes. A faixa ao Norte, em menores altitudes (400 a 700m) têm geadas menos frequentes e verões quentes que possibilitam o cultivo de espécies mais sensíveis a baixas temperaturas (CAVIGLIONE et al., 2000; WREGE et al., 2011). Nestas condições ocorrem oscilações de temperatura de 15 a 20°C num mesmo dia, as vezes com ocorrência de geada e logo em seguida a temperatura volta a subir, impedindo que as plantas possam se aclimatação ao frio.

## **2.4 Métodos de avaliação de tolerância ao frio**

A seguir serão descritos alguns métodos de avaliação de tolerância ao frio, no entanto, é importante mencionar que normalmente os trabalhos de pesquisa com

tolerância ao frio empregam uma ou mais metodologias combinadas para avaliação simultânea.

Didaticamente, os métodos de avaliação de tolerância ao frio podem ser divididos em qualitativos e quantitativos.

**a) métodos qualitativos** - Compreendem avaliações subjetivas por meio de notas e avaliações de recuperação pós dano, os quais são descritos a seguir.

***Avaliação visual com estabelecimento de notas conforme o nível de dano.*** Manetti e Caramori (1986), propuseram um critério de avaliação visual para quantificar danos por temperaturas abaixo de zero em plantas de café, com atribuição notas entre 1 e 5, sendo: 1 - sem dano; 2 - 25% da área foliar afetada; 3 - 50% da área foliar afetada, 4 - 75% da área foliar afetada e 5 – 100% da área foliar afetada. Esse critério foi utilizado com sucesso para avaliar danos em mudas de café submetidas a temperaturas mínimas de -1, -2, -3 e -4°C em condições controladas. Caramori; Caramori; Manetti (2002), empregaram o mesmo critério para avaliar tolerância ao frio de plantas jovens de cafeeiros (*Coffea arabica L.*) submetidas a diferentes níveis de potencial de água na folha. Friebelkorn e Rahman (2016) empregaram critério de avaliação visual por meio de notas de danos para desenvolver protocolo de avaliação de tolerância ao frio de canola (*Brassica napus L.*).

***Recuperação/Rebrota/Perfilhamento/Contagem de plantas.*** Após a realização do teste em condições controladas ou após a ocorrência de fenômeno natural é avaliada a recuperação das plantas. Avaliação pode ser por contagem de plantas (LT 50 estima a temperatura letal com a contagem da morte de 50% das plantas) ou contagem das estruturas vegetais. Arias et al. (2015) empregaram método LT50 para avaliar o escape pelo frio por supercongelamento de cultivares de azeitona (*Olea europaea*). Bresolin et al. (2008) empregaram metodologia de contagem de número de folhas por estolho, espessura do estolho e número de brotações novas em plantas de amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* cv “amarillo”) para avaliar a tolerância ao frio. Munshaw et al. (2010) usaram LT50 para avaliar o efeito da aplicação tardia de ethefon em quatro cultivares de grama Bermuda. Anderson et al. (2011) avaliaram tolerância ao frio de dez cultivares de grama bermuda através da quantificação de rebrota após realização dos ensaios em câmaras de crescimento de plantas com condições temperatura controladas.

Macolino et al. (2010) empregaram a metodologia D80, ou seja, a quantidade de dias para atingir 80% de coloração verde em estolões de cultivares de grama Bermuda correlacionado com o conteúdo de carboidratos solúveis. Anderson; Taliaferro; Martin (1993) avaliaram tolerância ao frio de grama Bermuda em condições controladas através do LT50 de rebrota das plantas após 4 semanas da realização dos ensaios. Floriani et al. (2013) empregaram a metodologia LT50 para avaliar relação entre concentrações foliares de carboidratos solúveis totais e tolerância ao frio em diferentes espécies de *Eucaliptus spp.* Dami et al. (2016) empregaram três métodos estatísticos (mode-date, piecewise regression and annual mean LT50) para determinar a temperatura mínima que mata 50% das gemas primárias de vinte e três cultivares de uva adaptados a face oriental dos Estados Unidos.

**b) Métodos quantitativos** - Diversos métodos são relatados, dos quais serão destacados os seguintes.

**Calorimétricos.** Referem-se a medição da variação da temperatura através do emprego de termopares, para quantificar alterações de temperatura no interior do tecido de plantas submetidas a estresse pelo frio. Esta metodologia é considerada simples quando se utiliza um termopar ou diferencial com dois termopares inseridos no tecido, sendo que um deles é considerado referencial. Aslamarz et al. (2010) empregaram análise térmica computadorizada aliada ao método de módulo termoelétrico para avaliar tolerância a frio de castanha da Persia. Livingston III; Tallury (2009) empregaram análise térmica associado com histologia para avaliar o comportamento diferencial de plantas de Aveia aclimatadas e não aclimatadas ao frio.

**Calorimetria.** Baseia-se na quantificação de trocas de calor. Reações endotérmicas absorvem calor, enquanto que, as reações exotérmicas liberam calor. A formação de gelo é um processo exotérmico, ou seja, com perda de calor, enquanto que, o descongelamento é um processo endotérmico, com o consumo de calor. Nogales et al. (2015) empregaram a técnica da calorrespirometria (mede simultaneamente taxas de troca de calor, ou seja, calorimetria associado a troca de CO<sub>2</sub> que mede a respiração por tecidos vivos) para caracterizar fenotipicamente plantas de cenoura (*Daucus carota L.*), definindo a temperatura ótima para crescimento, bem como a temperatura mínima para crescimento. Gao et al (2014)

empregaram análise térmica diferencial para estudar o endurecimento ao frio em raízes de doze variedades de uva. Com essa metodologia os autores concluíram que variedades de uva com a camada da exoderme da raiz mais espessa, floema mais fino aliado alta proporção de xilema apresentaram maior tolerância ao frio.

**Crio-Microscopia eletrônica de varredura.** Roden et al. (2009), empregaram (cryo-SEM) crio-microscopia eletrônica de varredura para estudar tolerância ao frio e formação de gelo em acículas de *Pinus radiata*.

**Lixiviação de íons.** O emprego da medida da resistência elétrica de solução de embebição para avaliação de pesquisa fisiológica de tecidos ou sementes é usado de longa data. Hibbard; Miller (1928), trabalhando medida da condutividade elétrica de viabilidade de sementes citam trabalhos de Edward Weber (1836) e Du Bols (1849). Ranke (1865) notou diminuição da resistência elétrica em tecidos mortos de plantas e animais. Em trabalhos de tolerância a seca, De Faria et al. (2013) empregaram a metodologia de lixiviação de íons associada a medida da fluorescência da clorofila entre cultivares de mamona sob déficit de água.

Outro método que emprega características de condutividade elétrica aliado a alterações de frequência. Angersbach; Heinz; Knorr (1999) chamaram de modelo eletrofisiológico para quantificar a relação entre tecidos intactos comparado com tecidos danificados, que chamaram de critério de desintegração celular. Os autores definiram um índice de desintegração baseado nas mudanças da condutividade elétrica em uma amostra de tecido celular.

**Difusão de corantes e pigmentos naturais.** A redução de cloreto de trifeniltetrazólio por tecidos vivos a trifeniiformazana um corante avermelhado e insolúvel está diretamente ligado a atividade da cadeia respiratória mitocondrial, através da transferência de hidrogênio por enzimas desidrogenases. Logo somente tecidos vivos são capazes de reduzir tetrazólio a formazana. A concentração de formazana pode ser detectada por espectrofotometria. Com emprego desta metodologia é possível identificar o estresse por temperatura letal. Steponkus; Lanphear (1967) empregaram esta metodologia para determinar danos pelo frio em plantas lenhosas.

**Fluorescência do PSII.** A fluorescência da clorofila é usada como um teste eficiente da função fotossintética. Assim, a razão entre fotossíntese variável e fotossíntese máxima (Fv/Fm) estima a eficiência da excitação energética capturada pelo centro de reação do fotossistema II - PSII (GENTY et al., 1989). O valor típico é

de Fv/Fm de 0,75 a 0,85 e sua variação pode indicar alteração no sistema fotoquímico da planta (BOLHÀR-NORDENKAMPF; ÖQUIST, 1993). Ploschuka et al. (2014) mediram respostas da fotossíntese e da fluorescência de *Jatropa curcas* ao resfriamento e congelamento durante os estágios iniciais de vegetação. Barawska-Jarmulowcz et al. (2014), usaram fluorescência do fotossistema II para elucidar as razões de tolerância ao frio de *Dactylis glomerata* e *Lolium perene*. Miralles-Crespo et al. (2011), empregaram a fluorescência da clorofila para determinar dano por frio em plantas de Lavanda.

**Ressonância Nuclear Magnética.** Burke et al. (1976) definiram o uso desta técnica como maneira de medir diretamente o conteúdo de água parcialmente congeladas em tecidos. Os autores mencionam o trabalho de Gusta et al. (1975) usando ressonância nuclear magnética espectroscópica para determinar a quantidade de água não congelada em cereais de inverno submetidas a temperaturas abaixo do ponto de congelamento.

**Termografia.** Emprego de análise de imagens na faixa de comprimento de onda do infra-vermelho é possível quantificar a formação de gelo em relação a água no estado líquido, por emitirem comprimentos de onda diferentes. Hacher et al. (2008), empregaram análise térmica infra-vermelho diferencial para estudar propagação de gelo e o padrão de congelamento total de plantas não aclimatadas individuais de várias espécies dos alpes. Wisniewski et al. (2015), empregaram termografia infravermelho de alta resolução para estudar nucleação e propagação de gelo em plantas, para melhor entender os processos de congelamento. Wisniewski et al. (2008) com emprego de termografia de infravermelho associado calorimetria com emprego de termopares para monitorar processos de congelamento em plantas. Com essa metodologia os autores definiram claramente os sítios iniciais de nucleação e como eles se espalham pelos tecidos. Fuller et al. (2003), empregaram imagem de termografia infra-vermelho para estudar a proteção de plantas contra geada usando filme de partículas hidrofóbicas e polímeros acrílicos. Stier et al. (2003), empregaram um radiômetro de imagem infra-vermelho para visualizar progressão do congelamento em espécies de grama usadas em campos de golfe. Workmaster et al. (1999), estudaram nucleação e propagação de gelo em copas de mirtilo vermelho e frutos usando termografia infravermelho. Os autores demonstraram evidências que as folhas são nucleadas por penetração via estômato.

**Osmometria.** Quantifica a concentração osmótica de soluções dos compartimentos celulares. Com emprego dessa metodologia Bakradze et al. (2008) estudaram as particularidades de cristalização de água e processos de fusão do gelo em raízes de plantas com um ano de idade de *Plantago major*.

**Trocas gasosas.** A eficiência da fotossíntese, através da eficiência da clorofila ou através da avaliação de trocas gasosas, pode ser empregada para quantificar danos provocados por estresse causado pelo frio. Desta forma, Nogales et al. (2015) empregaram a técnica da calorrespirometria (mede simultaneamente taxas de calor associado a emissão de CO<sub>2</sub> por tecidos vivos) para caracterizar fenotípicamente plantas de cenoura (*Daucus carota*), definindo a temperatura ótima para crescimento, bem como a temperatura mínima para crescimento.

**Análises Bioquímicas.** Permitem entender as alterações bioquímicas associadas aos processos de tolerância ao frio.

Certas bactérias atuam internamente com pontos de nucleação de gelo. Por esta razão são consideradas patogênicas. Tomalty et al. (2014) estudaram a produção de proteínas que atuam com características anti congelantes e controlam o crescimento dos cristais de gelo evitando o dano às plantas. Assim como certas bactérias atuam como pontos de nucleação de gelo, outros compostos orgânicos também apresentam essa característica. Kuwabara et al. (2012) estudaram atividades congelantes de flavonoides em soluções contendo diferentes agentes nucleadores de gelo. Zhang et al. (2011) mediram o metabolismo de citocininas e ácido abscísico para avaliar aclimatação e desaclimatação ao frio de cinco variedades de Grama Bermuda. Zhang et al. (2008), avaliaram o metabolismo de ácido abscísico e expressão da proteína dehidrina durante aclimatação ao frio de grama Bermuda. Kumar et al. (2008), concluíram que aplicação exógena de Ácido Abscísico melhora a tolerância ao frio grão de bico (*Cicer arietinum*), através da melhora do estado da água das folhas, bem como, pela redução do dano oxidativo.

**Análise de estruturas anatômicas/histologia.** A histologia permite visualizar os danos provocados pelo frio sobre as alterações das estruturas morfológicas e anatômicas. Livingston III e Tallury (2009) empregaram análise térmica associado com histologia para avaliar o comportamento diferencial de plantas de Aveia aclimatadas e não aclimatadas ao frio.

## **2.5 Zoneamento de risco climático**

As espécies vegetais se adaptaram a ambientes de acordo com as condições climáticas vigentes. O homem, por meio da agricultura, expandiu as fronteiras, desenvolvendo novas cultivares sem observar, muitas vezes, além dos limites toleráveis de cultivo comercial. Nas últimas décadas foram feitos investimentos em coletas de dados meteorológicos, levantamentos de solos e estudos de pesquisa sobre exigências climáticas das culturas. Essa grande base de dados possibilita, atualmente, realizar o zoneamento das diferentes culturas agrícolas, determinando as áreas aptas e os níveis de riscos envolvidos.

O zoneamento de risco climático atualmente é disponível para a maioria das culturas agrícolas, incluindo café (CARAMORI et al., 2001), soja (FARIAS et al., 2001), trigo (CUNHA et al., 2001), Uva (RICCE et al., 2014), Pêssego e nectarina (CARAMORI et al., 2008), cana-de-açúcar (WREGE et al., 2005), dentre outras.

O zoneamento tornou-se uma importante ferramenta de crédito agrícola, possibilitando a semeadura em épocas de menor risco e com maior potencial produtivo (ROSSETI, 2001).

Dentre os fatores de risco, as temperaturas críticas, a deficiência e o excedente hídrico são os que mais causam perdas.

A temperatura é de tal maneira limitante que normalmente se evita o plantio em áreas de risco elevado, sob pena de haver perdas em praticamente todos os anos. Considerando que o regime térmico é governado pela disponibilidade de energia solar, existe uma certa regularidade nos limites de exploração das culturas de acordo com seu nível de tolerância a baixas temperaturas ou temperaturas muito elevadas.

Por outro lado, as chuvas, apesar de terem um ciclo sazonal, apresentam grande variabilidade espacial e interanual, que causam perdas constantes à agricultura. Desta forma, a deficiência hídrica se constitui no maior fator de risco para a agricultura.

O zoneamento de risco climático comprehende justamente estabelecer os fatores de risco para cada espécie vegetal. Séries de dados meteorológicos de pelo menos 30 anos de coleta diária são utilizados para determinar as probabilidades de eventos desfavoráveis durante as fases mais sensíveis do ciclo, para cada época de semeadura. Normalmente se estabelece um nível de risco aceitável e os municípios

que se enquadram abaixo do máximo tolerável para as épocas de semeadura analisadas são recomendados para o cultivo.

A frequência de geadas pode ser adequadamente estimada conhecendo-se o gradiente entre a temperatura mínima de abrigo a 1,7 m da superfície do solo e a temperatura mínima de relva medida a 0,05 m da superfície do solo.

## REFERÊNCIAS

- ASLAMARZ, A. A.; VAHDATI, K.; RAHEMI, M.; HASSANI, D.; LESLIE, C. Supercooling and cold-hardiness of acclimated and deacclimated buds and stems of persian walnut cultivars and selections. **Hortscience**, Alexandria, v. 45, p. 1662-1667, 2010.
- ASLAMARZ, A. A.; VAHDATI, K.; RAHEMI, M.; HASSANI, D. A. F. Cold-hardiness evaluation of persian walnut by thermal analysis and freezing technique. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 861, p. 269-272, 2010.
- ANDERSON, J. A.; TALIAFERRO, C. M.; MARTIN, D. L. Evaluating freeze tolerance of Bermuda grass in a controlled environment. **Hortscience**, Alexandria, v. 28, n. 9, p. 955, 1993. Disponível em: <<http://hortsci.ashpublications.org/content/28/9/955.full.pdf+html>>. Acesso em: 12 dez. 2016.
- ANDERSON, J. A.; WU, Y. Q. Freeze tolerance of forage bermudagrasses. **Grass and forage science**. v. 66, n. 3, p. 449-452, 2011.
- ANGERSBACH, A.; HEINZ, V.; KNORR, D. Electrophysiological model of intact and processed plant tissues: cell disintegration criteria. **Biotechnology Progress**, Malden, v.15, n. 4, p. 753-762, 1999.
- ARIAS, N. S.; BUCCI, S. J.; SCHOLZ, F. G.; GOLDSTEIN, G. Freezing avoidance by supercooling in *Olea europaea* cultivars: the role of apoplastic water, solute content and cell wall rigidity. **Plant Cell and Environment**, Chichester, v. 38, p. 2068-2070, 2015.
- BALL, D. M.; HOVELAND, C. S.; LAC EFIELD, G. D. **Southern Forages**. 4. ed. Norcross: IPNI, 2007.
- BAKRADZE, N.; KIZIRIA, E.; SOKHADZE, V.; GOGICHAISHVILI, S. The peculiarities of water crystallization and ice melting processes in the roots of one-year plants (*Plantago major* L.). **Cryoletters**, Lewes, v. 20, p. 217-228, 2008.

BRASIL. **Cadastro rural**. Disponível em:

<<http://www.cadastrorural.gov.br/noticias/rfb/areas-de-pastagens-de-todo-o-pais-terao-mapeamento-inedito>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

BORAWSKA-JARMIŁOWICZ, B.; MASTALERCZUK, G.; KALAJI, H. M; CARPENTIERC, S.; PIETKIEWICZB, S.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Photosynthetic efficiency and survival of *Dactylis glomerata* and *Lolium perenne* following low temperature stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 61, n. 3, p. 281–288, 2014.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; ÖQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D. O., SCURLOCK, J. M. O., BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R., LEEGOOD, R. C., LONG, S. P. (Ed.). **Photosynthesis and production in a changing environment**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993. p.193-206.

BRESOLIN, A. P. S.; CASTRO, C. M.; HERTER, F. G.; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, F. I. F.; PEREIRA, F. B.; VIEIRA, C. L.; RETOLI, R. F. Tolerância ao frio do amendoim forrageiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 1154-1157, 2008.

BROWN, M. S.; PEREIRA, E. S. B., FINKLE, B. J. Freezing of nonwoody plant tissue. II. Cell damage and the fine structure of freezing curves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 53, n. 5, p. 709-711, 1974.

BURKE, M. J.; GUSTA, L. V.; QUAMME, H. A.; WEISER, C. J.; LI, P. H. Freezing and Injury in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 27, p. 507-528, 1976.

CARAMORI, P. H.; MANETTI FILHO, J. **Proteção dos cafeeiros contra geadas**. Londrina: IAPAR, 1993. 28 p. IAPAR, Circular, 79.

CARAMORI, L. P. C.; CARAMORI, P. H.; MANETTI FILHO, J. Effect of leaf water potential on cold tolerance of *Coffea Arabica* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Ribeirão Preto, v. 45, n. 4, p. 439-443, 2002.

CARAMORI, P. H.; CAVIGLIONE, J. H.; WREGE, M. S.; GONÇALVES, S. L.; FARIA, R. T.; ANDROCIOLI FILHO, A.; SERA, T.; CHAVES, J. C. D.; KOGUISHI, M. S. Zoneamento de riscos climáticos para a cultura do café (*Coffea arabica* L.) no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Sete Lagoas, v. 9, n. 3, p. 486-494, 2001.

CARAMORI, P. H.; CAVIGLIONE, J. H.; WREGE, M. S.; HERTER, F. G.; HAUAGGE, R.; GONÇALVES, S. L.; CITADIN, I.; RICCE, W. S. Zoneamento agroclimático para o pessegueiro e a nectarineira no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 4, p. 1040-1044, 2008.

CAVIGLIONE, J. H.; KIIHL, L. R. B.; CARAMORI, P. H.; OLIVEIRA, D. **Cartas climáticas do Paraná**. Londrina: IAPAR, 2000. CD.

CERQUEIRA, R. C. **Influência do frio e do défice hídrico nas características fisiológicas e bioquímicas em videiras (*Vitis vinifera L.*) cv. thompson seedless.** 2011. 122 f. Tese. (Doutorado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

CHAVES, J. C. D.; MANETTI FILHO, J. Danos de geadas em cafeeiros submetidos a adubação potássica e calagem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 16., 1990, Espírito Santo do Pinhal. **Resumos...** Espírito Santo do Pinhal: [S.n.] 1990. p. 86.

CUNHA, G. R. Zoneamento agrícola e época de semeadura para trigo no Brasil. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Passo Fundo, v. 9, n. 3, p. 400-414, 2001.

DAMI, I. E.; LI, S. ; ZHANG, Y. Evaluation of primary bud freezing tolerance of twenty-three winegrape cultivars new to the Eastern United States. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 67. n. 2, p. 139-145, 2016.

DE FARIA, A. P.; LEMOS-FILHO, J. P.; MODOLO, L. V.; FRANÇA, M. G. C. Electrolyte leakage and chlorophyll a fluorescence among castor bean cultivars under induced water deficit. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 35, n. 1, p. 119-128, 2013.

DIAS-FILHO, M. B.; ANDRADE, C. M. S. Pastagens no ecossistema rotativo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Goiânia. **Anais....** Goiânia: [S.n.], 2005. p. 94-104.

DIAS FILHO, M. B. **Diagnóstico das pastagens no Brasil.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2014. 36 p. Documentos, 402. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/102203/1/DOC-402.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2016.

DU BOIS-REYMOND, E. **Untersuchungen fiber tierische Electricitit.** Berlin: G. Reimer. 1848-1860. 2v.

EMBRAPA-EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. 2005. **Brachiaria spp.** Disponível em:<[www.cnptia.embrapa.br/eventos/2005/workshop-mortebrachiaria/](http://www.cnptia.embrapa.br/eventos/2005/workshop-mortebrachiaria/)>. Acesso em 25 nov. 2016.

EVANS, M. A.; SKINNER, D. Z.; KOENIG, R. T. et al. Effect of phosphorus, potassium, and chloride nutrition on cold tolerance of winter canola (*Brassica napus* L.). **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 39, n. 8, p. 1112-1122, 2016.

FARIAS, J. R. B.; ASSAD, E. D.; ALMEIDA, I. R. de; EVANGELISTA, B. A.; LAZZAROTTO, C.; NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A. L. Caracterização de risco de déficit hídrico nas regiões produtoras de soja no Brasil. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Sete Lagoas, v. 9, n. 3, p.415-421, 2001.

FERRAGINE, M. Del C. **Determinantes morfológicos de produtividade e persistência de genótipos de alfafa sob pastejo.** Piracicaba, 2003. 116 f. Tese

(Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

FIEBELKORN, D.; RAHMAN, M. Development of a protocol for frost-tolerance evaluation in rapeseed/canola (*Brassica napus* L.). **The Crop Journal**, Beijing, v. 4, n. 2, p. 147-152, 2016.

FLORIANI, M. M. P.; STEFFENS, C. A.; CHAVES, D. M.; DO AMARANTE, C. V. T.; PIKART, T. G.; RIBEIRO, D. M. Relação entre concentrações foliares de carboidratos solúveis totais e tolerância ao frio em diferentes espécies de *Eucalyptus* spp. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 1, p. 165-174, 2013.

FULLER, M.; HAMED, F.; WISNIEWSKI, M.; GLENN, D. M.; FULLER, A. F.; HAMED, M. F.; WISNIEWSKI, M.; GLENN, D. M. Protection of plants from frost using hydrophobic particle film and acrylic polymer. **Annals of Applied Biology**, Chichester, v. 43, n. 1, p. 93-97, 2003.

GAO, Z.; LI, J.; ZHU, H.; SUN, L.; DU, Y.; ZHAI, H. Using differential thermal analysis to analyze cold hardiness in the roots of grape varieties. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 174, p. 155–163, 2014.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 990, n. 1, p. 87-92, 1989.

GOMEZ-RUIZ, P. A.; LINDIG-CISNEROS, R.; DE LA BARRERA, E; MARTORELL, C. Potassium enhances frost tolerance in young individuals of three tropical dry forest species from Mexico. **Functional Plant Biology**, Clayton, v. 43, n. 5, p. 461-467, 2016.

GONDOR, O. K.; SZALAI, G.; KOVACS, V.; JANDA, T.; PÁL, M. Relationship between polyamines and other cold-induced response mechanisms in different cereal species. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, v. 202, n. 3, p. 217-230, 2016.

GUNES, A.; TURAN, M.; KITIR, N. Effects of bio-bor fertilizer applications on fruit yield, antioxidant enzyme activity and freeze injury of strawberry. **Erwerbs-Obstbau**, Heidelberg, v. 58, n. 3, p. 177-184, 2016.

GUSTA, L. V.; BURKE, J.; KAPOOR, A. Determination of unfrozen water in winter cereals at subfreezing temperatures. **Plant Physiology**, Rockville, v. 56, p. 707-709, 1975.

HANSEN, J. M. Effects of nutritional factors on frost hardening in *Larix leptolepis* (Sieb & Zucc.) gord. **Scandinavian Journal of Forest Research**, Stockholm, v. 7, n. 1-4, p. 183-192, 1992.

HACKER, J.; NEUNER, G.; HACKER, A. F.; NEUNER, G. J. Ice propagation in dehardened alpine plant species studied by infrared differential thermal analysis (IDTA). **Arctic Antarctic and Alpine Research**, Boulder, v. 40, p. 660-670, 2008.

HIBBARD R. P.; MILLER, E. V. Biochemical studies on seed viability. I. Measurements of conductance and reduction. **Plant Physiology**, Rockville, v. 3, p. 335-352. 1928.

HU, Z.; FAN, J.; CHEN, K.; AMOMBO, E.; CHEN, L.; FU, J. Effects of ethylene on photosystem II and antioxidant enzyme activity in Bermuda grass under low temperature. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 128, n. 1, p. 59-72. 2016.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 1920/2006**. Rio de Janeiro: IBGE, 2007. Disponível em: <<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

JANDA, T.; MAJLÁTH, I.; SZALAI, G. Interation of temperature and Light in the development of freezing tolerance in plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 33, p. 460-469, 2014.

KAGALE, S.; DIVI, U. K.; KROCHKO, J. E.; KELLER, W. A.; KRISHNA, P. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. **Planta**, Heidelberg, v. 225, n. 2, p. 353–364, 2007.

KOSTER, K. L., LYNCH, D. V. Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, p. 108-113, 1992.

KRASNUK, M.; WITHAM, F. H., JUNG, G. A. Electrophoretic studies of several hydrolytic enzymes in relation to the cold tolerance of alfalfa **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 13, p. 225-242, 1976.

KUMAR, S., KAUR, G., NAYYAR, H., KUMAR, A.F., KAUR, S., NAYYAR, G. H. Exogenous application of abscisic acid improves cold tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, v. 194, p. 449–456, 2008.

KUWABARA,C.; WANG,D.; KASUGA, J.; FUKUSHI,Y.; ARAKAWA, K.; KOYAMA,T; INADA,T. I.; FUJIKAWA,S. Freezing activities of flavonoids in solutions containing different ice nucleators. **Cryobiology**, Maryland, v. 64, n. 3, p. 279-285, 2012.

LIVINGSTON III, D. P.; TALLURY, S. P. Freezing in non-acclimated Oat. II: Thermal response and histology of recovery in gradual and rapidly frozen plants. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 481, p. 20-27, 2009.

LIVINGSTON III, D. P.; TALLURY, S. P. PREMKUMAR, R.; OWENS, S. A.; OLLEN, C.R. Changes in the histology of cold-hardened oat crowns during recovery from freezing. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 4, p. 1545-1558, 2005.

MACEDO, M. C. M. **Aspectos relacionados com a produção de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2006. 65 p.

MACOLINO, S.; SERENA, M.; LEINAUER, B.; ZILIOOTTO, U. Preliminary findings on the correlation between water-soluble carbohydrate content in stolons and first year

green-up of seeded bermuda grass cultivars. **HortTechnology**, Alexandria, v. 20, n. 4, p. 758-763, 2010.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; RODRIGUES, J. A. S. **Cultivo do Sorgo - Ecofisiologia**. 4. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo Sistemas de Produção, 2008. Disponível em: <[http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/Sorgo\\_4\\_ed/ecofisiologia.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/Sorgo_4_ed/ecofisiologia.htm)>. Acesso em: 25 nov. 2016.

MANETTI FILHO, J.; CARAMORI, P. H. Desenvolvimento de uma câmara para simulação de temperaturas baixas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 21, n. 10, p. 1005-1008, 1986.

MARGARITIS, A.; BASSI, A. S. Principles and biotechnological applications of bacterial ice nucleation. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 277-295, 1991.

MEDEIROS, L. T. **Pastagem de Brachiaria brizantha fertirrigada com dejetos líquidos de suínos**. 2004. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2004.

MOREIRA, H. J. C.; BRAGANÇA, H. B. N. **Manual de identificação de plantas infestantes**: cultivos de verão. Campinas: FMC Química do Brasil, 2010. 642 p.

MUTLU, S.; ATICI, Ö; NALBANTOGLU, B.; METE, E. Exogenous salicylic acid alleviates cold damage by regulating antioxidative system in two barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. **Frontiers in Life Science**, Abingdon, v. 9, n. 2, p. 99-109, 2016.

MAZZUCOTELLI, E.; TARTARI, A.; CATTIVELLI, L; FORLANI, G. Metabolism of  $\alpha$ -aminobutyric acid during cold acclimation and freezing and its relationship to frost tolerance in barley and wheat. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.14, p. 3755-3766, 2006.

MIRALLES-CRESPO, J.; MARTÍNEZ-LOPES, J. A.; FRANCO-LEEMHUIS, J. A.; BAÑÓN-ARIAS, S. Determining freezing injury from changes in chlorophyll fluorescence in potted oleander plants. **HortScience**, Alexandria, v. 46, n. 6, p. 895-900, 2011.

MUNSHAW, G. C.; ERVIN, E. H.; BEASLEY, J. S.; SHANG, C; ZANG, X.; PARRISH, D.J. Effects of late-season ethephon applications on cold tolerance parameters of four bermuda grass cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 50, n. 3, p. 1022-1029, 2010.

NOGALES, A.; MUNOS-SANHUENZA, L.; HANSEN, L. D.; ARNHOLDT-SCHIMMITT, B. Phenotyping carrot (*Daucus carota* L.) for yield-determining temperature response by calorespirometry. **Planta**, Heidelberg, v. 241, n. 2, p. 525-538, 2015.

- NUERNBERG, N. J.; MILAN, P. A.; SILVEIRA, C. A. M. **Cultivo, manejo e utilização da alfafa.** In: EMPRESA CATARINENSE DE PESQUISA AGROPECUARIA. Florianópolis: EMPASC, 1990. p. 15-61. Manual de produção de alfafa.
- NUNES, S. G.; BOOCK, A.; PENTEADO, M. I. O.; GOMES, D. T. ***Brachiaria brizantha* cv. Marandu.** Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1985. 31 p. (Documento, 21).
- PARKER, J. Cold resistance in woody plants **The Botanical Review**, New York, v. 29, n. 2, p. 123–201, 1963.
- PERL-TREVES, R.; PERL, A. Oxidative stress: an introduction. In: VAN MONTAGU, M.; INZE, D. (Ed.). **Oxidative stress in plants.** New York: Taylor and Francis Books, 2002. p. 1-32.
- PLOSCHUKA, E. L.; BADO, L. A.; SALINAS, M.; WASSNER, D. F; WINDAUER, L. B; INSAUSTI, P. Photosynthesis and fluorescence responses of *Jatropha curcas* to chilling and freezing stress during early vegetative stages. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 102, p. 18–26, 2014.
- RANKE, J. **Tetanus:** eine physiologische studie. Leipzig: W. Engelmann, 1865. 490 p.
- RICCE, W. .; CARVALHO, S. L. C.; CARAMORI, P. H.; ROBERTO, S. R. Zoneamento agroclimático da cultura da videira no Estado do Paraná. **Semina**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 2327-2336, 2014.
- RODEN, J. S.; CANNY, M. J.; HUANG, C. X.; BALL, M. C. Frost tolerance and ice formation in *Pinus radiata* needles: ice management by the endodermis and transfusion tissues. **Functional Plant Biology**, Clayton, v. 36, n. 2, p. 180-189. 2009.
- ROSSETTI, L.A. Zoneamento agrícola em aplicações de crédito e segurança rural no Brasil: aspectos atuariais e de política agrícola. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Sete Lagoas, v. 9, n. 3, p. 386-399, 2001.
- SAKAI, A. Survival of the twig of woody plants at -196°C. **Nature**, Washington, v. 185, n. 4710, p. 393–394, 1960.
- SARIKHANI, H.; HAGHI, H.; ERSHADI, A.; ESNA-ASHARI, M.; POUYA, M. Foliar application of potassium sulphate enhances the cold-hardiness of grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Abingdon, v. 89, n. 2, p. 141–146, 2014.
- SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SENTELHAS, P. C.; ORTOLANI, A. A.; PEZZOPANE, J. R. M. Diferença de temperatura entre abrigo meteorológico e a relva, em noites de geada, no Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v. 54, n. 2, p. 437-445, 1995.

SHI, H.; YE, T.; CHAN, Z. Exogenous application of hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide enhanced multiple abiotic stress tolerance in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.). **Plant physiology and biochemistry**, Issy les Moulineaux, v. 71, p. 226-234, 2013.

SIEGEL, B. Z. Plant peroxidases – an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 12, n. 3, p. 303-312, 1993.

SIGNORELLI, S.; DANS, P. D.; COITIÑO, E. L.; BORSANI, O.; MONZA, J. Connecting proline and  $\gamma$ -aminobutyric acid in stressed plants through non-enzymatic reactions. **Plos One**, San Francisco, 2015. Disponível em: <[>](#). Acesso em 16 dez. 2016.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.

STEPONKUS, P. L.; LANPHER, F. O. Refinement of the triphenyl Tetrazolium chloride Method of Determining Cold Injury. **Plant Physiology**, Rockville, v. 42, p. 1423-1426, 1967.

STIER, J. C.; FILIAULT, D. L.; WISNIEWSKI, M.; PALTA, J. P. Visualization of freezing progression in turfgrasses using infrared video thermography. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 1, p. 415-420, 2003.

TOMALTY, H. E.; WALKER, V. K. Perturbation of bacterial ice nucleation activity by a grass antifreeze protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Philadelphia, v. 452, n. 3, p. 636-641, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

WEBER, E. **Questiones physiologicae de phenomenis galvano-magneticis in corpore humano observatis**. Leipzig. 1836.

WISNIEWSKI, M.; NEUNER, G.; GUSTA, L. V. The use of high-resolution infrared thermography (HRIT) for the study of ice nucleation and ice propagation in plants. **JOVE-Journal of Visualized Experiments**, Cambridge, v. 99, 2015. <http://www.jove.com/video/52703>. Doi:10.3791/52703

WISNIEWSKI, M.; GLENN, D. M.; GUSTA, L.; FULLER, M. Using infrared thermography to study freezing in plants. **Hortscience**, Alexandria, v. 43, n. 6, p. 1648-1651, 2008.

WORKMASTER, B. A.; PALTA, J. P.; WISNIEWSKI, M. Ice nucleation and propagation in cranberry uprights and fruit using infrared video thermography.

**Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 124, n. 6, p. 619-625, 1999.

WREGE, M. S.; CARAMORI, P. H.; GONÇALVES, A. C. A.; BERTONHA, A.; CAVIGLIONE, J. H.; FARIA, R. T. de; FERREIRA, R. C.; FREITAS, P. S. L. de; GONÇALVES, S. L. Ocorrência da primeira geada de outono e última de primavera no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Sete Lagoas, v. 12, n. 1, p. 143-150, 2004.

WREGE, M. S.; CARAMORI, P. H.; GONÇALVES, A. C. A.; BERTONHA, A.; FERREIRA, R. C.; CAVIGLIONE, J. H.; FARIA, R. T. DE; FREITAS, P. S. L. DE; GONÇALVES, S. L. Regiões potenciais para cultivo da cana-de-açúcar no Paraná, com base na análise do risco de geadas. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Sete Lagoas, v. 13, p. 113-122, 2005.

WREGE, M. S.; STEINMETZ, S.; REISSER JUNIOR, C.; ALMEIDA, I. R. (Ed.). **Atlas climático da Região Sul do Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; Colombo: Embrapa Florestas, 2011. 336 p.

XIA, X. J.; WANG, Y. J.; ZHOU, Y. H.; TAO, Y.; HUA, W.; MAO, W. H.; SHI, K., ASAMI, T., CHEN, Z., YU, J. Q. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. **Plant Physiology**, Rockville, v. 150, n. 2, p. 801-814, 2009.

ZHANG, X; ERVIN, E. H.; WALTZ, C.; Murphy, T. Metabolic changes during cold acclimation and deacclimation in five bermudagrass varieties: II. Cytokinin and abscisic acid metabolism. **Crop Science**, Madison, v. 51, n. 2, p. 847-853, 2011.

ZHANG, X.; WANG, K.; ERVIN, E. H. Bermudagrass freezing tolerance associated with abscisic acid metabolism and dehydrin expression during cold acclimation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 133, n. 4, p. 542-550, 2008.

### **3 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA PARA IDENTIFICAR DANOS POR FRIO EM ESPÉCIES DE FORRAGEIRAS**

#### **RESUMO**

A ocorrência de geadas no Sudeste e Sul do Brasil afeta a qualidade das pastagens e limita o uso de espécies com elevado potencial produtivo para alimentação animal. Avaliações de dados de geadas têm sido fundamentadas em critérios visuais, com imprecisão devido à subjetividade. Neste trabalho avaliou-se a tolerância de espécies forrageiras a temperaturas baixas utilizando uma metodologia quantitativa, com base na fluorescência da clorofila e condutividade elétrica da solução embebida com discos de folhas pós-teste. Foram analisadas as forrageiras: alfafa (*Medicago sativa*), Sorgo (*Sorghum bicolor*), Aveia Preta (*Avena strigosa*), Marandu (*Brachiaria brizantha*), Milheto (*Pennisetum glaucum*), capim Mombaça (*Panicum maximum*) e Tifton 85 (*Cynodon spp*). As plantas foram submetidas a temperaturas mínimas de 0,2 -0,9, -1,8, -2,7, -4,1, -4,6 e -6,2°C, durante uma hora, no interior de uma câmara de crescimento com condições de luminosidade e temperatura controladas. O início dos danos correspondeu a um aumento súbito na condutividade elétrica da solução e diminuição na fluorescência. A partir das seguintes temperaturas detectou-se o início dos danos celulares: Milheto -1,8°C, Aveia e Sorgo -2,7°C, Marandu e Alfafa, -4,6°C e Tifton 85 sem danos até -6,2°C. O capim Mombaça foi o único que apresentou resultados discrepantes, com -2,7°C pela fluorescência da clorofila e -4,6°C pela condutividade elétrica. Os métodos empregados revelaram-se adequados para avaliar tolerância ao frio em forrageiras.

**Palavras chave:** Geda. Pastagens. Forrageiras tropicais. Avaliação de danos por frio. Lixiviação de íons.

## ELECTRICAL CONDUCTIVITY AND FLUORESCENCE OF THE CHLOROPHYLL TO IDENTIFY COLD INJURY IN FORAGE SPECIES

### ABSTRACT

The occurrence of frosts in the high lands of the southeast and south of Brazil affects the quality of pastures and limits the use of species with high yield potential for animal feeding. Frost damage assessments have been based on visual criteria, with uncertainty due to subjectivity. This paper evaluates the tolerance of forage species to low temperatures using a quantitative approach, based on fluorescence of chlorophyll and electrical conductivity of the solution soaked with post-test leaf discs. The following forage species were analyzed: alfalfa (*Medicago sativa*), sorghum (*Sorghum bicolor*), black oat (*Avena strigosa*), Marandu grass (*Brachiaria brizantha*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*), Mombasa grass (*Panicum maximum*) and Tifton 85 (*Cynodon* spp). The plants were exposed to minimum temperatures of 0.2, -0.9, -1.8, -2.7, -4.1, -4.6 and -6.2°C for one hour, within a growth chamber with controlled conditions of light and temperature. The onset of damage corresponded to a sudden increase in the electrical conductivity of the solution and decrease in fluorescence. The following temperatures were identified at the beginning of cell damages: Millet -1.8°C, Sorghum and Oat -2.7°C, Marandu and Alfalfa -4.6°C, and Tifton 85 without damage until -6.2°C. Mombasa grass was the only one that presented discrepant results, with -2.7 °C for chlorophyll fluorescence and -4.6°C for the electrical conductivity. The methods employed were suitable for evaluating cold tolerance in forages.

**Keywords:** Frost. Forage. Tropical forages. Cold damage evaluation. Ion lixiviation.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O clima é o fator principal que determina a adaptação e o crescimento das plantas forrageiras (MCLOUD; BULA, 1985). O Paraná está situado em região de transição climática de clima subtropical alterando-se para tropical (CAVIGLIONE et al., 2000; WREGE et al., 2011), e apresenta condições de luminosidade, temperatura e precipitações pluviométricas adequadas para aumentar o potencial de resposta na produtividade da forragem.

As pastagens constituem a principal fonte de alimentação da pecuária de corte, devido ao seu baixo custo em relação a outras fontes de nutrição (CANTO et al., 2010; LAABS, 2011). Entretanto, para algumas regiões, as condições climáticas na estação fria dificultam o desempenho dos animais, já que as plantas forrageiras paralisam o crescimento principalmente pelas baixas temperaturas e menor luminosidade, reduzindo a disponibilidade de matéria seca e impactando o desenvolvimento dos animais em pastejo.

A essas situações se somam as geadas de ocorrência regular no outono-inverno, que crestam a forragem disponível e, consequentemente, verificam-se perdas de peso dos animais (CANTO et al., 2010).

A escolha de espécies apropriadas, de acordo com a severidade das geadas que ocorrem em cada região, possibilita melhor planejamento do orçamento forrageiro, a fim de reduzir a sazonalidade de matéria seca (COSTA et al., 2008). Para tanto, é necessário conhecer a tolerância de cada espécie e cultivar a baixas temperaturas, para que se possa compor um sistema de forrageamento com base na adaptação das espécies ao longo do ano de acordo com o clima regional (COSTA et al., 2008).

Poucos são os estudos que procuram caracterizar a tolerância às geadas em pastagens. De acordo com Canto et al. (2010) muitas pesquisas com pastagens devem ainda ser realizadas, de forma que o reconhecimento do papel e do potencial das pastagens é importante para o desenvolvimento da pecuária de corte no Paraná.

Existe uma grande diversidade de tolerância ao frio entre espécies forrageiras. O trevo branco, a leguminosa forrageira de produção invernal mais usada para pastejo direto, em associação com gramíneas (BALL et al., 1996), não tolera temperatura elevada, sendo, entretanto, razoavelmente tolerante às geadas.

Ferolla et al. (2007) e Flores et al. (2008) destacaram que a utilização de forrageiras de estação fria como o Azevém, Aveia e o Centeio tem sido uma ótima alternativa para os produtores de leite por apresentarem uma boa qualidade e um bom potencial de produção de matéria seca, além de amenizar os períodos de estiagem forrageira que ocorrem no outono e inverno, sendo importantes para a alimentação de ruminantes durante esse período nas regiões de clima temperado. Botrel et al. (2002) avaliaram 16 espécies de gramíneas forrageiras no Vale do Paraíba (SP) e destacaram *Hemarthria altissima* e *Setaria anceps* como tolerantes à geada.

A avaliação da sensibilidade das plantas pela sua exposição às temperaturas inferiores a 2 °C, em ambiente controlado, pode ser um procedimento bastante eficiente na predição de tolerância em função de assegurar uma homogeneidade dos níveis de frio, como demonstraram Annicchiarico et al. (2001) em trevo branco e Bresolin et al. (2008) em amendoim forrageiro, para os quais a avaliação da tolerância ao frio nos experimentos em ambientes controlados foi bastante eficiente.

Como forma de avaliar os danos causados às plantas pelo estresse das temperaturas baixas, a maioria dos trabalhos realizam avaliações visuais, morfológicas, análises fisiológicas de crescimento, trocas gasosas e fluorescência, como Simoni et al. (1999) em leucena, Ramalho et al. (2000) em café, Bresolin et al. (2008) em amendoim forrageiro e Dalmago et al. (2010) em canola.

A fluorescência é usada como um teste eficiente da função fotossintética. Assim, a relação entre a fotossíntese variável e a fotossíntese máxima (Fv/Fm) estima a eficiência da excitação energética capturada pelo centro de reação do fotossistema II - PSII (GENTY et al., 1989). O valor típico de Fv/Fm é entre 0,75 a 0,85 e sua variação pode indicar alteração no sistema fotoquímico da planta (BOLHÀR-NORDENKAMPF; ÖQUIST, 1993).

Além desses testes, a avaliação da condutividade elétrica destaca-se como uma medida simples, rápida, eficiente e facilmente reproduzível, sendo uma ótima forma de selecionar materiais pela tolerância ao frio em oliveiras (BARRANCO et al., 2005). Este teste baseia-se na avaliação da lixiviação dos eletrólitos da membrana celular logo após o estresse, sendo que de acordo com Guye et al. (1987) a perda da integridade da membrana resultante da prolongada exposição à baixa temperatura é a resposta principal das plantas sensíveis ao frio, podendo causar danos fotoxidativos. Assim, este teste tem sido utilizado por alguns autores com

sucesso, como em *Eucaliptus* (SILVA et al., 2009; FLORIANI et al., 2013), oliveira (MOSHTAGHI et al., 2009) e trigo (HABIBI et al., 2011).

Neste trabalho se propôs verificar a tolerância de espécies forrageiras a temperaturas baixas utilizando uma metodologia quantitativa, com base na fluorescência da clorofila e condutividade elétrica da solução embebida com discos de folhas pós-teste, de forma a identificar o ponto inicial de danos por baixas temperaturas, e assim contribuir para a caracterização dessas espécies.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na fazenda experimental do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), em Londrina, PR, com as espécies de forrageiras de interesse econômico Mombaça (*Panicum maximum*); Marandu (*Brachiaria brizantha*), Tifton 85 (*Cynodon* spp), Milheto (*Pennisetum glaucum*), Sorgo (*Sorghum bicolor*), Aveia Preta (*Avena strigosa*) e Alfafa (*Medicago sativa*). O Tifton 85 foi propagado com ramos de aproximadamente 20 cm e as demais espécies por semeadura, em vasos com volume de 500 ml contendo substrato de duas partes de solo, uma parte de esterco de curral curtido e 1 kg de NPK 4-30-10 por metro cúbico. As plantas foram conduzidas em casa de vegetação por um período de dois meses. A seguir foram submetidas a baixas temperaturas no interior de uma câmara de crescimento com controle de luminosidade e temperatura (ref. comercial S. S. Cientific), programada para atingir as temperaturas mínimas de 0,2, -0,9, -1,8, -2,7, -4,1, -4,6 e -6,2°C, permanecendo no nível crítico por uma hora e retornando à temperatura ambiente (Figura 1).

Após a realização dos testes, as plantas foram submetidas a avaliações de fluorescência da clorofila e condutividade elétrica da solução de discos foliares embebidos em água deionizada, conforme descrito a seguir.

**Fluorescência:** As determinações de fluorescência foram feitas usando-se o medidor de fluorescência (ref comercial Optiscience modelo OS5<sup>®</sup>), conforme Genty et al. (1989) e Bolhàr-Nordenkampf; Öquist (1993). As leituras foram efetuadas na epiderme adaxial de uma mesma folha totalmente expandida, em replicata, antes e após o estresse por frio, em seis plantas. Foram avaliados os parâmetros de

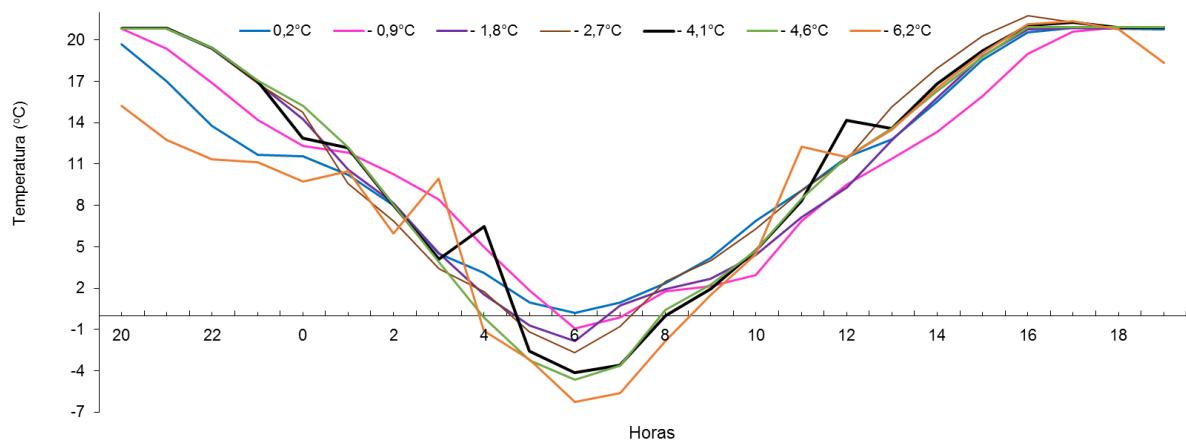
fluorescência inicial ( $F_0$ ), máxima ( $F_m$ ), variável ( $F_v$ ) e a eficiência quântica do PS II ( $F_v/F_m$ ).

**Condutividade elétrica:** Após serem submetidas às temperaturas baixas, as folhas foram cortadas em pedaços de aproximadamente  $1\text{cm}^2$ , totalizando dez pedaços cada planta, e imersas em  $20\text{mL}$  de água deionizada, sendo mantidas a  $25^\circ\text{C}$  por 24 horas, quando se realizou a leitura da condutividade elétrica em  $\mu\text{S cm}^{-1}$ .

Conduziu-se em delineamento experimental inteiramente casualizado com seis repetições. As análises de variância foram realizadas aplicando-se o teste F e quando detectada significância, foi utilizado o teste de Tukey a 5% para comparação de médias.

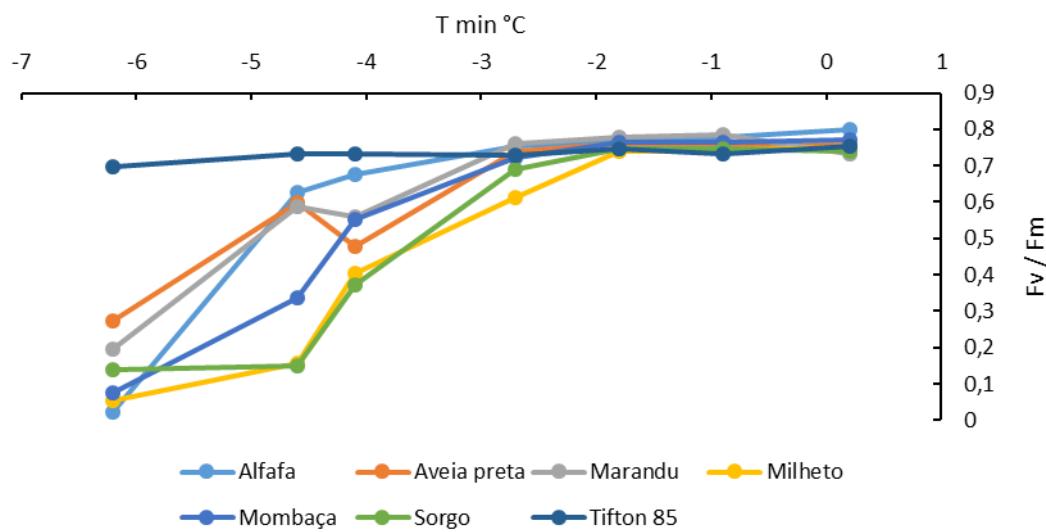
### 3.3 RESULTADOS

As curvas de temperaturas para atingir os valores mínimos de  $0,2$ ,  $-0,9$ ,  $-1,8$ ,  $-2,7$ ,  $-4,1$ ,  $-4,6$  e  $-6,2^\circ\text{C}$  são apresentadas na Figura 3.1. Os aumentos e quedas bruscas correspondem ao ligamento e desligamento da unidade de refrigeração da câmara ao longo da programação.



**Figura 3.1.** Curvas de temperaturas correspondentes aos testes realizados na câmara de crescimento.

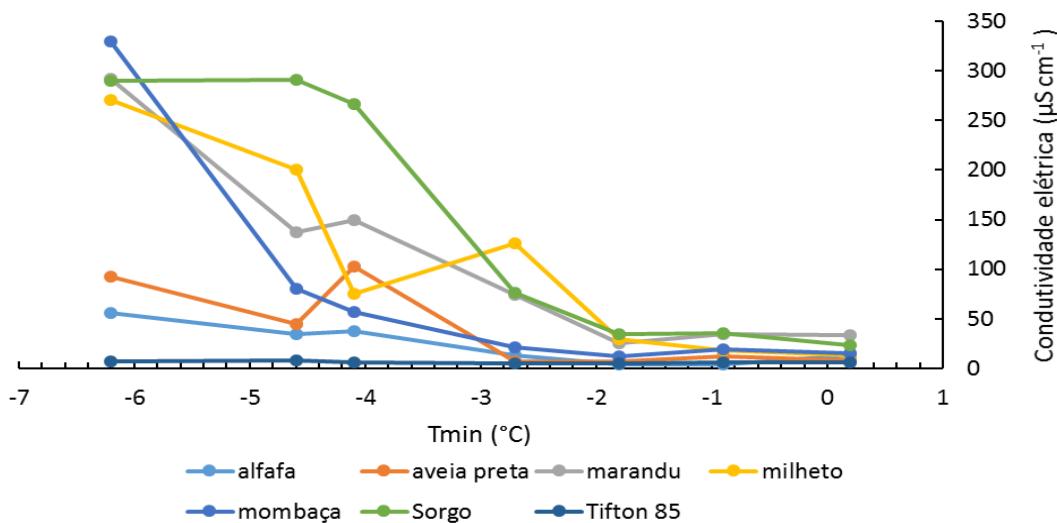
Nas Figuras 3.2 e 3.3 se pode observar os efeitos dos tratamentos com baixas temperaturas sobre os valores médios de Fv/Fm e condutividade elétrica, respectivamente. Os valores de Fv/Fm (Figura 3.2) mostram que o Milheto e o Sorgo foram os primeiros a sofrer redução, a partir da temperatura mínima de -1,8°C. O Mombaça apresentou queda linear nos valores a partir de -2,7°C. Sob -4,1° a alfafa apresentou menor queda, com exceção do Tifton 85. Aveia Preta e Marandu apresentam variabilidade sob as temperaturas de -4,1°C e -4,6°C,. A partir de -4,6°C todas apresentaram queda na razão Fv/Fm, exceto o Tifton 85 que exibiu uma ligeira redução a -6,2°C. Em geral é possível separar nas seguintes categorias: a) Milheto e Sorgo; b) Mombaça; c) Marandu e Aveia; d) alfafa e e) Tifton 85.



**Figura 3.2.** Valores médios de eficiência quântica do fotossistema II (Fv/Fm) para sete espécies forrageiras submetidas a diferentes temperaturas mínimas em ambiente controlado.

Os valores de condutividade elétrica (Figura 3.3) mostram que até -1,8°C o comportamento foi semelhante entre todas as espécies avaliadas, sem alterações em relação aos valores iniciais. A partir de -1,8°C já houve alterações nos valores para Milheto, Sorgo e Marandu. A partir de -2,7°C Aveia Preta, Alfafa e Mombaça apresentaram pequenos aumentos no valor da condutividade elétrica. Observa-se nitidamente que os tecidos de Aveia Preta e Alfafa mostraram valores mais baixos que os demais, sendo superado apenas pelo Tifton 85, que não teve alteração da condutividade elétrica. De acordo com esse método, é possível separar quatro

grupos: a) Milheto, Sorgo e Marandu; c) Mombaça; b) alfafa e Aveia Preta; d) Tifton 85.



**Figura 3.3.** Valores médios de condutividade elétrica ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) da solução de embebição de folhas de forrageiras submetidas a baixas temperaturas em ambiente controlado.

Nos resultados de medições da fluorescência (Tabela 3.1) verificou-se diferença estatística significativa entre as temperaturas para cada espécie estudada. Observou-se que os danos ao fotosistema II (PSII) começaram a partir da exposição à temperatura mínima de  $-1,8^{\circ}\text{C}$ .

O Milheto foi o primeiro a sofrer queda brusca na fluorescência a esta temperatura, embora sem diferir estatisticamente das temperaturas mais elevadas, mas a  $-4,1^{\circ}\text{C}$  tanto o Milheto como o Sorgo foram afetados. A partir de  $-2,7^{\circ}\text{C}$  todos tiveram redução significativa na fluorescência, com exceção da Alfafa, que apresentou uma pequena redução e do Tifton 85 que não sofreu alteração. Para o Marandu, embora tenha apresentado redução na relação  $\text{Fv}/\text{Fm}$  a partir de  $-2,7^{\circ}\text{C}$ , não houve diferença significativa. Alfafa, Aveia Preta e Marandu mostraram redução somente a  $-6,2^{\circ}\text{C}$ , indicando que os danos ocorreram a partir de  $-4,6^{\circ}\text{C}$ . Somente o Tifton 85 não teve sua fluorescência afetada na menor temperatura testada.

**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.

Os resultados da análise estatística de condutividade elétrica da solução de embebição das folhas submetidas às diferentes temperaturas são apresentados na Tabela 3.2. Houve diferença estatística significativa para as espécies estudadas em relação às temperaturas mínimas, com exceção da Tifton 85. Verificou-se também para todas as espécies avaliadas valores elevados de coeficiente de variação, indicando grande variabilidade nas respostas aos tratamentos.

Os menores valores iniciais de condutividade elétrica ocorreram nas espécies de cultivo de inverno (alfafa, Aveia Preta e Tifton 85). À temperatura de -2,7 °C houve um grande aumento na condutividade elétrica de Milheto, Marandu e Sorgo, embora ainda não se verificassem diferenças significativas devido à alta variabilidade. Sob a temperatura de -4,1°C os valores foram ainda maiores, com exceção do Tifton 85, que manteve valores baixos para todas as temperaturas avaliadas. Depois do Tifton 85 a alfafa apresentou os menores valores de condutividade elétrica em temperaturas inferiores a -2,7°C.

**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.

### 3.4 DISCUSSÃO

A redução nos valores de fluorescência com a diminuição da temperatura, observada neste trabalho, demonstra que a planta foi afetada pelo resfriamento, pois os fotossistemas são os primeiros a serem afetados pelo dano do frio (BERTAMINI, et al., 2007; CAVACO et al., 2003; KRATSCH; WISE, 2000). Greer (1990) afirma ainda que o fotossistema II (PSII) é a parte mais vulnerável do aparato fotossintético, com danos ao PSII sendo, frequentemente, a primeira resposta ao estresse. Dessa forma, mesmo que se observe uma redução relativamente pequena na variável do rendimento quântico máximo ( $F_v/F_m$ ), pode ocorrer a inibição do transporte de

elétrons fotossintético em algumas plantas sensíveis ao frio (HENDRICKSON et al., 2004).

Outros autores, como Bertamini et al. (2007) analisando videiras, observaram que após exposição ao frio, a eficiência fotoquímica máxima (Fv/Fm) reduziu em plantas da cultivar sensível ao frio, enquanto para outra mais tolerante não houve nenhuma modificação da fluorescência. Tal alteração é um indicativo de que uma importante parte do centro de reação do PSII foi danificada. Uma redução similar na atividade do PSII foi verificada também em plantas estressadas pelo frio por Sundar; Ramachandra-Reddy (2001) em Guaiúle, Lidon et al. (2001) em Trigo e Milho e Jatimliansky et al. (2004) em capim Guatemala.

De acordo com Bertamini et al. (2007) as mudanças na atividade do transporte de elétrons fotossintéticos podem ter sido causadas principalmente pelas mudanças ou reorganização dos componentes do tilacóide, como por exemplo a perda nos polipeptídeos das membranas.

Além disso, em plantas sensíveis às temperaturas baixas o estresse pelo frio induz uma mudança no estado da membrana, que resulta no aumento da lixiviação de eletrólitos das folhas de milho (JATIMLIANSKY et al., 2004; SZALAI et al., 1996; MARKOWSKI; SKRUDLIK, 1995). De acordo com Hasanuzzman et al. (2013), devido ao estresse por baixa temperatura os ácidos graxos se tornam insaturados e a camada de lipídeos e proteínas da membrana sofre alteração na sua fluidez e estrutura. A fase líquida é convertida a sólida, afetando o funcionamento celular e aumentando a permeabilidade da membrana e a lixiviação de íons.

Assim, pode se afirmar que o funcionamento da membrana também foi alterado pelas baixas temperaturas, observando-se um aumento na lixiviação de eletrólitos nas plantas estressadas pelo frio, indicando alterações na permeabilidade das membranas, somente para as espécies sensíveis ao frio.

Essa resposta das plantas foi verificada neste trabalho pelo teste de condutividade elétrica, que mede a lixiviação de eletrólitos na solução de embebição após o dano por resfriamento. Ficou evidente a ocorrência de maior valor para as plantas com a diminuição da temperatura, indicando que a permeabilidade da membrana foi afetada pelo tratamento de frio em plantas de milho (MARKOWSKI;

SKRUDLIK, 1995; KOŚCIELNIAK; BIESAGA-KOŚCIELNIAK, 1999; JATIMLIANSKY et al., 2004).

Um aumento similar na lixiviação de eletrólitos após o estresse por baixa temperatura, indicando o mau funcionamento das membranas, também foi observado em diferentes espécies e sob muitas condições estressantes em videira (BERTAMINI et al., 2007); em milho (KARIM et al., 1999); e em milho e capim guatemala (JATIMLIANSKY et al., 2004).

Entretanto, Jatimliansky et al. (2004) verificaram em milho que o teste de condutividade elétrica não foi um parâmetro suficientemente sensível para encontrar diferenças na susceptibilidade a injúrias entre os genótipos. Isso também foi observado neste experimento para capim Mombaça, no qual a condutividade só mostrou início de dano a partir de -4,6°C, enquanto o PSII já estava prejudicado a partir de -2,7°C. Para as demais espécies o teste mostrou ser sensível e possível de ser utilizado para indicar a tolerância a baixas temperaturas. Ainda se destaca como um método baseado em medidas objetivas, utiliza pequenas quantidades de tecido e é relativamente rápido e barato (MURRAY et al., 1989).

Em geral observou-se maior variabilidade nas medições de condutividade (Figura 3) em relação aos valores Fv/Fm (Figura 2), explicada pelo fato deste ser um método destrutivo, sujeito a variações decorrentes de ferimentos e pequenas variações no tamanho dos discos de folhas. Entretanto, os dois métodos avaliados apresentaram boa concordância, indicando sua adequação para selecionar materiais quanto à tolerância ao frio.

### **3.5 CONCLUSÃO**

Os métodos empregados revelaram-se adequados para avaliar tolerância ao frio em forrageiras. Houve concordância entre os dois métodos para todas as cultivares avaliadas, com exceção do capim Mombaça, que mostrou início de danos a partir de -2,7°C pela fluorescência da clorofila e -4,6°C pela condutividade elétrica. Para as demais, os danos iniciaram-se a partir das seguintes temperaturas: Milheto

-1,8°C, Aveia e Sorgo -2,7°C, Marandu e alfafa -4,6°C e Tifton 85 sem danos até -6,2°C.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, G. M.; VIZZOTTO, B. A pecuária de corte no Paraná – desenvolvimento, caracterização e o papel das pastagens. **Scientia Agraria Paranaensis**, Acrelândia, v. 9, n. 3, p. 05-21, 2010.
- ANNICCHIARICO, P.; COLLINS, R. P.; FORNASIER, F. RHODES, I. Variation in cold tolerance and spring growth among Italian white clover populations. **Euphytica**, Dordrecht, v. 122, n. 2.p. 407-416, 2001.
- BALL, D. M.; HOVELAND, C. S.; LACEFIELD, G. D. **Southern forages**. 2. ed. Georgia: Potash and Phosphate Institute, 1996. 264 p.
- BARRANCO, D.; RUIZ, N.; CAMPO, M.G. Frost tolerance of eight olive cultivars. **HortScience**, Alexandria, v. 40, n. 3, p. 558-560, 2005.
- BERTAMINI, M.; ZULINI, L.; MUTHUCHELIAN, K.; NEDUNCHEZHIAN, N. Low night temperature effects on photosynthetic performance on two grapevine genotypes. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 51, n. 2, p. 381-385, 2007.
- BOLHÄR-NORDENKAMPF, H.R.; ÖQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D. O.; SCURLOCK, J. M. O.; BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R.; LEEGOOD, R. C.; LONG, S. P. (Ed.). **Photosynthesis and production in a changing environment**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993. p. 193-206.
- BOTREL, M. A.; ALVIM, M. J.; FERREIRA, R. P.; XAVIER, D. F. Potencial forrageiro de gramíneas em condições de baixas temperaturas e altitude elevada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 3, p. 393-398, 2002.
- BRESOLIN, A. P. S.; CASTRO, C. M.; HERTER, F. G.; OLIVEIRA, A. C.; FELIX, F. I.; CARVALHO, F.; PEREIRA, F. B.; VIEIRA, C. L.; FERREIRA, R.; BERTOLI, V. Tolerância ao frio do amendoim forrageiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 1154-1157, 2008

CANTO, M. W.; JOBIM, C. C.; PAGLIARINI, M. S.; PANCERA JÚNIOR, E. J.; BARTH, NETO, A.; INTROVINI, E. P.; ZANFOLIN, P. R. L.; FERREIRA, C. W.; MATIVI, T. M.; CAVACO, A. M.; SILVA, A. B.; ARRABAÇA, R. C. Effects of long-term chilling on growth and photosynthesis of the C4 gramineae *Paspalum dilatatum*. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 119, n. 1, p. 87-96, 2003.

CAVIGLIONE, J. H.; KIIHL, L. R. B.; CARAMORI, P. H.; OLIVEIRA, D. **Cartas climáticas do Paraná**. Londrina: IAPAR, 2000. CD.

COSTA, C.; MEIRELLES, P. R. L.; SILVA, J. J.; FACTORI, M. A. Alternativas para contornar a estacionalidade de produção de forragens. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 15, n. 2, p.193-203, 2008.

DALMAGO, G. A.; CUNHA, G. R.; SANTI, A.; PIRES, J. L. F.; MÜLLER, A. L; BOLIS, L. M. Aclimatação ao frio e dano por geada em canola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 45, n. 9, p. 933-943, 2010.

FEROLLA, F. S.; VÁSQUES, H. M.; SILVA, J. F. C. da; VIANA, A. P.; DOMINGUES, F. N.; AGUIAR, R. S. Produção de matéria seca, composição da massa de forragem e relação lâmina foliar/caule bainha de Aveia-preta e triticale nos sistemas de corte e de pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 5, p. 1512-1517, 2007.

FLORES, R. A.; DALL'AGNOL, M.; NABINGER, C.; MONTARDO, D. P. Produção de forragem de populações de azevém anual no estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 7, p. 1168-1175, 2008.

FLORIANI, M. M. P.; STEFFENS, C. A.; CHAVES, D. M.; AMARANTE, C. V. T.; PIKART, T. G.; RIBEIRO, M. T. Relação entre concentrações foliares de carboidratos solúveis totais e tolerância ao frio em diferentes espécies de *Eucalyptus* spp. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 1, p. 165-174, 2013.

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

GUYE, M. G.; VIGH, L.; WILSON, J. M. Recovery after chilling: an assessment of chill-tolerance in *Phaseolus* spp. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 38, n. 4, p. 691-701, 1987.

HABIBI, F.; NORMAHAMADI, G. H.; ABAD, H. S.; EIVAZI, A.; MAJIDI, H. E. Effect of cold stress on cell membrane stability, chlorophyll a and b content and proline accumulation in wheat (*Triticum aestivum* L.) variety. **African Journal of Agricultural Research**, Victoria Island, v. 6, n. 27, p. 5854-5859, 2011.

HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; FUJITA, M. Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants. Rijeka: **INTECH Open Access Publisher**, 2013. Disponível em: < <http://www.intechopen.com/books/abiotic-stress-plant-responses-and-applications-in-agriculture/extreme-temperature-responses-oxidative-stress-and-antioxidant-defense-in-plants>>. Acesso em: 12 nov. 2015.

HENDRICKSON, L.; BALL, M. C.; WOOD, J. T.; CHOW, W. S.; FURBANK, R.T. Low temperature effects on photosynthesis and growth of grapevine. **Plant, Cell & Environment**, Chichester, v. 27, n. 7, p. 795-809, 2004.

JATIMLIANSKY, J. R.; GARCÍA, M. D.; MOLINA, M. C. Response to chilling of *Zea mays*, *Tripsacum dactyloides* and their hybrid. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 48, n. 4, p. 561-567, 2004.

KARIM, A.; FRACHEBOUD, Y.; STAMP, P. Photosynthetic activity of developing leaves of *Zea mays* is less affected by heat stress than that of developed leaves. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 105, n. 4, p. 685-693, 1999.

KOŚCIELNIAK, J.; BIESAGA-KOŚCIELNIAK, J. Effects of exposure to short periods of suboptimal temperature during chill (5 C) on gas exchange and chlorophyll fluorescence in maize seedlings (*Zea mays* L.). **Journal of Agronomy and Crop Science**, Madison, v. 183, n. 4, p. 231-241, 1999.

KRATSCH, H. A.; WISE, R. R. The ultrastructure of chilling stress. **Plant, Cell & Environment**, Chichester, v. 23, n. 4, p. 337-350, 2000.

LAABS, M. L. **Produção e valor nutritivo de forrageiras anuais de estação fria em diferentes épocas de semeadura**. 2011. 25 f. Trabalho (Conclusão de Curso) – Programa de Graduação em Bacharelado em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2011. Disponível em: <[http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/728/1/DV\\_COZOO\\_2011\\_2\\_15.pdf](http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/728/1/DV_COZOO_2011_2_15.pdf)>. Acesso em: 15 mar. 2016.

LIDON, F. C.; LOUREIRO, A. S.; VIEIRA, D. E.; BILHÓ, E. A.; NOBRE, P.; COSTA.R. Photoinhibition in chilling stressed wheat and maize. **Photosynthetica**, Prague, v. 39, n. 2, p. 161-166, 2001.

MARKOWSKI, A.; SKRUDLIK, G. Electrolyte Leakage, ATP Content in Leaves and Intensity of Net Photosynthesis in Maize Seedlings at Permanent or Different Daily Exposure to Low Temperatures. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, v. 175, n. 2, p. 109-117, 1995.

McCLOUD, D. E.; BULA, R. J. Climatic factors in forage production. In: HEATH, M. E.; BARNES, R. F.; METCALFE, D. S.(Ed.). **Forages: the science of grassland agriculture**. Ames: Iowa State University Press. 1985. p. 33-42.

MOSHTAGHI, E. A.; SHAHSAVAR, A. R.; TASLIMPOUR, M. R. Ionic leakage as indicators of cold hardiness in Olive (*Olea europaea* L.). **World Applied Sciences Journal**, Dubai, v. 7, n. 10, p. 1308-1310, 2009.

MURRAY, M. B.; CAPE, J.M.; FOWLER, D. Quantification of frost damage in plant tissues by rates of electrolyte leakage. **New Phytologist**, Chichester, v. 113, n. 3, p. 307-311, 1989.

PLOSCHUKA, E. L.; BADOA, L. A.; SALINAS, M.; WASSNER, D. F.; WINDAUER, L. B.; INSAUSTI, P. Photosynthesis and fluorescence responses of *Jatropha curcas* to chilling and freezing stress during early vegetative stages. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 102, p. 18–26, 2014.

RAMALHO, J. C.; QUARTIN, V. L.; CAMPOS, P. S.; CARELLI, M. L. C.; FAHL, J. I.; NUNES, M. A. Efeitos de baixas temperaturas positivas na fotossíntese e estabilidade membranar em 5 genótipos de *coffea* sp. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2000, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: Embrapa Café, 2000. p. 52-54.

SILVA, S. C.; NASCIMENTO JÚNIOR, D. Avanços na pesquisa com plantas forrageiras tropicais em pastagens: características morfofisiológicas e manejo do pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p. 121-138, 2007. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbz/v36s0/14.pdf> >. Acesso em: 15 jun. 2017.

SILVA, A. L. L.; OLIVEIRA, Y.; ALCANTARA, G. B.; SANTOS, M.; QUOIRIN, M. Tolerância ao resfriamento e congelamento de folhas de eucalipto. **Biociências**, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 86-90, 2009.

SIMIONI, C.; PAIM, N. R.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Tolerância ao frio e caracterização de híbridos entre *Leucaena leucocephala* e *L. diversifolia*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 453-458, 1999.

SUNDAR, D.; RAMACHANDRA-REDDY, A. Low night temperature-induced changes in photosynthesis and rubber accumulation in guayule (*Parthenium argentatum* Gray). **Photosynthetica**, Prague, v. 38, n. 3, p. 421-427, 2000.

SZALAI, G.; JANDA, T.; PÁLDI, E.; SZIGETI, Z. Role of light in the development of post-chilling symptoms in maize. **Journal of Plant Physiology**, Muenchen, v. 148, n. 3-4, p. 378-383, 1996.

WREGE, M. S.; STEINMETZ, S.; REISSER JUNIOR, C.; ALMEIDA, I. R. (Ed.). **Atlas climático da Região Sul do Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; Colombo: Embrapa Florestas, 2011. 336 p.

## 4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM ESPÉCIES FORRAGEIRAS SUBMETIDAS A BAIXAS TEMPERATURAS

### RESUMO

Em situações de estresse, há um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), danificando a célula e podendo causar sua morte. Com a função de proteger estruturas e o funcionamento celular dos efeitos prejudiciais das EROs, as plantas ativam um complexo sistema antioxidante. Em espécies forrageiras são escassas as informações sobre a atividade enzimática sob situações de estresse. Nesse sentido a caracterização da fisiologia dessas plantas sob diversas condições climáticas contribui para a otimização de sua produção, garantindo o forrageamento dos animais o ano inteiro. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade enzimática das forrageiras expostas às temperaturas baixas, e assim contribuir para a caracterização dessas espécies. As culturas de interesse econômico Alfafa (*Medicago sativa*), Sorgo (*Sorghum bicolor*), Aveia Preta (*Avena strigosa*), *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, Milheto (*Pennisetum glaucum*), capim Mombaça (*Panicum maximum*) e Tifton 85 (*Cynodon* spp) foram semeadas em vasos e conduzidas em casa de vegetação por um período de dois meses, e expostas a baixas temperaturas em câmara de crescimento de plantas programada para atingir as mínimas de 0,2; -0,9; -1,8; -2,7; -4,1; -4,6 e -6,2°C durante uma hora. Após os testes as folhas foram congeladas, e os extratos brutos das amostras foram submetidos às análises de ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) por espectrofotometria. Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado com seis repetições e sete tratamentos (temperaturas) para cada espécie, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Para Marandu e Tifton a atividade da SOD aumentou nas temperaturas de -2,7°C e -4,1°C, respectivamente, sugerindo que esta enzima teria um papel importante na resposta ao estresse oxidativo nestas espécies. Em alfafa não teve diferença na produção das enzimas SOD e APX, e para CAT houve diminuição da produção desta enzima com a redução da temperatura. Na Aveia e no Sorgo constatou-se a APX como a principal

protetora celular, com maior produção enzimática nas temperaturas -4,1°C e -0,9°C, respectivamente. Em Milheto houve diferença na quantidade da CAT com a diminuição da temperatura, sendo que a -2,7°C a planta teve um estímulo positivo na produção desta enzima. Verificou-se uma ação conjunta das enzimas CAT e SOD para defesa do capim Mombaça, que tolerou o estresse até a temperatura de -2,7°C.

**Palavras-chave:** Ascorbato peroxidase. Catalase. Superóxido dismutase. Dano por frio.

## ABSTRACT

### ENZYMATIC ACTIVITY IN FORAGE SPECIES SUBMITTED TO LOW TEMPERATURES

In stress situations, there is an increase in the production of reactive oxygen species (ROS), damaging the cell and possibly causing its death. With the function of protecting structures and cellular functioning from the harmful effects of ROS, plants activate a complex antioxidant system. In forage species, information on enzymatic activity under stress is scarce. Thus, the characterization of the physiology of these plants under different climatic conditions contributes to the optimization of their production, guaranteeing the foraging of the animals throughout the year. Thus, the objective of this work was to evaluate the enzymatic activity of forages exposed to low temperatures, and thus contribute to the characterization of these species. Plants of Alfalfa (*Medicago sativa*), Sorghum (*Sorghum bicolor*), Black Oat (*Avena strigosa*), *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, Millet (*Pennisetum glaucum*), Mombasa grass (*Panicum maximum*) and Tifton 85 (*Cynodon* spp) were grown in pots and conducted in a greenhouse for a period of two months. Following they were exposed to low temperatures within a plant growth chamber programmed to reach the minimum of 0.2; -0.9; -1.8; -2.7; -4.1; -4.6 and -6.2°C for one hour. After the tests, the leaves were frozen and the crude extracts of the samples were analyzed by ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) by spectrophotometry. A

completely randomized design with four replicates and seven treatments (temperatures) for each species was used, and the means were compared by the Tukey test at 5%. For Marandu and Tifton, SOD activity increased at temperatures of -2.7°C and -4.1°C, respectively, suggesting that this enzyme would play an important role in the response to oxidative stress in these species. In alfalfa, there was no difference in the production of SOD and APX enzymes, and for CAT the production of this enzyme decreased with the reduction of temperature. In Oat and Sorghum APX was the main cell protector, with higher enzymatic production at temperatures -4.1°C and -0.9°C, respectively. In Millet, there was a difference on the amount of CAT with temperature decrease, and at -2.7°C the plant had a positive stimulus in the production of this enzyme. There was a joint action of CAT and SOD enzymes for defense of the Mombasa grass, which tolerated the stress until the temperature of -2.7°C.

**Keywords:** Ascorbate peroxidase. Catalase. Superoxide dismutase. Cold damage.

## 4.1 INTRODUÇÃO

As pastagens são as principais fontes de alimentos usadas para a produção do gado de corte no Paraná, e abrangem pouco menos que 23,7% do seu território (CANTO et al., 2010; LAABS, 2011). O baixo custo representado pelas forrageiras em pastejo, em relação a outras fontes de nutrientes, justifica esta ampla utilização.

Contudo, as produtividades observadas são relativamente baixas. A utilização de forrageiras inadequadas para as condições edafo-climáticas reinantes nas diferentes regiões, o manejo inadequado, a falta de alimentos nas diferentes épocas do ano e a falta de fertilização tem levado as pastagens à degradação e limitado a produção animal.

Escolher as espécies mais adequadas para determinada região e, de preferência, que possibilitem compor um sistema de forrageamento dos animais durante o ano todo deve ser considerado de suma importância, pois é o que define

em grande parte o custo de produção pela maior ou menor necessidade de alimentar os animais com concentrado ou forragem conservada (COSTA et al., 2008).

Dessa forma, em forragicultura nem sempre se busca a maior produtividade, como nos cultivos agrícolas. Num sistema de produção de leite ou carne em pastejo interessa, sobremaneira, o forrageamento dos animais durante o ano inteiro. Assim, é importante contar com espécies de diferentes faixas de adaptação térmica e tolerância a estresses ambientais.

Entretanto, poucos são os estudos que procuram caracterizar a ecofisiologia das forrageiras, visando otimizar sua produção. De acordo com Canto et al. (2010) muitas pesquisas com pastagens devem ainda ser realizadas, de forma que o reconhecimento do papel e do potencial das pastagens é de suma importância para o desenvolvimento da pecuária de corte no Paraná.

O clima é o fator principal que determina a adaptação e o crescimento das plantas forrageiras durante todo o ano (MCLOUD; BULA, 1985). O Paraná está situado em região de transição climática (clima subtropical alterando-se para tropical), e apresenta condições de luminosidade, temperatura e precipitações pluviométricas que permitem alta resposta na produtividade de forragem. Entretanto, para algumas regiões, as condições climáticas na estação fria dificultam, sobremodo, o desempenho dos animais, já que as plantas forrageiras paralisam o crescimento principalmente pelas baixas temperaturas e menor incidência de radiação solar. A essas situações difíceis se somam as geadas no outono-inverno. As geadas crestam a forragem disponível e em consequência verificam-se perda de peso nos animais (PEDRO JÚNIOR et al., 1990; CANTO et al., 2010).

Destaca-se que o conceito de geada para a agricultura está ligado aos danos que ocorrem a cada espécie. Assim, embora sob o ponto de vista físico possa haver formação de geadas, a temperatura letal para as plantas expostas é que vai determinar se houve a geada agronômica (CARAMORI; MANETTI FILHO, 1993).

As espécies variam em relação a tolerância ou não às geadas. O trevo branco, a leguminosa forrageira de produção invernal mais usada para pastejo direto, em associação com gramíneas, não tolera temperatura elevada, sendo,

entretanto, razoavelmente tolerante às geadas (BALL et al., 1996). Ferolla et al. (2007) e Flores et al. (2008) destacam que a utilização de forrageiras de estação fria como o Azevém, Aveia e o Centeio tem sido uma ótima alternativa para os produtores de leite por apresentarem uma boa qualidade e um bom potencial de produção de matéria seca, além de amenizar os períodos de estiagem forrageira que ocorrem no outono e inverno, sendo importantes para a alimentação de ruminantes durante esse período nas regiões de clima temperado do mundo inteiro. Botrel et al. (2002) avaliaram 16 espécies de gramíneas forrageiras no Vale do Paraíba (SP) e destacaram *Hemarthria altissima* e *Setaria anceps* como tolerantes à geada.

Assim, torna-se necessário o conhecimento de espécies forrageiras que apresentem tolerância às geadas e que não tenham seu potencial produtivo comprometido por esse fenômeno natural.

A avaliação da sensibilidade das plantas através da sua exposição às temperaturas inferiores a 2°C, em ambiente controlado, pode ser um procedimento bastante eficiente na predição de tolerância em função de assegurar uma homogeneidade dos níveis de frio.

Como forma de avaliar os danos causados às plantas pelo estresse das temperaturas baixas, na maioria dos trabalhos comumente se realizam avaliações visuais, morfológicas, análises fisiológicas de crescimento, trocas gasosas e fluorescência, como Siebeneichler et al. (1998) em feijão, Simioni et al. (1999) em Leucaena, Ramalho et al. (2000) em café, Bresolin et al. (2008) em amendoim forrageiro e Dalmago et al. (2010) em canola.

Além destas, análises bioquímicas também podem apresentar bons resultados, como observado por Cerqueira (2011) em videira e Floriani et al. (2011) em eucalipto, que avaliaram a atividade das enzimas ascorbato peroxidase e superóxido dismutase.

A ação da enzima peroxidase em plantas constitui proteção oxidativa. A atividade desta enzima pode aumentar em plantas submetidas a estresse, e às vezes, é a primeira enzima a ter atividade alterada (SIEGEL, 1993).

Isso porque, em resposta ao estresse as plantas podem acumular espécies reativas de oxigênio (EROS) que afetam o metabolismo celular através da oxidação de membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucléicos, além de inibir processos fisiológicos como fotossíntese e respiração (SCANDALIOS, 2005; SOARES; MACHADO, 2007). Enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), além de compostos não-enzimáticos, compõem sistemas antioxidantes efetivos na proteção contra o estresse oxidativo (PERL-TREVES; PERL, 2002).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a tolerância de espécies forrageiras a temperaturas baixas pela atividade enzimática, de forma a identificar por meio de análises bioquímicas o ponto inicial de danos por baixas temperaturas, e assim contribuir para a caracterização dessas espécies.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

As espécies de forrageiras de interesse econômico *Panicum maximum* (cv Mombaça); *Brachiaria brizantha* (cv Marandu) *Pennisetum glaucum* (Milheto), *Sorghum bicolor* (Sorgo), *Avena strigosa* (Aveia Preta) e *Medicago sativa* (Alfafa) foram semeadas em vasos, exceto *Cynodon* spp (cv Tifton 85) que foi plantada por mudas de aproximadamente 20 cm por ser material estéril. As plantas foram conduzidas em casa de vegetação por um período de dois meses, e então submetidas às baixas temperaturas de 0,2; -0,9; -1,8; -2,7; -4,1; -4,6 e -6,2°C em câmara de crescimento de plantas, com condições de iluminação e temperatura controladas, localizada no Laboratório de Simulação de Ambientes, do setor de Ecofisiologia, do Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR.

O trabalho foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com seis repetições. Após o estresse por baixas temperaturas, foram retiradas amostras de folhas, as quais foram armazenadas em sacos de papel em freezer à temperatura de -80°C até o momento da preparação do extrato enzimático para as análises bioquímicas.

Na obtenção dos extratos brutos das amostras pesou-se 0,250 g de tecido foliar, o qual foi 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 na aceleração de 785,4 rad s<sup>-1</sup>, e o sobrenadante foi transferido para microtubos tipo eppendorfs de 2 mL, mantidos em freezer a – 14°C até o momento das análises.

Os extratos brutos foram submetidos à quantificação de proteína total, realizada pelo método Bradford (1976).

Foram realizadas as seguintes análises:

#### **4.2.1 Atividade da catalase (CAT)**

A atividade da catalase foi determinada através do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> monitorado por espectrofotometria a 240 nm, considerando o coeficiente de extinção molar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 36,0 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (PEIXOTO et al., 1999). A solução de reação consiste em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 mM. O ensaio iniciou-se com a adição de 200 µL do extrato enzimático diluído, em cubeta de quartzo de 3 mL. Realizando-se a leitura em 240 nm imediatamente após a adição do extrato, a cada 30 segundos por 4 minutos de reação. A diferença na absorbância ( $\Delta A_{240}$ ) foi multiplicada pelo coeficiente de extinção molar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a atividade da enzima expressa em milimol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido por minuto por miligrama de proteína (mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>).

#### **4.2.2 Atividade da ascorbato peroxidase (APX)**

A enzima ascorbato peroxidase catalisa a redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O através da oxidação do ascorbato. A atividade de APX foi determinada seguindo metodologia descrita por (PEIXOTO et al., 1999), com algumas modificações. A solução de reação consiste em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM, ascorbato 0,5 mM e extrato enzimático. O ensaio iniciou-se com a adição de 200 µL do extrato enzimático diluído, em cubeta de quartzo de 3 mL. Realizando-se a leitura em 290 nm imediatamente após a adição do extrato, a cada 15 segundos por 2 minutos de reação. A atividade da enzima foi calculada usando coeficiente de extinção molar de 2,8 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. Os valores expressos em unidades de atividade por minuto por

miligrama de matéria fresca (MF) ( $UA \cdot min^{-1} \cdot mg \text{ MF}^{-1}$ ), sendo uma unidade de atividade representada pela quantidade de enzima que catalisa a oxidação de um micromol de ascorbato.

#### **4.2.3 Atividade da superóxido dismutase (SOD)**

A atividade de superóxido dismutase foi medida através da habilidade da enzima em inibir a redução fotoquímica do NBT (Nitroblue tetrazolium), que leva à formação de um precipitado de cor azul denominado formazana. Em tubos de ensaio cobertos com papel alumínio foram adicionados 2,8ml da solução de reação (composta por tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM e metionina 13 mM, NBT 75  $\mu M$  e riboflavina 2  $\mu M$ ), e 200  $\mu L$  do extrato enzimático ou tampão de extração (para os brancos) (DEL LONGO et al., 1993). Os tubos foram descobertos (exceto o branco do escuro) e transferidos a uma câmara com iluminação de lâmpadas fluorescentes de 15W a 25°C. Após 5 min de iluminação, a reação foi finalizada ao apagar as lâmpadas e as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 560 nm (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977).

O branco do claro, que consiste em tampão de ensaio sem o extrato enzimático submetido à iluminação, indica 100% da formação da formazana, ou seja, a completa fotorredução do NBT pelo superóxido. Os valores foram expressos em unidade de atividade por minuto por miligrama de proteína ( $UA \cdot min^{-1} \cdot mg \text{ proteína}^{-1}$ ), sendo que uma unidade de atividade corresponde a 50% da inibição da redução do NBT.

As análises foram realizadas em duplicata e quando necessário em triplicata.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5%, separadamente para cada espécie.

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 4.1 a 4.4. As respostas das espécies avaliadas foram distintas e serão apresentadas e discutidas individualmente.

**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	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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>) 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.min<sup>-1</sup>.mg MF<sup>-1</sup>) 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<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>) 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

#### 4.3.1 Alfafa

Na alfafa houve aumento no teor de proteína com a diminuição da temperatura (Tabela 4.1), mostrando ser esse um mecanismo de tolerância ao frio para esta espécie (GUY, 1990), pois ao aumentar o teor de proteína das células, o potencial osmótico do citoplasma aumenta, diminuindo a temperatura de congelamento e protegendo a mesma (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Pode-se observar que para a atividade da catalase houve diferença estatística significativa entre as temperaturas testadas, apresentando uma diminuição da atividade enzimática com a baixa da temperatura, indicando que a planta sofreu um estresse (Tabela 4.2). De acordo com Dat et al. (2000) apesar da catalase estar envolvida na eliminação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seu acúmulo é contínuo, e assim a quantidade da enzima pode ser rapidamente diminuída em qualquer condição de estresse.

Resultados diferentes foram observados por Gerloff et al. (1967), que obtiveram aumento na atividade da catalase das plantas de alfafa submetidas às baixas temperaturas.

Para ascorbato peroxidase houve um aumento da atividade enzimática com a diminuição da temperatura (Tabela 4.3). Esse aumento evita que o  $H_2O_2$  se acumule causando danos celulares, sugerindo que esta enzima teria um importante papel na resposta ao estresse oxidativo resultante da diminuição da temperatura.

Não foram observadas diferenças significativas para a atividade da SOD (Tabela 4.4), indicando que a atividade desta enzima não foi inibida pela baixa temperatura (BOWLER et al, 1992).

Em estudos com Alfafa, Krasnuk et al. (1976) observaram que sob temperaturas baixas há aumento na atividade de enzimas, paralelamente ao aumento no conteúdo de proteína solúvel, sugerindo que o aumento na atividade pode ser resultado do aumento na quantidade da enzima. Guy (1990) afirma que essa reação pode ser parte do ajuste do metabolismo para as restrições cinéticas impostas pela baixa temperatura.

Assim, o ponto inicial de danos verificado em Alfafa foi a partir da temperatura  $-4,6^{\circ}C$  quando as plantas começaram a ser danificadas pela exposição ao frio.

#### **4.3.2 Aveia**

A Aveia não apresentou diferenças estatísticas significativas em relação ao teor de proteína solúvel, atividade da catalase e da superóxido dismutase (Tabelas 4.1, 4.2 e 4.4).

Observou-se que a enzima que atuou como mecanismo de proteção contra os danos causados pelo frio foi a ascorbato peroxidase (Tabela 4.3), porém não houve mais produção enzimática após a temperatura de  $-4,1^{\circ}C$ , provavelmente pela ruptura das membranas celulares ou devido à morte da planta. Esses resultados concordam com MacRae; Ferguson (1985) que observaram a via do ascorbato

peroxidase como um sistema enzimático alternativo para prevenir o acúmulo do  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Assim, na Aveia o ponto inicial dos danos foi na temperatura de  $-4,1^\circ\text{C}$ , a partir da qual as plantas começaram a apresentar danos nas células.

#### **4.3.3 Marandu**

A cultivar Marandu de *Brachiaria brizantha* não apresentou diferença no teor de proteínas solúveis com a diminuição da temperatura (Tabela 4.3), exibindo uma pequena alteração nos níveis de atividade da catalase a  $-4,1^\circ\text{C}$ , a qual demonstrou ser muito baixa, indicando que nesta espécie esta enzima não promoveu proteção contra o estresse do frio.

A enzima ascorbato peroxidase foi produzida a partir de  $0,2^\circ\text{C}$ , tendo um decréscimo nas temperaturas inferiores, indicando uma possível alteração da membrana celular da planta por danos decorrentes do congelamento dos líquidos presentes nos espaços intercelulares, consequentemente levando a ruptura de membranas por compressão, e assim inibindo a produção da enzima (TAIZ; ZEIGER, 2006). As plantas de Marandu sofreram um estresse maior na temperatura  $-2,7^\circ\text{C}$ , proporcionando um aumento significativo da atividade SOD, sendo reduzida na temperatura  $-4,1^\circ\text{C}$ .

Portanto, observou-se que para Marandu o ponto inicial dos danos foi a partir de  $-2,7^\circ\text{C}$ , sendo que nessa temperatura as plantas já estão apresentando os sinais do estresse oxidativo causado pela baixa temperatura.

#### **4.3.4 Milheto**

Em Milheto pode-se observar que não houve diferença significativa nos valores do teor de proteína solúveis (Taleva 4.1) e na atividade da enzima superóxido dismutase para as temperaturas testadas (Tabela 4.4).

Em relação à catalase verifica-se que houve um aumento na atividade da enzima na temperatura de -2,7°C, apresentando então uma queda contínua com a diminuição da temperatura e aumento do estresse (Tabela 4.2). Com relação à enzima ascorbato peroxidase (Tabela 4.4), verificou-se diminuição de sua atividade a partir de -0,9°C, não atuando assim na eliminação dos radicais livres, principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (GUY, 1990).

De acordo com Omran (1980) uma queda na produção da catalase, com a atividade da ascorbato peroxidase não modificada pode levar a um aumento no acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, já que não houve aumento na atividade da ascorbato peroxidase para compensar a lenta remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela catalase. Este autor também observou esse fenômeno em plântulas de abóbora, expostas ao estresse por frio.

Dessa forma, em Milheto o ponto inicial de danos verificado foi a partir da temperatura -2,7°C quando as plantas começaram a ser danificadas pela exposição ao frio.

#### **4.3.5 Mombaça**

O capim Mombaça apresentou aumento no teor de proteína com a diminuição da temperatura (Tabela 4.1). Assim, para esta espécie pode-se afirmar que esse é um dos mecanismos de tolerância ao frio, pois com o aumento do teor de proteínas ocorre também aumento no potencial osmótico da célula e diminuição do ponto de congelamento (GUY, 1990).

A atividade da enzima catalase não apresentou diferença estatística significativa entre as temperaturas, mostrando que essa enzima não tem uma grande atuação na prevenção do estresse oxidativo causado pelo frio em plantas de capim Mombaça (Tabela 4.2).

Já as atividades da ascorbato peroxidase (Tabela 4.3) e da superóxido dismutase (Tabela 4.4) foram estimuladas nas condições de estresse até a temperatura de -1,8°C, indicando uma ação de associação destas enzimas para defesa da planta. Sob a temperatura de -4,1°C houve diminuição da atividade.

A superóxido dismutase (SOD) é responsável por catalisar a dismutação do  $O_2^-$  a oxigênio com a formação de  $H_2O_2$ , sendo que o aumento na atividade desta enzima está geralmente relacionada com elevados níveis de radicais livres (BLOKHINA et al., 2003, GRATÃO et al., 2005). Para a SOD houve uma alta produção de enzima na temperatura  $-1,8^\circ C$  (Tabela 4.4), apontando que esta enzima foi eficaz para proteção da planta contra o acúmulo de EROS a baixas temperaturas. Tal incremento é apoiado por Asada (1997), que verificou aumento na produção de EROS quando a planta era submetida a estresse por baixa temperatura, confirmando os dados obtidos.

Assim, verificou-se que o ponto inicial dos danos nas plantas de capim Mombaça ocorreu na temperatura de  $-2,7^\circ C$ .

#### **4.3.6 Sorgo**

Observa-se que para o Sorgo houve diferença estatística significativa para todos os parâmetros avaliados.

No teor de proteínas solúveis destacam-se os maiores valores para a temperatura de  $-2,7^\circ C$ , diminuindo sua produção a partir deste ponto (Tabela 4.1). As enzimas catalase (Tsbrls 4.2) e ascorbato peroxidase (Tabela 4.3) tiveram diminuição na sua atividade com a queda da temperatura, indicando que elas não atuam protegendo o Sorgo contra o estresse oxidativo causado pelas baixas temperaturas, ocorrendo, portanto, o acúmulo de EROS.

Notou-se um aumento da atividade da SOD na temperatura  $-1,8^\circ C$  (Tabela 4.4), sendo que após essa temperatura a planta provavelmente sofreu ruptura da membrana celular pelo congelamento dos líquidos presentes nos espaços intercelulares, e assim houve inibição na produção das enzimas (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Dessa forma, para o Sorgo o ponto inicial de danos foi a partir da temperatura  $-1,8^\circ C$ , quando as plantas começaram a ser danificadas pela exposição ao frio.

#### **4.3.7 Tifton 85**

As plantas de Tifton 85 apresentaram diferenças estatísticas significativas para todos os parâmetros avaliados.

O teor de proteína foi maior a -6,2°C (Tabela 4.1), mostrando que esta espécie consegue tolerar temperaturas baixas sem afetar o funcionamento normal da célula, já que somente uma célula sem danos seria capaz de produzir proteínas (TAIZ; ZEIGER, 2006).

As atividades das enzimas catalase (Tabela 4.2) e ascorbato peroxidase (Tabela 4.3) foram maiores na temperatura 0,2°C, sendo aos poucos inibidas com o aumento do estresse pelo frio. A redução na atividade da catalase causada pelo efeito da baixa temperatura também foi observada por vários autores em diferentes espécies, conforme relataram (FEIERABEND et al., 1992; ZHOU et al., 2007; BAFEEL; IBRAHIM, 2008) em pepino, alfafa, tomate, maracujá, centeio e ervilha, Nir et al. (1986) em videira e (FEIERABEND et al., (1992) e LEIPNER (1998) em milho. Já a atividade da superóxido dismutase aumentou na temperatura -4,1°C, sugerindo que esta enzima teria um papel importante na resposta ao estresse oxidativo nesta espécie.

Assim, o ponto inicial de danos para Tifton 85 foi na temperatura de -6,2°C, sendo que nessa condição as células ainda estavam apresentando funcionamento normal, conseguindo eliminar as EROS.

### **4.4 CONCLUSÕES**

A metodologia utilizada mostrou-se adequada para avaliações quantitativas de tolerância a baixas temperaturas em forrageiras. O estresse por baixas temperaturas tem um ponto inicial diferente para cada espécie, sendo que se observa um estímulo distinto na produção de enzimas antioxidantes.

O ponto inicial de danos verificado por forrageira foi o seguinte: alfafa -4,6°C; Aveia -4,1°C; Marandu, Milheto e capim Mombaça -2,7°C; Sorgo -1,8°C e em Tifton 85, -6,2°C.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, G. M.; VIZZOTTO, B. A pecuária de corte no Paraná – desenvolvimento, caracterização e o papel das pastagens. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 9, n. 3, p. 05-21, 2010.
- ANNICCHIARICO, P; COLLINS, R. P.; FORNASIER, F.; RHODES, I. Variation in cold tolerance and spring growth among Italian white clover populations. **Euphytica**, Dordrecht, v. 122, p. 407-416, 2001.
- ASADA, K. The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging in plants. In: SCANDALIOS, J. G. (Ed.). **Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defences**. New York: Cold Spring Harbor, 1997. p. 715-35.
- BAFEEL, S. O.; IBRAHIM, M. M. Antioxidants and Accumulation of  $\alpha$ -tocopherol Induce chilling tolerance in *Medicago sativa*. **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, v. 10, n. 6, p. 593-598, 2008.
- BALL, D. M.; HOVELAND, C. S.; LACEFIELD, G. D. **Southern forages**. 2. ed. Georgia: Potash and Phosphate Institute, 1996. 264 p.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, London, v. 91, p. 179-194, 2003
- BOTREL, M.A.; ALVIM, M.J.; FERREIRA, R.P.; XAVIER, D.F. Potencial forrageiro de gramíneas em condições de baixas temperaturas e altitude elevada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 3, p. 393-398, 2002.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- BRESOLIN, A. P. S.; CASTRO, C. M.; HERTER, F. G.; OLIVEIRA, A. C.de; CARVALHO, F. I. F.de; PEREIRA, F. B.; VIEIRA, C. L.; BERTOLI, R.F. Tolerância ao frio do amendoim forrageiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 1154-1157, 2008.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 83-116, 1992.

CANTO, M. W.; JOBIM, C. C.; PAGLIARINI, M. S.; PANCERA JR, E. J.; BARTH, NETO, A.; INTROVINI, E. P.; ZANFOLIN, P. R. L.; FERREIRA, C. W.; MATIVI, T. M.; CARAMORI, P. H.; MANETTI FILHO, J. **Proteção dos cafeeiros contra geadas**. Londrina: IAPAR, 1993. 28 p. IAPAR, Circular Técnica, 79.

CERQUEIRA, R. C. **Influência do frio e do défice hídrico nas características fisiológicas e bioquímicas em videiras (*vitis vinifera* L.) cv. thompson seedless**. 2011. 122 f. Tese. (Doutorado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

COSTA, C.; MEIRELLES, P. R. L.; SILVA, J. J. Alternativas para contornar a estacionalidade de produção de forragens. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 15, n. 2, p. 193-203, 2008.

DALMAGO, G. A.; CUNHA, G. R. da; SANTI, A.; PIRES, J.L.F.; MÜLLER, A. L.; BOLIS, L. M. Aclimatação ao frio e dano por geada em canola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 45, n. 9, p. 933-943, set. 2010.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVA, E.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; BREUSEGEM, F. V. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Science**, Basel, v. 57, p. 779–795, 2000.

DEL LONGO, O. T.; GONZÁLEZ, C. A.; PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. S. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 34, p. 1023-1028, 1993.

FEIERABEND, J.; SCHAAAN, C.; HERTWIG, B. Photoinactivation of catalase occurs under both high and low temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, p. 1554-1561, 1992.

FEROLLA, F. S.; VÁSQUEZ, H. M.; SILVA, J. F. C. Produção de matéria seca, composição da massa de forragem e relação lâmina foliar/caule bainha de Aveia-preta e triticale nos sistemas de corte e de pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 5, p. 1512-1517, 2007.

FLORES, R. A.; DALL`AGNOL, M.; NABINGER, C.; MONTARDO, D. P. Produção de forragem de populações de azevém anual no estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 7, p. 1168-1175, 2008.

FLORIANI, M. M. P.; STEFFENS, C. A.; CHAVES, D. M. Rustificação de plantas de *eucalyptus dunnii* maiden e a relação entre as concentrações de carboidratos solúveis totais e de prolina foliar e a tolerância ao frio. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 21-29, 2011.

- GERLOFF, E. D.; STAHHMANN, M. A.; SMITH, D. Soluble proteins in alfalfa roots as related to cold hardiness. **Plant Physiology**, Rockville, v. 42, n. 1, p. 895-899, 1967.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K.; Superoxido dismutases. I: occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, p. 309-314, 1977.
- GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, J. L.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Sidney, v. 32, p. 481-494, 2005.
- GUY, C. L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 187-223, 1990.
- KRASNUK, M.; JUNG, G. A.; WITHAM, F. H. Electrophoretic studies of several dehydrogenases in relation to the cold tolerance of alfalfa. **Cryobiology**, Commerce Way, v. 13, p. 375-393, 1976.
- LAABS M. L. **Produção e valor nutritivo de forrageiras anuais de estação fria em diferentes épocas de semeadura**. 2011. 25 f. Trabalho (Conclusão de Curso) – Programa de graduação em Bacharelado em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2011. Disponível em: [http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/728/1/DV\\_COZOO\\_2011\\_2\\_15.pdf](http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/728/1/DV_COZOO_2011_2_15.pdf). Acesso em: 15 jul. 2016.
- LEIPNER, J. **Chilling-induced photooxidative stress and Chilling-induced photooxidative stress and (Zea mays L.) leaves**. 1998. 115 f. Thesis (Doctor in Natural Sciences) - Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich, 1998.
- MACRAE, E. A.; FERGUSON, I. B. Changes in catalase activity and hydrogen peroxide concentration in plants in response to low temperature. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 65, p. 51-56, 1985.
- MC CLOUD, D. E.; BULA, R. J. Climatic factors in forage production. In: HEATH, M. E.; BARNES, R. F.; METCALFE, D. S. **Forages: the science of grassland agriculture**. Ames: Iowa State University Press, 1985. p. 33-42.
- NIR, G; SHULMAN, Y; FANBERSTEIN, L. LAVEE, S. Changes in the activity of catalase in relation to the dormancy of grape buds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 81, p. 1140-1142, 1986.
- OMRAN, R. G. Peroxide Levels and the Activities of Catalase, Peroxidase, and Indoleacetic Acid Oxidase during and after Chilling Cucumber Seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 65, p. 407-408, 1980.
- PEDRO JÚNIOR, M. J.; ALCÂNTARA, P. B.; ROCHA, G. L.; ALFONSI, R. R.; DONZELI, P. L. **Aptidão climática para plantas forrageiras no Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agronômico, 1990. 13 p. Boletim Técnico, 139.

PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, DF, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999

PERL-TREVES, R.; PERL, A. Oxidative stress: an introduction. In: VAN MONTAGU, M.; INZE, D. (Eds.). **Oxidative stress in plants**. New York: Taylor and Francis Books, 2002. p. 1-32.

RAMALHO, J. C.; QUARTIN, V. L.; CAMPOS, P. S.; CARELLI, M. L.; FAHL, J.I. ; NUNES, M. A. Efeitos de baixas temperaturas positivas na fotossíntese e estabilidade membranar em 5 genótipos de *coffea* sp. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2000, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: SPBC, 2000. p. 52-54.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SIEBENEICHLER, S. C.; SANT'ANNA, R.; MARTINEZ, C. A.; MOSQUIM, P. R.; CAMBRAIA, J. Alterações na fotossíntese, condutância estomática e eficiência fotoquímica induzidas por baixa temperatura em feijoeiros. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 10, n. 1, p. 37-44, 1998.

SIEGEL, B. Z. Plant peroxidases – an organism perspective. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 12, p. 303-312, 1993.

SIMIONI, C.; PAIM, N. R.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Tolerância ao frio e caracterização de híbridos entre *Leucaena leucocephala* e *L. diversifolia*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 453-458, 1999.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. California: Artimed, 2006. 722 p.

ZHOU, Y. et al. Chill-induced decrease in capacity of RuBP carboxylation and associated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in cucumber leaves are alleviated by grafting onto figleaf gourd. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, p. 839-848, 2007.

## 5 ANÁLISE COMPARATIVA DA ANATOMIA FOLIAR DE FORRAGEIRAS SUBMETIDAS A BAIXAS TEMPERATURAS

### RESUMO

As geadas causam danos frequentes às pastagens e limitam o forrageamento contínuo em condições de campo em muitas regiões. Há necessidade de avaliar métodos e critérios quantitativos de danos por baixas temperaturas em espécies forrageiras, a fim de detectar as temperaturas críticas que levam à morte das plantas. Cortes histológicos de tecidos de plantas após submissão ao frio podem fornecer informações importantes para confirmar as temperaturas em que se iniciam danos nos tecidos. Neste trabalho realizou-se um estudo da anatomia foliar pós teste de frio, em plantas forrageiras de Sorgo, Milheto, alfafa, Marandu, Aveia, capim Mombaça e Tifton 85. Os resultados obtidos indicaram que há alteração nas estruturas a partir do início dos danos por frio, fornecendo importantes subsídios para identificar a tolerância das espécies forrageiras.

**Palavras Chave:** Cortes histológicos. Tecidos foliares. Congelamento. Danos por frio. Pastagem.

### ABSTRACT

### COMPARATIVE ANALYSIS OF FOLIAR ANATOMY OF FORAGES SUBMITTED TO LOW TEMPERATURE

Frosts cause frequent damage to pastures and limit continuous foraging under field conditions in many regions. There is a need to evaluate methods and quantitative criteria for low temperature damage in forage species in order to detect the critical temperatures that lead to the death of the plants. Histological sections of plant tissues after cold submission can provide important information to confirm the temperatures at which tissue death begins. In this work, a leaf anatomy study was

performed after cold test in forage plants of Sorghum, Millet, Alfalfa, Marandu, Oat, Mombasa grass and Tifton 85. The results indicated that there is alteration in the structures from the beginning of the cold damages, providing important subsidies to identify the tolerance of the forage species.

**KeyWords:** Histological sections. Leaf tissues. Freezing. Cold damage. Pasture.

## 5.1 INTRODUÇÃO

A temperatura é um fator condicionante para a ocorrência e/ou sobrevivência das diferentes espécies em cada região (ALCÂNTARA, 1993). Sob o ponto de vista genético, existem grandes diferenças na suscetibilidade ao frio. Espécies que não são adaptadas a climas frios não possuem estratégias de aclimatação, tornando-se muito vulneráveis. Por outro lado, espécies cultivadas em ambientes de inverno severo desenvolveram mecanismos de adaptação e sobrevivência e se tornaram mais tolerantes ao frio.

Plantas com capacidade de aclimatação ao frio desenvolvem mecanismos de aumento da tolerância e de recuperação após o dano, mesmo com morte parcial dos tecidos (LIVINGSTON III, 2005, 2007; GOFFINET, 2004). Os danos podem ocorrer de forma irregular e em diferentes intensidades nos tecidos da planta, como demonstraram Livingston III et al. (2005) em meristemas apicais de Aveia, que são mais tolerantes que outros tecidos da parte aérea, devido à descontinuidade dos pontos extremos de crescimento.

Dessa forma o entendimento de estruturas foliares submetidas a baixas temperaturas pode contribuir em processos de seleção de espécies e manejo para suportar ambientes térmicos mais extremos. A histologia possibilita visualizar os danos provocados pelo frio nas estruturas morfológicas e anatômicas da planta. Esse conhecimento é fundamental, tanto para determinar de forma inequívoca quais estruturas foram afetadas e os mecanismos de morte, como também definir estratégias de melhoramento visando aumentar a tolerância ao frio em espécies tolerantes (LIVINGSTON III, 2007).

O objetivo do presente estudo foi analisar alterações morfológicas e anatômicas que possam ser observadas nas folhas de forrageiras submetidas a temperaturas baixas em ambiente controlado.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na fazenda experimental do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), em Londrina, PR., conforme descrito no capítulo 3 desta tese. As forrageiras Mombaça (*Panicum maximum*); Marandu (*Brachiaria brizantha*), Milheto (*Pennisetum glaucum*), Sorgo (*Sorghum bicolor*), Aveia Preta (*Avena strigosa*) e alfafa (*Medicago sativa*) foram semeadas em vasos de 1000 mL, com exceção do Tifton 85 (*Cynodon* spp), que foi propagado com ramos de aproximadamente 20cm, por se tratar de material estéril e de propagação vegetativa. Os vasos foram preenchidos com uma mistura uma parte de esterco de curral curtido e duas partes de solo. A essa mistura foram acrescentados 1 kg por metro cúbico da formulação NPK 4-30-10. As plantas foram irrigadas diariamente e conduzidas em casa de vegetação por um período de dois meses, até atingirem porte ideal para o trabalho. A seguir, as plantas foram transferidas para uma câmara de crescimento de plantas com condições de temperatura e luminosidade controladas, onde foram submetidas a temperaturas mínimas de 0,2, -0,9, -1,8, -2,7, -4,1, -4,6 e -6,2°C, permanecendo no nível crítico por uma hora e retornando à temperatura ambiente. Após a realização dos tratamentos as plantas foram aclimatadas e foram retiradas amostras de tecido foliar, compostos por secções de aproximadamente 10 mm. O material vegetal foi fixado em FAA 50% (formol, ácido acético e água) (JOHANSEN, 1940). Amostras foliares também foram desidratadas em série etílica, incluídas em hidroxi-etyl-metacrilato (ref. Comercial Leica Historesin) e os blocos obtidos foram seccionados a 8-10 micrômetros de espessura em micrótomo rotativo. O material foi corado com azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato e ácido cítrico pH 4,5 (SAKAI, 1973) e as lâminas montadas em resina sintética “Entellan”. A biometria foi realizada para espessura da epiderme adaxial e abaxial, parênquima paliçádico e lacunoso e espessura total da folha utilizando o software Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>). Os dados obtidos foram

submetidos a análise de variância e comparação de médias por meio do teste de Tukey, utilizando o software Sisvar.

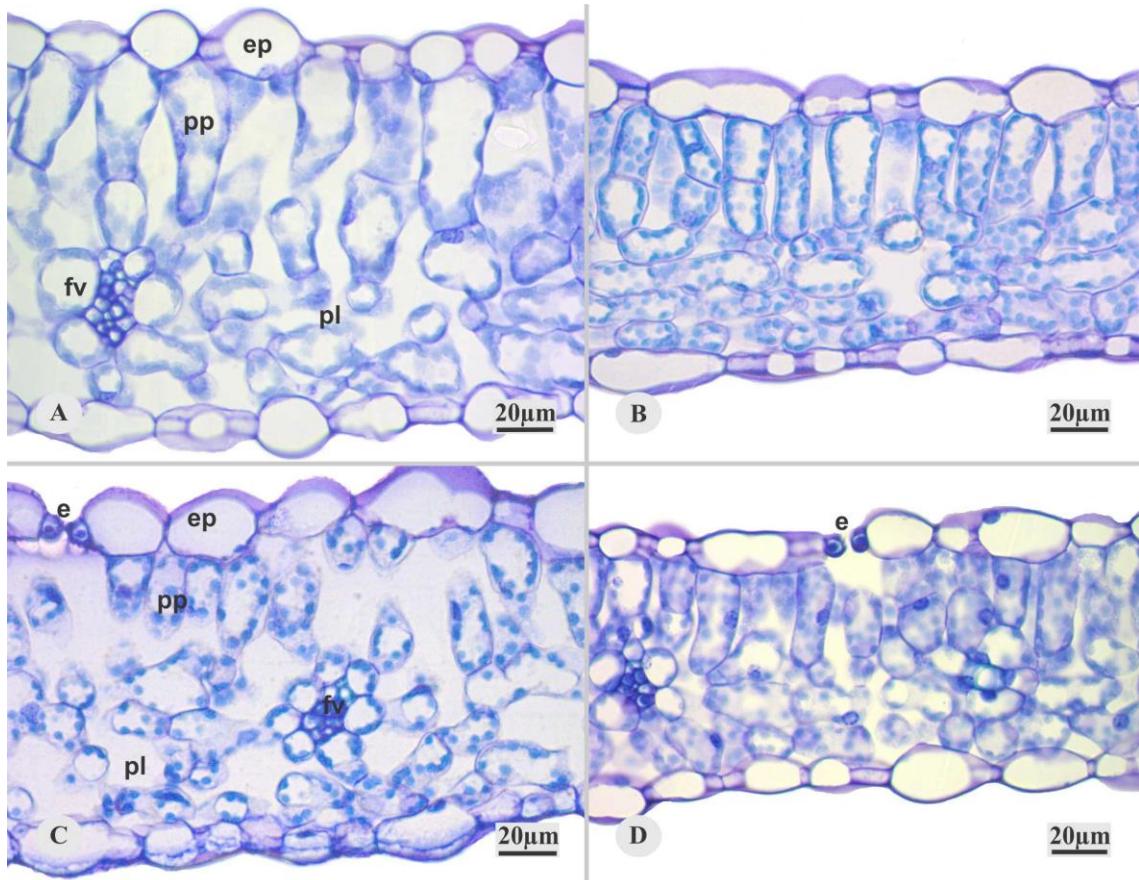
### 5.3 RESULTADOS

De acordo com os dados obtidos, quanto menor a temperatura, pode ser observado estatisticamente que as espessuras dos tecidos analisados tendem a diminuir e por vezes estes são danificados pelo estresse intenso (Tabelas 5.1 a 5.7, Figuras 5.1 a 5.3).

Para Alfafa houve redução na espessura das estruturas analisadas (epiderme adaxial e abaxial, parênquima paliçádico e lacunoso e espessura total da folha) em quase todos os tratamentos, com exceção do tratamento -4,6°C, em que ocorreu um aumento repentino significativo na espessura do parênquima paliçádico, e também da epiderme adaxial (Tabela 5.1, Figura 5.1).

**Tabela 5.1.** Espessura média para epiderme adaxial e abaxial, parênquima lacunoso e paliçádico e espessura total das folhas de Alfafa submetidas às temperaturas mínimas de 0,2; -4,1; -4,6 e -6,2 °C durante uma hora.

Temperatura (°C)	Epiderme Adaxial (μm)	Epiderme Abaxial (μm)	Parênquima Lacunoso (μm)	Parênquima Paliçádico (μm)	Espessura Total (μm)
0,2	18,48 a	18,41 a	50,18 a	58,21 a	140,08 a
-4,1	14,83 b	15,67 b	41,04 b	38,37 c	108,74 c
-4,6	16,73 ab	15,15 b	43,33 b	46,50 b	121,06 b
-6,2	16,34 b	14,85 b	41,93 b	39,88 c	108,35 c
CV (%)	21,15	26,22	17,90	17,44	10,78



**Figura 5.1.** Secções transversais de amostras foliares de Alfafa submetidas a determinados tratamentos de temperaturas baixas em ambiente controlado: A, 0,2°C; B, -4,1°C; C, -4,6°C; D, -6,2°C. e= estômato; ep =epiderme; fv = feixe vascular; pl = parênquima lacunoso; pp = parênquima paliçadico.

Em Milheto, Sorgo e Marandu foi observado redução na espessura total da folha. Contudo, em determinados tratamentos e espécies houve o aumento significativo da espessura de algumas estruturas. Em Milheto submetido ao tratamento de -4,1°C ocorreu o aumento na epiderme adaxial e abaxial, e também no parênquima radiado (Tabela 5.2, Figura 5.2).

Para o Sorgo, no tratamento -4,1°C houve um aumento das células buliformes e do parênquima radiado em relação ao tratamento -2,7°C (Tabela 5.3, Figura 5.2). No tratamento -4,1° é possível observar o tecido em degradação devido ao estresse provocado por temperatura baixa (Tabela 5.3, Figura 5.2, F).

Na folha de Marandu houve diminuição em todas as estruturas analisadas no tratamento -2,7°C, mas estas voltaram a aumentar na temperatura -4,1°C. (Tabela

5.4, Figura 5.2). Em algumas amostras no tratamento -2,7°C e -4,6°C não foi possível aferir a espessura das estruturas, em decorrência dos danos causados pelo tratamento nas folhas (Tabela 5.4, Figura 5.2, I e L).

**Tabela 5.2.** Espessura média das epidermes adaxial e abaxial, célula buliforme, parênquima radiado e espessura total de folhas de Milheto submetidas às temperaturas de 0,2; -2,7 e -4,1°C durante uma hora.

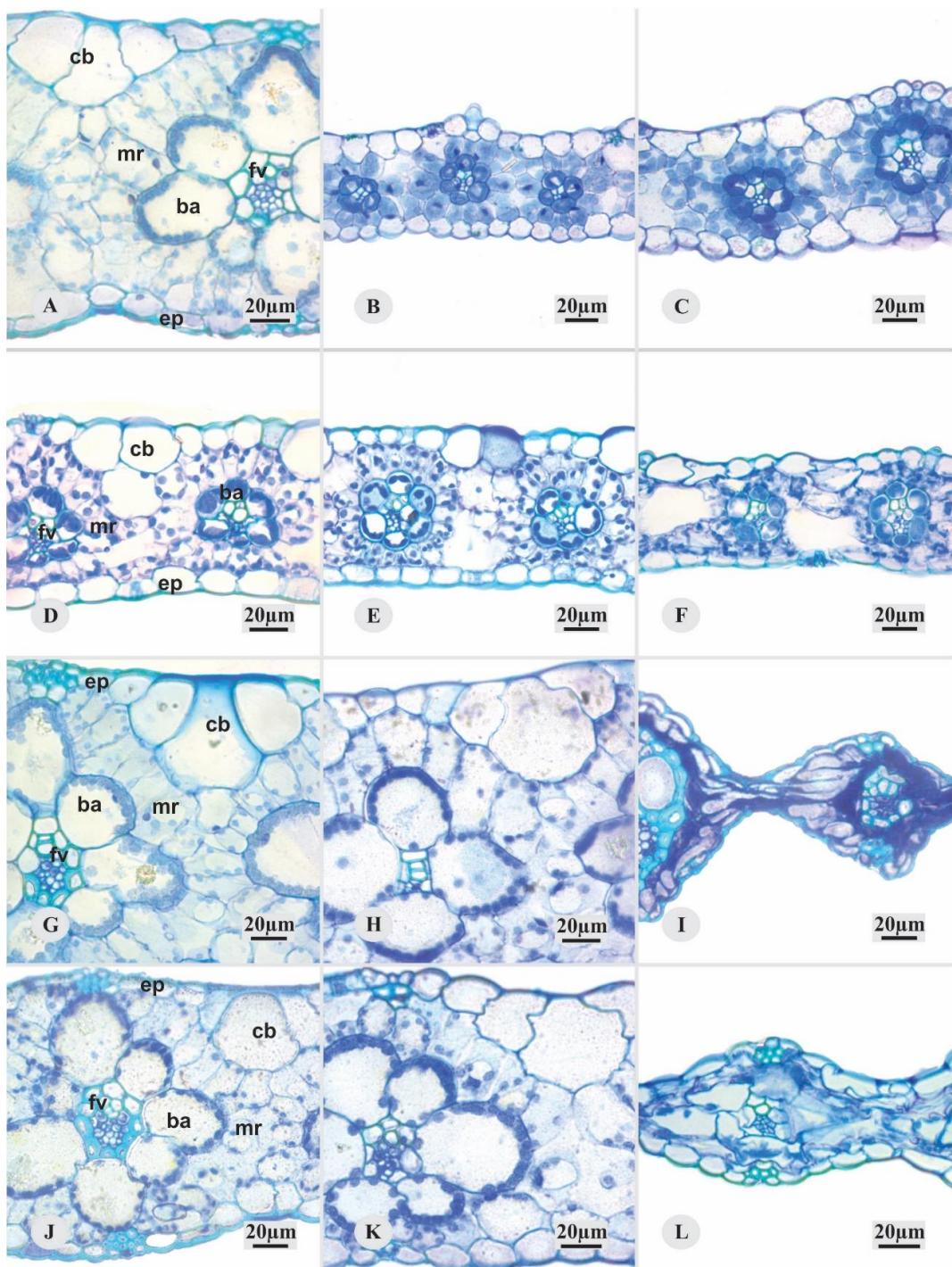
Temperatura (°C)	Epiderme Adaxial (μm)	Epiderme Abaxial (μm)	Célula Buliforme (μm)	Parênquima Radiado (μm)	Espessura Total (μm)
0,2	12,52 b	10,27 c	46,64 a	22,72 b	142,82 a
-2,7	11,71 b	11,96 b	21,73 c	19,55 c	78,87 c
-4,1	15,71 a	15,87 a	26,95 b	27,54 a	100,50 b
CV (%)	19,26	19,95	26,10	25,28	15,81

**Tabela 5.3.** Espessura média para epiderme adaxial e abaxial, célula buliforme, parênquima radiado e espessura total de folhas de Sorgo submetidas às temperaturas de 0,2; -2,7 e -4,1°C durante uma hora.

Temperatura (°C)	Epiderme Adaxial (μm)	Epiderme Abaxial (μm)	Célula Buliforme (μm)	Parênquima Radiado (μm)	Espessura Total (μm)
0,2	13,82 a	14,45 a	27,57 a	21,38 a	93,47 a
-2,7	10,35 b	12,29 b	20,67 b	15,93 b	79,75 b
-4,1	10,67 b	12,54 b	25,94 b	19,58 a	84,54 b
CV (%)	23,18	18,94	21,11	20,67	17,06

**Tabela 5.4.** Espessura média para epiderme adaxial e abaxial, célula buliforme, parênquima radiado e espessura total de folhas de Marandu submetidas às temperaturas de 0,2, -2,7, -4,1 e 4,6°C.

Temperatura (°C)	Epiderme Adaxial (μm)	Epiderme Abaxial (μm)	Célula Buliforme (μm)	Parênquima Radiado (μm)	Espessura Total (μm)
0,2	12,59 ab	11,28 bc	53,67 a	25,74 a	147,05 a
-2,7	10,84 b	10,50 c	38,24 b	17,74 b	123,23 b
-4,1	13,67 a	12,43 ab	50,28 a	23,93 a	144,22 a
-4,6	14,05 a	12,97 a	47,51 a	25,27 a	145,95 a
CV (%)	25,10	24,15	26,82	25,60	20,77



**Figura 5.2.** Secções transversais de amostras foliares de Milheto (A-C), Sorgo (D-F) e Marandu (G-L), submetidas a determinados tratamentos de temperatura baixa em câmara de crescimento de plantas com condições de temperatura e luminosidade controladas: A,D,G, 0,2°C; B,E,H,I, -2,7°C; C, F, J, -4,1°C; K,L, -4,6°C. ep =epiderme; ba = bainha do feixe; cb=célula buliforme; fv = feixe vascular; mr= mesofilo radiado.

Foi observado que a espécie que reagiu melhor ao estresse intenso do frio foi o Tifton 85, por apresentar menores alterações anatômicas. (Tabela 5.5, Figura 5.3). Na Aveia as únicas estruturas que diminuíram significativamente foram o parênquima paliçádico e lacunoso, já as outras estruturas analisadas se mantiveram sem alterações significativas (Tabela 5.6, Figura 5.3).

O capim Mombaça apresentou redução gradual das espessuras das estruturas conforme a diminuição da temperatura (Tabela 5.7, Figura 5.3). Em algumas situações na temperatura -6,2°C não foi viável fazer as medidas das espessuras em consequência dos tecidos degradados pela baixa temperatura (Tabela 5.7, Figura 5.3, H).

**Tabela 5.5.** Espessura média das epidermes adaxial e abaxial, célula buliforme, parênquima radiado e espessura total de folhas de Tifton 85 submetidas às temperaturas de 0,2 e -6,2°C durante uma hora.

Temperatura (°C)	Epiderme Adaxial (μm)	Epiderme Abaxial (μm)	Célula Buliforme (μm)	Parênquima Radiado (μm)	Espessura Total (μm)
0,2	6,59 a	7,29 a	59,31 a	15,86 a	110,89 a
-6,2	6,80 a	7,27 a	59,26 a	15,59 a	116,32 a
CV (%)	33,58	38,98	21,34	27,87	14,74

**Tabela 5.6.** Espessura média para epiderme adaxial e abaxial, parênquima lacunoso e paliçádico e espessura total da folha de Aveia para as temperaturas de 0,2 e -4,1°C durante uma hora.

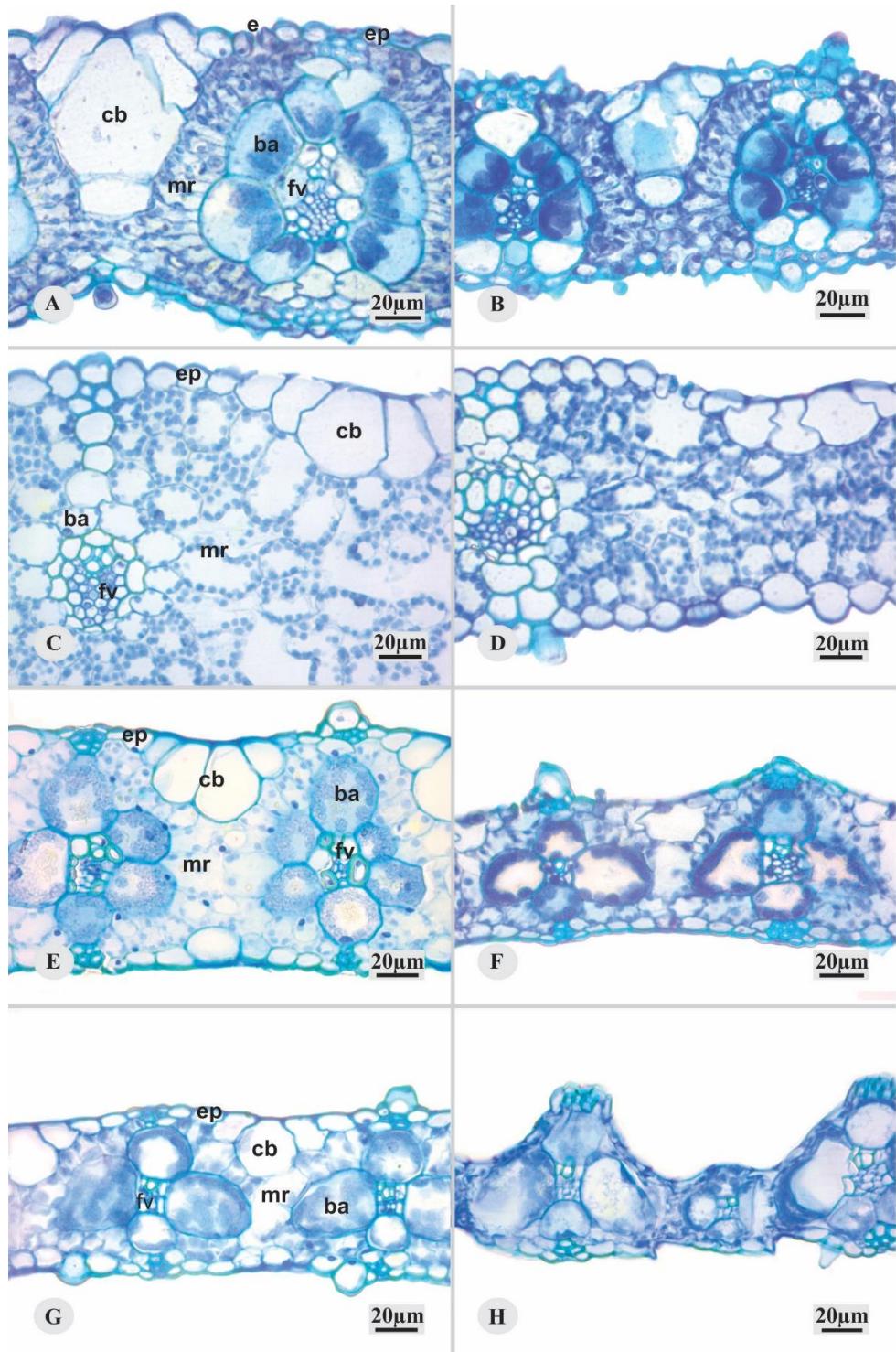
Temperatura (°C)	Epiderme Adaxial (μm)	Epiderme Abaxial (μm)	Parênquima Lacunoso (μm)	Parênquima Paliçádico (μm)	Espessura Total (μm)
0,2	14,07 a	13,95 a	36,97 a	116,22 a	164,13 a
-4,1	13,70 a	13,84 a	31,00 b	98,95 b	143,69 b
CV (%)	17,88	16,58	21,31	18,57	14,50

**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

Pode-se inferir que a diminuição gradativa das estruturas analisadas, bem como o aumento de partes de determinadas estruturas de Alfafa, Milheto, Sorgo, Marandu e Aveia são decorrentes do estresse provocado pelas temperaturas críticas. Além disso, as estruturas corrompidas do tratamento -2,7°C e -4,6°C de Marandu e -6,2°C de Mombaça exibem uma suscetibilidade ao frio intenso. Por fim, com a apresentação de resultados favoráveis do Tifton 85 é possível concluir que esta espécie é tolerante a todas as temperaturas avaliadas.

De acordo com os dados obtidos em geral quanto menor a temperatura, as espessuras dos tecidos analisados tendem a diminuir. Contudo, tanto a epiderme adaxial quanto a epiderme abaxial, no tratamento a -1,8°C, apresentaram aumento significativo de espessura (Tabela 5.1 e Figura 5.1).



**Figura 5.3.** Secções transversais de amostras foliares de. Tifton 85 (A-B), Aveia Preta (C-D) e capim Mombaça (EH), submetidas a temperaturas mínimas críticas controladas em câmara de crescimento: A,C,E, 0,2°C; B,H, -6,2°C; D, F, -4,1°C; G, -4,6°C. ep =epiderme; ba = bainha do feixe; cb=célula buliforme; fv = feixe vascular; mr= mesofilo radiado.

## 5.4 DISCUSSÃO

As análises realizadas no presente estudo revelaram que as temperaturas críticas causam danos e alterações morfológicas e anatômicas que podem ser irreversíveis às estruturas foliares, com respostas diferenciadas conforme a tolerância das espécies avaliadas.

Em condições de climas temperados, para permanecerem vivas durante o inverno as plantas devem evitar congelamento em seus tecidos, principalmente do sistema vascular (CAVENDER-BARES, 2005).

Nos tecidos vivos de plantas tolerantes, o congelamento pode causar formação de gelo intracelular, que pode matar as células, ou formação de gelo extracelular, o que pode proteger as células contra danos. Dentro dos elementos de vaso do xilema, temperaturas de congelamento podem causar cavitação resultando em perdas de função xilema, dependendo do tamanho dos vasos do xilema, bem como a temperatura de congelamento. O transporte do floema é também limitado por temperaturas baixas, à medida que a seiva se torna mais viscosa (CAVENDER-BARES, 2005).

De acordo com Livingston III et al. (2007), *Arabidopsis* vem sendo usada como planta modelo para investigar a tolerância ao congelamento controlado. Tal espécie apresentou dano análogo aos cereais de inverno no tecido vascular de suas raízes e eixo foliar, mas nenhum dano às regiões meristemáticas após ser cultivada sob condições de congelamento por sete dias.

Pearce; McDonald (1977), avaliaram danos ocorridos na ultraestrutura celular do mesófilo foliar de plantas de *Festuca arundinacea* Scherb, submetidas a congelamento, seguida pelo descongelamento. Concluíram que os núcleos se apresentaram contraídos, as organelas estavam inchadas ou parcialmente destruídas, plasmalema e membranas nucleares partidas ou ausentes e os vacúolos algumas vezes destruídos.

Algumas das respostas ao estresse decorrente do frio também foram encontradas em plantas sob estresse hídrico, em que também ocorre a retirada de água das células. As concentrações de ácido abscísico endógeno, açúcares e níveis de soluto compatíveis também são aumentados pelo estresse devido a baixas temperaturas, correlacionando com aumento na tolerância ao frio. Além disso, o

ABA exógeno induz tolerância de congelamento em várias espécies (MALDONADO et al., 1997).

O Ácido Abscísico tem um papel direto na resposta à desidratação celular que ocorre durante o congelamento, e também é provável que esteja envolvido no controle da expressão gênica durante a aclimatação ao frio. A água não congelada é encontrada principalmente na parede celular e pode estar em transporte (SPARKS et al., 2000).

De acordo com os dados obtidos no presente estudo, quanto menor a temperatura, pode ser observado que, estatisticamente, as espessuras dos tecidos analisados tendem a diminuir devido aos danos causados pelo estresse intenso. Isto pode ser decorrente do processo de desidratação provocado pelo congelamento dos espaços intercelulares seguido de morte dos tecidos.

No caso do Tifton 85, apesar do estresse do frio até a temperatura de -6,2º C durante uma hora não houve alterações significativas em seus tecidos, por se tratar de uma cultivar muito tolerante ao frio. Em espécies tolerantes pode haver um mecanismo de reparação dos danos internos, com crescimento de tecidos adjacentes à região afetada, conforme reportou Goffinet (2004) em Uva.

Åström et al. (2015), observaram que as folhas de inverno de *Fragaria vesca* são menores e têm pelos abundantes, sua densidade estomática é maior e seu mesófilo é mais denso com mais células de parênquima paliçádico. Muitas destas características podem ser consideradas pelos autores como adaptações para intensidades de luz, temperaturas de congelamento e stress de dessecação de geada no inverno, sendo a que capacidade fotossintética não se altera dependendo da estação do ano.

Gramíneas rizomatosas tais como *Arundo donax* L. (C3) e *Panicum virgatum* L. (C4) apresentaram diversas alterações nos parâmetros de fotossíntese quando submetidas a combinação de baixa temperatura e escuridão (Sánchez et al, 2016). De acordo com os autores, *Panicum virgatum* parece ser mais tolerante ao frio, ao estresse hídrico, a salinidade e a escuridão contínua.

## 5.5 CONCLUSÕES

É possível inferir que o aumento da epiderme em ambas as faces, a diminuição gradativa do parênquima paliçádico e lacunoso e da espessura total são decorrentes do estresse devido às temperaturas mínimas críticas. Os resultados apresentados são úteis para confirmar os danos detectados por outros métodos indiretos e quantitativos.

## REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, P. B.; PEDRO, J. R.; DONZELLI, P. L. Zoneamento edafoclimático de plantas forrageiras. in: SIMPÓSIO SOBRE ECOSSISTEMAS DE PASTAGENS, 2., 1993, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1993. p. 1-16.
- ÅSTRÖM, H.; METSOVUORI, E.; SAARINEN, T.; LUNDELL, R.; HÄNNINEN, H. Morphological characteristics and photosynthetic capacity of *Fragaria vesca* L. winter and summer leaves. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, Jena, v. 215, p. 33-39, 2015.
- CAVENDER-BARES, J. Impacts of freezing on long distance transport in woody plants. In: HOLBROOK, N. M.; ZWIENIECKI, M. A. (Ed.). **Vascular transport in plants**. New York: Elsevier, 2015. p. 401-424.
- GOFFINET, M. C. **Anatomy of grapevine winter injury and recovery**. Cornell: University, Department of Horticultural Sciences, NY State Agricultural Experiment Station, 2004. Disponível em: <[http://www.hort.cornell.edu/goffinet/Anatomy\\_of\\_Winter\\_Injury\\_hi\\_res.pdf](http://www.hort.cornell.edu/goffinet/Anatomy_of_Winter_Injury_hi_res.pdf)>. Acesso em: 18 jan. 2017.
- JOHANSEN, D.A. Stains. In: **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. p. 49–64.
- LIVENGSTON III, D. P., TALLURY, S. P. Freezing in non-acclimated Oat. II: Thermal response and histology of recovery in gradual and rapidly frozen plants. **Termochimica Acta**, New York, v. 481, p. 20-27, 2009.
- LIVENGSTON III, D. P.; TALLURY, S. P. ;PREMKUMAR, R.; OWENS, S. A.; OLLEN, C.R. Changes in the histology of cold-hardened oat crowns during recovery from freezing. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 4, p. 1545-1558, 2005.
- LIVINGSTON III, D. P.; TUONG T. D. Three-dimensional reconstruction of frozen and thawed plant tissues from microscopic images. **Methods in Molecular Biology**, New York, v.1166, p.117-137, 2014.

MALDONADO, C. A.; ZUÑIGA, G. E.; CORCUERA, L. J.; ALBERDI, M. Effect of water stress on frost resistance of oat leaves. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 38, p. 99-107, 1997.

PEARCE, R. S. ; MCDONALD, I. Ultrastructural damage due to freezing followed by thawing in shoot meristem and leaf mesophyll cells of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb. **Planta**, Heidelberg, v. 134, n. 2, p. 159-168, 1977.

SÁNCHEZ, E.; GIL, S.; AZCÓN-BIETO, J.; NOGUÉS, S. The response of *Arundo donax* L. (C3) and *Panicum virgatum* (C4) to different stresses. **Biomass and Bioenergy**, Kidlington, v. 85, p. 335- 345, 2016.

SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Abingdon, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.

SPARKS, J. P.; CAMPBELL, G. S.; BLACK, R. A. Liquid water content of wood tissue at temperatures below 0° C. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 30, n. 4, p. 624–630, 2000.

## 6 ZONEAMENTO DO RISCO DE GEADAS PARA ESPÉCIES FORRAGEIRAS NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

### RESUMO

As geadas são um dos principais fatores limitantes ao forrageamento contínuo de bovinos na região sul do Brasil. O Estado do Paraná localiza-se em uma região de transição, onde os riscos de geadas variam em função da latitude e altitude. Para possibilitar a indicação de espécies de acordo com o clima da região é necessário mapear os riscos de geadas durante o ano. Assim, realizou-se o zoneamento de riscos, considerando as temperaturas críticas para *Panicum maximum* (cv Mombaça); *Brachiaria brizantha* (cv Marandu) (Marandu), *Cynodon* spp (cv Tifton 85), *Pennisetum glaucum* (Milheto), *Sorghum bicolor* (Sorgo), *Avena strigosa* (Aveia Preta) e *Medicago sativa* (alfafa). Foram determinadas as probabilidades de ocorrência das temperaturas mínimas abaixo dos limites críticos para cada uma dessas espécies para os meses de maio a setembro e delimitadas as áreas com possibilidade de cultivo. Os resultados obtidos permitem a combinação de forrageiras para possibilitar o forrageamento contínuo dos animais em pasto.

**Palavras chave:** Risco climático. Baixas temperaturas. Mapeamento. Pastagens. Paraná.

### ABSTRACT

### FROST RISK ZONING FOR FORAGE SPECIES IN THE STATE OF PARANÁ, BRAZIL

Frosts are one of the main limiting factors for the continuous foraging of cattle in southern Brazil. The State of Paraná is located in a transition region, where the risks of frost vary according to latitude and altitude. To make it possible to indicate species

according to the climate of the region, it is necessary to map the risks of frost during the year. Thus, the risk zoning was performed, considering the critical temperatures for *Panicum maximum* (cv Mombasa); *Brachiaria brizantha* (cv Marandu), *Cynodon* spp (cv Tifton 85), *Pennisetum glaucum* (millet), *Sorghum bicolor* (sorghum), *Avena strigosa* (black Oat) and *Medicago sativa* (alfalfa). The probability of occurrence of minimum temperatures below the critical limits for each of these species was determined for the months of May to September and the areas with possibility of cultivation were delimited. The results obtained allow the combination of forages to allow the continuous foraging of the animals in pasture.

**Key words:** Climatic risk. Low temperatures. Mapping. Pasture. Paraná.

## 6.1 INTRODUÇÃO

O clima é o fator dinâmico que mais afeta a produtividade agrícola. O conhecimento do clima de uma região possibilita alocar cada espécie e variedade de planta de acordo com suas exigências e potenciais. Ao longo da evolução as espécies vegetais desenvolveram estratégias de adaptação às mais diferentes condições de clima, criando uma grande diversidade genética que deve ser conhecida e potencializada.

Confrontando-se a disponibilidade climática de uma região com as características de cada espécie ou variedade de planta, é possível determinar se é viável produzir de forma econômica. De uma maneira geral as disponibilidades térmicas e hídricas são os principais limitantes à produtividade agrícola. Embora a precipitação seja a variável que cause maiores frustrações de safras no mundo, a temperatura é a mais crítica, pois, ao contrário da precipitação, que apresenta variabilidade anual e sazonal, a temperatura é diretamente dependente da disponibilidade de radiação solar. Desta forma apresenta um ciclo anual bem estabelecido, dependente da latitude e da altitude local. Regiões de maiores latitudes e altitudes têm invernos mais frios, enquanto que áreas próximas ao equador, de menores altitudes, têm temperaturas elevadas e regulares durante o ano.

A temperatura regula a distribuição das plantas no globo terrestre. De acordo com o regime térmico anual de uma região, as plantas têm um ciclo típico de desenvolvimento. Dependendo da intensidade e duração, baixas temperaturas paralisam as atividades metabólicas das plantas (LARCHER, 2000). As geadas causam danos que limitam a expansão de espécies sensíveis. Quando se tenta o cultivo de espécies não adaptadas em tais condições ocorrem grandes prejuízos (CARAMORI et al., 2001; WREGE et al., 2005).

Em noites com geadas de radiação, forma-se um gradiente próximo à superfície denominado de inversão térmica (PEREIRA et al., 2002). A diferença entre a relva e o abrigo meteorológico em noites com geadas varia de 3 a 9°C (GRODZKI et al., 1996), com valores médios de 4 a 4,5°C (SENTELHAS et al., 1995; ROSISCA et al., 2015).

O Estado do Paraná, cortado pelo Trópico de Capricórnio, que delimita a máxima declinação Sul do Sol, localiza-se numa região de transição climática, caracterizada pelas diferenças de altitude e latitude. Regiões de maiores latitudes e altitudes, localizadas ao Sul do paralelo 24 °S, apresentam estação de crescimento bem definida, com invernos rigorosos e geadas frequentes. A faixa ao Norte, em menores altitudes (400 a 700m) têm geadas menos frequentes e verões quentes que possibilitam o cultivo de espécies mais sensíveis a baixas temperaturas (CAVIGLIONE et al., 2000; WREGE et al., 2011).

As espécies forrageiras têm ampla diversidade, possibilitando combinar espécies de cultivo com diferentes sensibilidades ao frio, de acordo com o clima da região. Neste trabalho realizou-se o zoneamento de risco de geadas para sete espécies/variedades de forrageiras para o estado do Paraná, de acordo com sua tolerância a temperaturas mínimas.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Séries históricas de dados de temperatura mínima de abrigo de 20 estações do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), do período 1989-2015, dos meses de maio a setembro, foram organizadas e consistidas em planilhas de Excel. Para cada estação, foram organizados os dados mensais de menor valor de temperatura

mínima anual, constituindo uma série para cada local para os meses de maio a setembro. Esses dados foram ajustados à distribuição de extremos, também conhecida como distribuição de Fisher-Tippet Tipo I ou Gumbel. A função densidade de probabilidade e cumulativa, respectivamente, são dadas por:

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

e

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

em que  $\alpha$  e  $\beta$  são parâmetros da distribuição (ASSIS et al., 1996). Os coeficientes  $\alpha$  e  $\beta$  das distribuições foram ajustados pelo método de Lieblein (THOM, 1966; ASSIS et al., 1996). Com os modelos ajustados para cada local foram geradas as probabilidades de ocorrências de temperaturas mínimas abaixo de um valor crítico especificado.

O nível de 100% de probabilidade de ocorrência do valor mínimo especificado foi correlacionado com os valores de latitude, longitude e altitude das estações, gerando-se equações de regressão linear múltiplas por mês. Essas equações foram utilizadas para gerar mapas de temperatura mínima do ar no abrigo, resolvendo-as sobre a base altimétrica do Shuttle Radar Topography Mission (STRM) (FARR; KOBICK, 2000) com resolução de 900m, recortada para o estado do Paraná, no software de Sistema de Informação Geográfica (SIG) ArcGis versão 10.2. Para cada pixel foram gerados os valores de probabilidade de temperatura mínima dentro da malha de altitude e os resultados foram mapeados para o Paraná.

## 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros  $\alpha$  e  $\beta$  das distribuições ajustadas são apresentados na Tabela 6.1. Os ajustes foram adequados para todos os períodos, permitindo o seu uso para determinação teórica de probabilidades de temperaturas mínimas abaixo de valores especificados. Caramori et al. (2001a) ajustaram os parâmetros  $\alpha$  e  $\beta$  da distribuição de extremos para essas estações, para séries anuais de temperaturas mínimas

abaixo de zero, com séries históricas até o ano 2000. Os ajustes do presente trabalho são mais consistentes, pois foram acrescentados quinze anos de dados às séries.

**Tabela 6.1.** Parâmetros  $\alpha$  e  $\beta$  da distribuição de extremos para as estações do IAPAR no Paraná, nos meses de abril a setembro.

ESTAÇÃO	Abril		Maio		Junho		Julho		Agosto		Setembro	
	Alfa	Beta	Alfa	Beta	Alfa	Beta	Alfa	Beta	Alfa	Beta	Alfa	Beta
ANTONINA	11,67	1,53	7,11	1,82	4,96	2,12	4,91	2,11	5,40	2,02	7,61	1,73
APUCARANA	10,65	2,04	6,29	2,35	4,05	2,88	3,57	3,10	4,78	2,93	6,90	2,24
BANDEIRANTES	11,13	1,81	6,47	2,11	3,76	3,02	4,00	2,89	5,21	3,00	8,88	1,96
BELA V. PARAÍSO	11,88	1,79	7,73	2,09	5,28	2,69	5,06	2,97	5,86	2,58	8,16	2,07
CÂNDIDO DE ABREU	7,98	2,22	4,41	1,59	2,35	2,38	1,49	2,19	3,37	2,86	5,39	1,81
CAMBARÁ	10,26	1,96	5,55	2,23	2,79	3,04	2,55	3,02	4,22	2,61	7,79	2,23
CASCABEL	8,14	2,26	4,27	1,82	1,88	2,32	0,78	2,54	2,68	2,50	3,91	2,45
CERRO AZUL	9,78	1,24			2,64	2,68	2,54	2,50	3,09	2,03	5,41	1,80
CIANORTE	10,41	2,12	6,04	2,06	3,37	2,45	3,15	2,33	4,31	3,23	6,55	2,90
CLEVELÂNDIA	4,92	2,04	1,25	1,86	-0,78	1,95	-1,78	2,18	-0,18	2,32	1,0	2,5
FRANCISCO BELTRÃO	6,90	2,06	1,81	1,95	-0,85	2,00	-0,50	1,85	0,51	2,47	2,71	1,77
GUARAPUAVA	6,09	2,30	0,49	2,40	-1,77	2,72	-2,13	2,44	-0,28	2,89	1,11	2,49
GUARAUQUEÇABA	4,80	2,65	7,23	2,41	4,61	2,31	4,54	2,52	5,46	2,29	8,10	1,84
IBIPORÃ	12,45	1,28	7,46	1,93	4,87	2,80	4,87	2,57	5,88	2,67	8,47	2,28
IRATI	6,90	2,06	2,51	2,07	-0,36	2,44	-0,64	2,12	0,89	2,63	2,99	2,01
JOAQUIM TÁVORA	9,55	1,99	4,89	2,32	2,38	2,64	2,49	3,00	3,94	3,00	7,41	2,37
LAPA	6,31	2,15	1,74	2,39	0,15	2,74	-0,89	2,03	0,28	2,53	2,60	1,93
LARANJEIRAS DO SUL	6,72	1,58	2,84	1,82	0,73	2,18	0,44	1,47	1,43	2,20	3,02	1,85
LONDRINA	10,50	1,85	6,04	1,87	3,38	2,71	3,57	2,74	4,64	2,91	7,26	2,21
MORRETES	13,00	1,68	8,58	2,82	6,22	2,15	5,86	2,43	6,0	2,8	8,73	2,06
NOVA CANTU	8,22	2,11	4,42	1,87	1,77	1,98	1,31	2,18	3,10	2,51	4,98	2,11
PALMAS	3,89	1,69	-0,09	1,83	-2,33	2,53	-2,49	1,80	-0,81	1,70	-0,17	2,13
PALOTINA	7,49	2,19	2,79	2,18	0,13	2,81	-0,56	2,46	0,54	2,67	3,30	2,62
PARANÁVAÍ	11,13	2,23	6,79	2,19	4,43	2,60	4,04	2,90	5,04	3,54	7,43	2,64
PATO BRANCO	6,65	1,76	2,84	1,54	0,08	2,29	-0,15	1,58	1,74	1,46	2,45	1,84
PINHAIS	6,10	1,71	2,40	2,14	-0,82	1,97	-0,16	1,95	0,18	2,49	3,90	1,77
PLANALTO	8,56	2,48	4,38	2,19	2,06	2,30	1,43	2,33	3,03	2,91	5,08	2,19
PONTA GROSSA	6,08	2,92	2,18	2,50	-0,24	2,60	-0,27	2,35	0,72	2,93	3,18	2,09
QUEDAS DO IGUAÇU	8,43	2,24	4,73	1,68	2,20	2,21	1,38	2,05	2,79	2,51	4,49	1,97
SÃO MIGUEL DO IGUAÇU	9,07	1,99	4,70	1,09	2,16	2,37	1,13	1,96	2,79	2,23	4,61	2,14
TELÊMACO BORBA	7,42	1,66	2,34	2,22	0,20	2,30	0,16	2,53	0,96	2,39	3,42	2,00
UMUARAMA	10,91	2,50	6,75	2,14	4,51	2,47	3,66	2,68	5,20	3,12	7,18	2,66

As Tabelas 6.2 a 6.7 apresentam as estações analisadas com respectivas coordenadas e as probabilidades de ocorrência de temperaturas mínimas de abrigo, desde 10% (P10) até 100% (P100). Nota-se uma forte dependência de altitude e latitude na severidade das temperaturas mínimas. As estações de Palmas e Guarapuava, localizadas acima de 1000 m de altitude em latitudes mais elevadas são as mais frias do Paraná. Clevelândia, com 930 m de altitude e localizada no extremo Sul do Estado é a terceira mais fria. Observa-se também que as menores temperaturas mínimas prováveis para cada local ocorrem no mês de julho (Tabela 6.5), seguido de junho (Tabela 6.4) e agosto (Tabela 6.6).

**Tabela 6.2.** Estações meteorológicas utilizadas, especificando latitude (Lat) e longitude (Lon) em décimos de graus, altitude (Alt) (m) e temperaturas mínimas (°C) estimadas com diferentes níveis de probabilidade. Mês de Abril.

ESTAÇÃO	Lat	Lon	Alt	P100	P90	P80	P70	P60	P50	P40	P30	P20	P10
ANTONINA	-25,22	-48,80	60	11,67	11,84	12,02	12,22	12,45	12,73	13,07	13,51	14,13	15,19
APUCARANA	-23,50	-51,53	746	10,65	10,87	11,11	11,38	11,70	12,07	12,52	13,11	13,94	15,35
BANDEIRANTES	-23,10	-50,35	440	11,13	11,32	11,53	11,78	12,06	12,39	12,79	13,31	14,05	15,31
BELA V.PARAISO	-22,95	-51,20	600	11,88	12,06	12,28	12,52	12,79	13,12	13,52	14,03	14,76	16,00
CÂNDIDO DE ABREU	-24,63	-51,25	645	7,98	8,21	8,47	8,77	9,11	9,51	10,01	10,64	11,54	13,08
CAMBARA	-23,00	-50,03	450	10,26	10,47	10,70	10,96	11,27	11,62	12,06	12,63	13,42	14,78
CASCAVEL	-24,88	-53,55	660	8,14	8,38	8,64	8,94	9,29	9,70	10,21	10,86	11,78	13,34
CERRO AZUL	-24,82	-49,25	360	9,78	9,91	10,06	10,23	10,42	10,64	10,92	11,28	11,78	12,64
CIANORTE	-23,67	-52,58	530	10,41	10,64	10,89	11,17	11,50	11,88	12,36	12,97	13,83	15,30
CLEVELANDIA	-26,42	-52,35	930	4,92	5,14	5,38	5,65	5,97	6,34	6,79	7,38	8,21	9,62
FRANCISCO BELTRÃO	-26,08	-53,07	650	6,09	6,33	6,60	6,91	7,26	7,68	8,19	8,85	9,79	11,38
GUARAPUAVA	-25,38	-51,50	1026	4,80	5,08	5,39	5,74	6,15	6,64	7,23	7,99	9,07	10,91
GUARQUEÇABA	-25,27	-48,53	40	12,45	12,58	12,73	12,91	13,10	13,34	13,62	13,99	14,51	15,40
IBIPORA	-23,27	-51,02	484	12,45	12,58	12,73	12,91	13,10	13,34	13,62	13,99	14,51	15,40
IRATI	-25,45	-50,58	893	6,90	7,12	7,36	7,64	7,95	8,33	8,79	9,38	10,22	11,64
JOAQUIM TAVORA	-23,50	-49,95	512	9,55	9,76	9,99	10,26	10,56	10,93	11,37	11,94	12,75	14,12
LAPA	-25,78	-49,77	910	6,31	6,54	6,79	7,08	7,41	7,80	8,28	8,90	9,77	11,26
LARANJEIRAS DO SUL	-25,42	-52,42	880	6,72	6,88	7,07	7,28	7,53	7,81	8,17	8,62	9,27	10,37
LONDRINA	-23,37	-51,17	585	10,50	10,69	10,91	11,16	11,44	11,78	12,19	12,73	13,48	14,76
MORRETES	-25,50	-48,82	10	13,00	13,18	13,38	13,60	13,86	14,17	14,54	15,03	15,71	16,87
NOVA CANTU	-24,67	-52,57	540	8,22	8,44	8,69	8,97	9,30	9,68	10,15	10,76	11,61	13,07
PALMAS	-26,48	-51,98	1100	3,89	4,07	4,27	4,50	4,76	5,07	5,44	5,93	6,62	7,79
PALOTINA	-24,30	-53,92	310	7,49	7,72	7,98	8,27	8,60	9,00	9,49	10,12	11,01	12,52
PARANAVAI	-23,08	-52,43	480	11,13	11,37	11,63	11,93	12,27	12,68	13,17	13,82	14,72	16,27
PATO BRANCO	-26,12	-52,68	700	6,65	6,84	7,04	7,28	7,55	7,87	8,26	8,77	9,48	10,70
PINHAIS	-25,42	-49,13	930	6,10	6,28	6,48	6,71	6,97	7,28	7,66	8,15	8,85	10,03
PLANALTO	-25,70	-53,78	400	8,56	8,82	9,11	9,44	9,82	10,27	10,83	11,54	12,54	14,26
PONTA GROSSA	-25,22	-50,02	880	6,08	6,39	6,73	7,12	7,57	8,10	8,75	9,59	10,77	12,79
QUEDAS DO IGUAÇU	-25,52	-53,02	513	8,43	8,66	8,93	9,23	9,57	9,98	10,48	11,13	12,04	13,59
SÃO MIGUEL DO IGUA	-25,43	-54,37	260	9,07	9,28	9,51	9,78	10,09	10,45	10,89	11,46	12,27	13,65
TELEMACO BORBA	-24,33	-50,62	768	7,42	7,60	7,79	8,02	8,27	8,58	8,95	9,42	10,10	11,25
UMUARAMA	-23,73	-53,28	480	10,91	11,17	11,47	11,80	12,19	12,64	13,20	13,92	14,94	16,68

**Tabela 6.3.** Estações meteorológicas utilizadas, especificando latitude (Lat) e longitude (Lon) em décimos de graus, altitude (Alt) (m) e temperaturas mínimas (°C) estimadas com diferentes níveis de probabilidade. Mês de Maio.

ESTAÇÃO	Lat	Lon	Alt	P100	P90	P80	P70	P60	P50	P40	P30	P20	P10
ANTONINA	-25,22	-48,80	60	7,11	7,30	7,52	7,76	8,04	8,38	8,78	9,31	10,05	11,31
APUCARANA	-23,50	-51,53	746	6,29	6,54	6,81	7,13	7,49	7,92	8,44	9,12	10,07	11,70
BANDEIRANTES	-23,10	-50,35	440	6,47	6,70	6,94	7,23	7,55	7,94	8,41	9,01	9,87	11,33
BELA V.PARAISO	-22,95	-51,20	600	7,73	7,95	8,20	8,47	8,80	9,18	9,64	10,24	11,09	12,54
CÂNDIDO DE ABREU	-24,63	-51,25	645	4,41	4,58	4,76	4,98	5,22	5,51	5,87	6,32	6,97	8,07
CAMBARA	-23,00	-50,03	450	5,55	5,79	6,05	6,35	6,69	7,10	7,59	8,24	9,14	10,69
CASCAVEL	-24,88	-53,55	660	4,27	4,47	4,68	4,92	5,21	5,54	5,94	6,47	7,21	8,47
CERRO AZUL	-24,82	-49,25	360	4,95	5,17	5,42	5,70	6,03	6,41	6,88	7,48	8,34	9,80
CIANORTE	-23,67	-52,58	530	6,04	6,26	6,50	6,77	7,09	7,47	7,93	8,52	9,36	10,79
CLEVELANDIA	-26,42	-52,35	930	1,25	1,45	1,67	1,92	2,21	2,54	2,96	3,49	4,25	5,54
FRANCISCO BELTRÃO	-26,08	-53,07	650	1,81	2,02	2,25	2,51	2,81	3,16	3,60	4,16	4,95	6,30
GUARAPUAVA	-25,38	-51,50	1026	0,49	0,75	1,03	1,35	1,72	2,16	2,69	3,39	4,36	6,03
GUARÁQUECABA	-25,27	-48,53	40	7,23	7,49	7,77	8,09	8,46	8,90	9,44	10,13	11,11	12,77
IBIPORA	-23,27	-51,02	484	7,46	7,66	7,89	8,15	8,45	8,80	9,23	9,78	10,57	11,91
IRATI	-25,45	-50,58	893	2,51	2,72	2,97	3,24	3,56	3,94	4,40	5,00	5,84	7,27
JOAQUIM TAVORA	-23,50	-49,95	512	4,89	5,14	5,41	5,72	6,08	6,50	7,02	7,68	8,62	10,23
LAPA	-25,78	-49,77	910	1,74	1,99	2,28	2,59	2,96	3,40	3,93	4,62	5,59	7,25
LARANJEIRAS DO SUL	-25,42	-52,42	880	2,84	3,03	3,25	3,49	3,77	4,10	4,51	5,03	5,77	7,03
LONDRINA	-23,37	-51,17	585	6,04	6,24	6,46	6,71	7,00	7,34	7,76	8,30	9,06	10,35
MORRETES	-25,50	-48,82	10	8,58	8,87	9,21	9,58	10,02	10,53	11,16	11,97	13,12	15,08
NOVA CANTU	-24,67	-52,57	540	4,42	4,62	4,84	5,09	5,38	5,72	6,13	6,67	7,43	8,72
PALMAS	-26,48	-51,98	1100	-0,09	0,11	0,32	0,57	0,85	1,18	1,59	2,12	2,86	4,13
PALOTINA	-24,30	-53,92	310	2,79	3,02	3,27	3,56	3,90	4,30	4,78	5,41	6,30	7,81
PARANÁVAI	-23,08	-52,43	480	6,79	7,03	7,28	7,58	7,91	8,31	8,80	9,43	10,32	11,84
PATO BRANCO	-26,12	-52,68	700	2,84	3,01	3,19	3,39	3,63	3,91	4,26	4,70	5,33	6,39
PINHAIS	-25,42	-49,13	930	2,40	2,62	2,88	3,16	3,49	3,88	4,36	4,97	5,84	7,32
PLANALTO	-25,70	-53,78	400	4,38	4,62	4,87	5,17	5,50	5,90	6,39	7,02	7,91	9,43
PONTA GROSSA	-25,22	-50,02	880	2,18	2,44	2,74	3,07	3,46	3,92	4,47	5,19	6,21	7,94
QUEDAS DO IGUAÇU	-25,52	-53,02	513	4,73	4,91	5,10	5,33	5,59	5,89	6,27	6,75	7,43	8,60
SÃO MIGUEL DO IGUA	-25,43	-54,37	260	4,70	4,82	4,95	5,09	5,26	5,46	5,70	6,01	6,45	7,21
TELEMACO BORBA	-24,33	-50,62	768	2,34	2,57	2,83	3,13	3,47	3,88	4,37	5,01	5,92	7,46
UMUARAMA	-23,73	-53,28	480	6,75	6,97	7,22	7,51	7,84	8,23	8,70	9,32	10,19	11,67

**Tabela 6.4.** Estações meteorológicas utilizadas, especificando latitude (Lat) e longitude (Lon) em décimos de graus, altitude (Alt) (m) e temperaturas mínimas (°C) estimadas com diferentes níveis de probabilidade. Mês de Junho.

ESTAÇÃO	Lat	Lon	Alt	P100	P90	P80	P70	P60	P50	P40	P30	P20	P10
ANTONINA	-25,22	-48,80	60	4,96	5,18	5,43	5,71	6,04	6,43	6,90	7,51	8,37	9,85
APUCARANA	-23,50	-51,53	746	4,05	4,35	4,69	5,07	5,52	6,04	6,68	7,51	8,68	10,68
BANDEIRANTES	-23,10	-50,35	440	3,76	4,08	4,44	4,84	5,30	5,85	6,53	7,39	8,62	10,71
BELA V.PARAISO	-22,95	-51,20	600	5,28	5,56	5,88	6,24	6,66	7,15	7,75	8,53	9,62	11,49
CÂNDIDO DE ABREU	-24,63	-51,25	645	2,35	2,60	2,88	3,20	3,56	4,00	4,53	5,21	6,17	7,82
CAMBARA	-23,00	-50,03	450	2,79	3,12	3,47	3,88	4,35	4,90	5,58	6,46	7,69	9,80
CASCABEL	-24,88	-53,55	660	1,88	2,12	2,39	2,70	3,06	3,48	4,00	4,67	5,61	7,22
CERRO AZUL	-24,82	-49,25	360	2,64	2,92	3,24	3,60	4,01	4,50	5,10	5,87	6,96	8,82
CIANORTE	-23,67	-52,58	530	3,37	3,63	3,91	4,24	4,62	5,07	5,61	6,32	7,31	9,01
CLEVELANDIA	-26,42	-52,35	930	-0,78	-0,58	-0,35	-0,09	0,21	0,57	1,01	1,57	2,36	3,71
FRANCISCO BELTRÃO	-26,08	-53,07	650	-0,85	-0,64	-0,40	-0,14	0,17	0,54	0,98	1,56	2,37	3,76
GUARAPUAVA	-25,38	-51,50	1026	-1,77	-1,49	-1,17	-0,80	-0,38	0,11	0,72	1,50	2,60	4,48
GUARÄQUEÇABA	-25,27	-48,53	40	4,61	4,85	5,13	5,43	5,79	6,21	6,73	7,39	8,33	9,93
IBIPORA	-23,27	-51,02	484	4,87	5,17	5,50	5,87	6,30	6,81	7,44	8,24	9,38	11,31
IRATI	-25,45	-50,58	893	-0,36	-0,11	0,18	0,51	0,89	1,33	1,88	2,58	3,57	5,27
JOAQUIM TAVORA	-23,50	-49,95	512	2,38	2,66	2,97	3,32	3,73	4,21	4,80	5,56	6,63	8,46
LAPA	-25,78	-49,77	910	0,15	0,44	0,76	1,13	1,55	2,05	2,66	3,45	4,56	6,47
LARANJEIRAS DO SUL	-25,42	-52,42	880	0,73	0,95	1,21	1,50	1,84	2,23	2,72	3,35	4,23	5,74
LONDRINA	-23,37	-51,17	585	3,38	3,67	3,99	4,35	4,77	5,26	5,87	6,65	7,75	9,63
MORRETES	-25,50	-48,82	10	6,22	6,44	6,70	6,98	7,32	7,71	8,19	8,81	9,68	11,18
NOVA CANTU	-24,67	-52,57	540	1,77	1,97	2,21	2,47	2,78	3,14	3,58	4,15	4,95	6,32
PALMAS	-26,48	-51,98	1100	-2,33	-2,06	-1,76	-1,43	-1,04	-0,57	-0,01	0,72	1,74	3,50
PALOTINA	-24,30	-53,92	310	0,13	0,43	0,76	1,13	1,57	2,08	2,71	3,51	4,65	6,60
PARANÁVAI	-23,08	-52,43	480	4,43	4,70	5,01	5,36	5,76	6,23	6,81	7,56	8,62	10,42
PATO BRANCO	-26,12	-52,68	700	0,08	0,33	0,60	0,90	1,26	1,67	2,19	2,85	3,78	5,37
PINHAIS	-25,42	-49,13	930	-0,82	-0,62	-0,38	-0,12	0,18	0,54	0,98	1,54	2,34	3,70
PLANALTO	-25,70	-53,78	400	2,06	2,30	2,57	2,88	3,23	3,65	4,17	4,83	5,76	7,36
PONTA GROSSA	-25,22	-50,02	880	-0,24	0,03	0,34	0,69	1,09	1,56	2,14	2,89	3,94	5,74
QUEDAS DO IGUAÇU	-25,52	-53,02	513	2,20	2,43	2,69	2,98	3,32	3,73	4,22	4,85	5,75	7,28
SÃO MIGUEL DO IGUA	-25,43	-54,37	260	2,16	2,41	2,69	3,01	3,38	3,81	4,34	5,02	5,98	7,63
TELEMACO BORBA	-24,33	-50,62	768	0,20	0,44	0,72	1,02	1,38	1,80	2,31	2,97	3,91	5,51
UMUARAMA	-23,73	-53,28	480	4,51	4,77	5,06	5,39	5,77	6,22	6,77	7,48	8,48	10,19

**Tabela 6.5.** Estações meteorológicas utilizadas, especificando latitude (Lat) e longitude (Lon) em décimos de graus, altitude (Alt) (m) e temperaturas mínimas (°C) estimadas com diferentes níveis de probabilidade. Mês de Julho.

ESTAÇÃO	Lat	Lon	Alt	P100	P90	P80	P70	P60	P50	P40	P30	P20	P10
ANTONINA	-25,22	-48,80	60	4,91	5,13	5,38	5,66	5,99	6,37	6,84	7,45	8,31	9,77
APUCARANA	-23,50	-51,53	746	3,57	3,90	4,26	4,68	5,15	5,72	6,41	7,30	8,55	10,70
BANDEIRANTES	-23,10	-50,35	440	4,00	4,31	4,65	5,03	5,48	6,01	6,65	7,48	8,66	10,66
BELA V.PARAÍSO	-22,95	-51,20	600	5,06	5,37	5,72	6,12	6,57	7,12	7,78	8,64	9,84	11,90
CÂNDIDO DE ABREU	-24,63	-51,25	645	1,49	1,72	1,97	2,27	2,60	3,00	3,49	4,12	5,00	6,52
CAMBARÁ	-23,00	-50,03	450	2,55	2,87	3,23	3,63	4,10	4,65	5,32	6,19	7,41	9,50
CASCAVEL	-24,88	-53,55	660	0,78	1,05	1,35	1,68	2,08	2,54	3,11	3,84	4,87	6,63
CERRO AZUL	-24,82	-49,25	360	2,54	2,80	3,10	3,43	3,82	4,27	4,83	5,55	6,57	8,30
CIANORTE	-23,67	-52,58	530	3,15	3,39	3,67	3,98	4,34	4,76	5,28	5,95	6,89	8,50
CLEVELÂNDIA	-26,42	-52,35	930	-1,78	-1,55	-1,29	-1,00	-0,66	-0,26	0,22	0,85	1,74	3,25
FRANCISCO BELTRÃO	-26,08	-53,07	650	-0,50	-0,31	-0,09	0,16	0,44	0,78	1,19	1,73	2,47	3,76
GUARAPUAVA	-25,38	-51,50	1026	-2,13	-1,87	-1,58	-1,26	-0,88	-0,44	0,11	0,81	1,80	3,49
GUARÁQUECABA	-25,27	-48,53	40	4,54	4,81	5,10	5,44	5,83	6,29	6,85	7,57	8,59	10,34
IBIPORÁ	-23,27	-51,02	484	4,87	5,14	5,44	5,78	6,18	6,65	7,22	7,96	9,01	10,79
IRATI	-25,45	-50,58	893	-0,64	-0,41	-0,16	0,12	0,45	0,84	1,31	1,92	2,78	4,25
JOAQUIM TÁVORA	-23,50	-49,95	512	2,49	2,81	3,16	3,57	4,03	4,58	5,25	6,11	7,33	9,41
LAPA	-25,78	-49,77	910	-0,89	-0,67	-0,43	-0,16	0,15	0,52	0,97	1,56	2,38	3,78
LARANJEIRAS DO SUL	-25,42	-52,42	880	0,44	0,60	0,77	0,97	1,19	1,46	1,79	2,21	2,81	3,83
LONDRINA	-23,37	-51,17	585	3,57	3,86	4,18	4,55	4,97	5,47	6,08	6,87	7,98	9,87
MORRETES	-25,50	-48,82	10	5,86	6,11	6,40	6,72	7,10	7,54	8,08	8,78	9,77	11,45
NOVA CANTU	-24,67	-52,57	540	1,31	1,54	1,80	2,09	2,43	2,83	3,31	3,94	4,83	6,34
PALMAS	-26,48	-51,98	1100	-2,49	-2,30	-2,09	-1,85	-1,57	-1,25	-0,84	-0,33	0,40	1,65
PALOTINA	-24,30	-53,92	310	-0,56	-0,30	-0,01	0,32	0,70	1,14	1,69	2,40	3,40	5,11
PARANÁVAÍ	-23,08	-52,43	480	4,04	4,35	4,69	5,08	5,52	6,05	6,70	7,53	8,71	10,71
PATO BRANCO	-26,12	-52,68	700	-0,15	0,01	0,20	0,41	0,65	0,94	1,29	1,75	2,39	3,48
PINHAIS	-25,42	-49,13	930	-0,16	0,04	0,27	0,54	0,84	1,19	1,63	2,19	2,98	4,34
PLANALTO	-25,70	-53,78	400	1,43	1,67	1,95	2,26	2,62	3,04	3,56	4,23	5,18	6,79
PONTA GROSSA	-25,22	-50,02	880	-0,27	-0,02	0,25	0,57	0,93	1,36	1,88	2,56	3,51	5,14
QUEDAS DO IGUAÇU	-25,52	-53,02	513	1,38	1,60	1,84	2,12	2,43	2,81	3,27	3,86	4,69	6,12
SÃO MIGUEL DO IGUAÇU	-25,43	-54,37	260	1,13	1,33	1,56	1,83	2,13	2,48	2,92	3,48	4,27	5,63
TELÊMACO BORBA	-24,33	-50,62	768	0,16	0,42	0,72	1,06	1,45	1,91	2,47	3,20	4,22	5,97
UMUARAMA	-23,73	-53,28	480	3,66	3,94	4,26	4,62	5,03	5,52	6,11	6,89	7,97	9,83

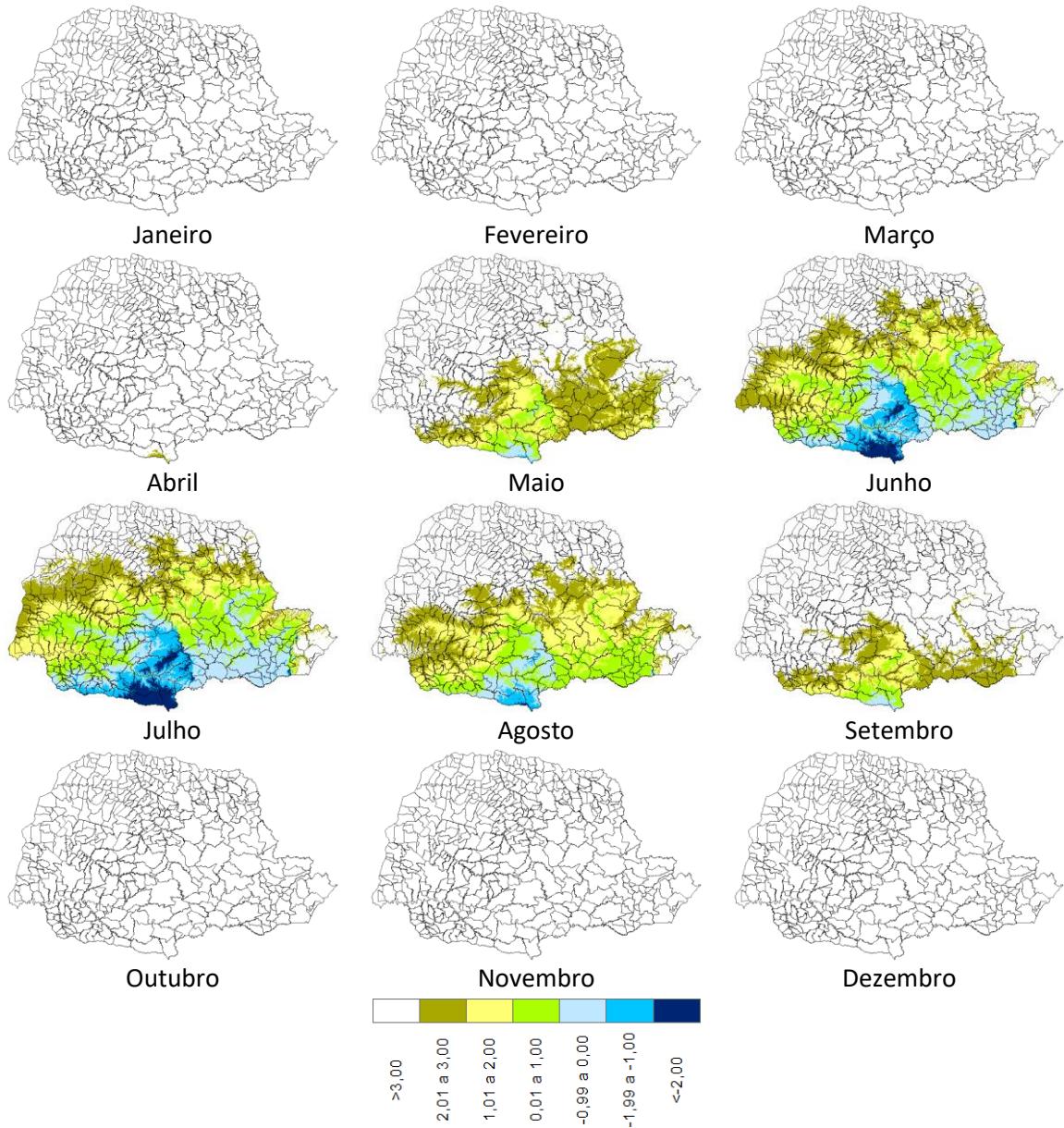
**Tabela 6.6.** Estações meteorológicas utilizadas, especificando latitude (Lat) e longitude (Lon) em décimos de graus, altitude (Alt) (m) e temperaturas mínimas (°C) estimadas com diferentes níveis de probabilidade. Mês de Agosto.

ESTAÇÃO	Lat	Lon	Alt	P100	P90	P80	P70	P60	P50	P40	P30	P20	P10
ANTONINA	-25,22	-48,80	60	5,40	5,61	5,85	6,12	6,43	6,80	7,25	7,83	8,65	10,05
APUCARANA	-23,50	-51,53	746	4,78	5,08	5,43	5,82	6,27	6,80	7,46	8,30	9,48	11,51
BANDEIRANTES	-23,10	-50,35	440	5,21	5,53	5,89	6,29	6,75	7,30	7,97	8,83	10,05	12,13
BELA V.PARAISO	-22,95	-51,20	600	5,86	6,13	6,44	6,78	7,18	7,65	8,23	8,97	10,02	11,81
CÂNDIDO DE ABREU	-24,63	-51,25	645	3,37	3,67	4,00	4,39	4,83	5,35	5,98	6,81	7,96	9,94
CAMBARA	-23,00	-50,03	450	4,22	4,49	4,80	5,15	5,55	6,03	6,61	7,36	8,42	10,23
CASCAVEL	-24,88	-53,55	660	2,68	2,94	3,23	3,57	3,95	4,41	4,97	5,69	6,70	8,44
CERRO AZUL	-24,82	-49,25	360	3,09	3,31	3,55	3,82	4,13	4,50	4,95	5,53	6,36	7,76
CIANORTE	-23,67	-52,58	530	4,31	4,65	5,03	5,46	5,96	6,54	7,26	8,19	9,50	11,74
CLEVELANDIA	-26,42	-52,35	930	-0,18	0,07	0,34	0,65	1,01	1,43	1,95	2,61	3,55	5,16
FRANCISCO BELTRÃO	-26,08	-53,07	650	0,51	0,77	1,06	1,39	1,77	2,22	2,77	3,48	4,48	6,19
GUARAPUAVA	-25,38	-51,50	1026	-0,28	0,03	0,37	0,75	1,20	1,72	2,37	3,20	4,37	6,37
GUARQUEÇABA	-25,27	-48,53	40	5,46	5,70	5,97	6,28	6,63	7,05	7,56	8,22	9,15	10,74
IBIPORA	-23,27	-51,02	484	5,88	6,16	6,48	6,83	7,25	7,73	8,33	9,10	10,18	12,03
IRATI	-25,45	-50,58	893	0,89	1,16	1,47	1,82	2,23	2,71	3,29	4,05	5,11	6,94
JOAQUIM TAVORA	-23,50	-49,95	512	3,94	4,26	4,61	5,01	5,47	6,02	6,69	7,55	8,77	10,85
LAPA	-25,78	-49,77	910	0,28	0,55	0,84	1,18	1,57	2,03	2,60	3,32	4,35	6,10
LARANJEIRAS DO SUL	-25,42	-52,42	880	1,43	1,66	1,92	2,21	2,55	2,95	3,44	4,08	4,97	6,49
LONDRINA	-23,37	-51,17	585	4,64	4,95	5,29	5,68	6,13	6,66	7,31	8,15	9,33	11,35
MORRETES	-25,50	-48,82	10	6,02	6,31	6,64	7,01	7,44	7,95	8,57	9,38	10,51	12,44
NOVA CANTU	-24,67	-52,57	540	3,10	3,36	3,66	3,99	4,38	4,83	5,39	6,11	7,13	8,87
PALMAS	-26,48	-51,98	1100	-0,81	-0,63	-0,43	-0,20	0,06	0,37	0,75	1,24	1,93	3,11
PALOTINA	-24,30	-53,92	310	0,54	0,82	1,14	1,49	1,90	2,39	2,99	3,76	4,84	6,70
PARANAVAI	-23,08	-52,43	480	5,04	5,41	5,83	6,30	6,85	7,50	8,29	9,30	10,74	13,19
PATO BRANCO	-26,12	-52,68	700	1,74	1,90	2,07	2,26	2,49	2,75	3,08	3,50	4,09	5,10
PINHAIS	-25,42	-49,13	930	0,18	0,44	0,73	1,07	1,45	1,90	2,46	3,17	4,18	5,91
PLANALTO	-25,70	-53,78	400	3,03	3,33	3,68	4,07	4,51	5,04	5,69	6,53	7,71	9,73
PONTA GROSSA	-25,22	-50,02	880	0,72	1,03	1,38	1,77	2,22	2,76	3,41	4,26	5,44	7,48
QUEDAS DO IGUAÇU	-25,52	-53,02	513	2,79	3,06	3,35	3,69	4,08	4,53	5,09	5,81	6,83	8,57
SÃO MIGUEL DO IGUA	-25,43	-54,37	260	2,79	3,03	3,29	3,59	3,93	4,34	4,83	5,47	6,38	7,92
TELEMACO BORBA	-24,33	-50,62	768	0,96	1,21	1,49	1,81	2,18	2,61	3,15	3,84	4,81	6,47
UMUARAMA	-23,73	-53,28	480	5,20	5,52	5,89	6,31	6,79	7,36	8,05	8,95	10,21	12,37

**Tabela 6.7.** Estações meteorológicas utilizadas, especificando latitude (Lat) e longitude (Lon) em décimos de graus, altitude (Alt) (m) e temperaturas mínimas (°C) estimadas com diferentes níveis de probabilidade. Mês de Setembro.

ESTAÇÃO	Lat	Lon	Alt	P100	P90	P80	P70	P60	P50	P40	P30	P20	P10
ANTONINA	-25,22	-48,80	60	7,61	7,79	8,00	8,23	8,50	8,81	9,20	9,70	10,40	11,60
APUCARANA	-23,50	-51,53	746	6,90	7,14	7,41	7,70	8,05	8,46	8,96	9,61	10,52	12,07
BANDEIRANTES	-23,10	-50,35	440	8,88	9,08	9,31	9,57	9,88	10,23	10,67	11,23	12,03	13,38
BELA V.PARAISO	-22,95	-51,20	600	8,16	8,38	8,63	8,90	9,22	9,60	10,06	10,66	11,50	12,93
CÂNDIDO DE ABREU	-24,63	-51,25	645	5,39	5,59	5,80	6,04	6,32	6,65	7,06	7,58	8,31	9,57
CAMBARA	-23,00	-50,03	450	7,79	8,03	8,29	8,59	8,93	9,34	9,84	10,48	11,39	12,94
CASCABEL	-24,88	-53,55	660	3,91	4,17	4,46	4,78	5,16	5,61	6,15	6,86	7,85	9,54
CERRO AZUL	-24,82	-49,25	360	5,41	5,60	5,81	6,05	6,33	6,65	7,05	7,57	8,30	9,54
CIANORTE	-23,67	-52,58	530	6,55	6,85	7,20	7,58	8,03	8,56	9,21	10,04	11,22	13,23
CLEVELANDIA	-26,42	-52,35	930	1,02	1,28	1,58	1,92	2,31	2,78	3,34	4,07	5,10	6,87
FRANCISCO BELTRÃO	-26,08	-53,07	650	2,71	2,89	3,10	3,34	3,61	3,93	4,33	4,84	5,56	6,79
GUARAPUAVA	-25,38	-51,50	1026	1,11	1,38	1,67	2,00	2,39	2,84	3,39	4,11	5,12	6,85
GUARÁQUECABA	-25,27	-48,53	40	8,10	8,29	8,51	8,75	9,04	9,37	9,78	10,31	11,06	12,34
IBIPORA	-23,27	-51,02	484	8,47	8,71	8,98	9,29	9,64	10,05	10,56	11,22	12,15	13,73
IRATI	-25,45	-50,58	893	2,99	3,20	3,43	3,70	4,01	4,38	4,83	5,40	6,22	7,61
JOAQUIM TAVORA	-23,50	-49,95	512	7,41	7,66	7,94	8,26	8,62	9,05	9,58	10,27	11,23	12,87
LAPA	-25,78	-49,77	910	2,60	2,80	3,03	3,29	3,59	3,94	4,37	4,92	5,71	7,04
LARANJEIRAS DO SUL	-25,42	-52,42	880	3,02	3,21	3,43	3,68	3,96	4,30	4,71	5,24	5,99	7,27
LONDRINA	-23,37	-51,17	585	7,26	7,49	7,75	8,05	8,39	8,79	9,28	9,92	10,82	12,35
MORRETES	-25,50	-48,82	10	8,73	8,94	9,19	9,46	9,78	10,16	10,62	11,21	12,05	13,48
NOVA CANTU	-24,67	-52,57	540	4,98	5,20	5,45	5,73	6,06	6,44	6,91	7,52	8,38	9,84
PALMAS	-26,48	-51,98	1100	-0,17	0,05	0,30	0,59	0,92	1,31	1,78	2,39	3,26	4,74
PALOTINA	-24,30	-53,92	310	3,30	3,58	3,89	4,24	4,64	5,12	5,70	6,45	7,51	9,33
PARANÁVAI	-23,08	-52,43	480	7,43	7,71	8,02	8,37	8,78	9,26	9,84	10,60	11,67	13,50
PATO BRANCO	-26,12	-52,68	700	2,45	2,64	2,86	3,11	3,39	3,72	4,13	4,66	5,41	6,68
PINHAIS	-25,42	-49,13	930	3,90	4,08	4,29	4,53	4,80	5,12	5,52	6,03	6,74	7,97
PLANALTO	-25,70	-53,78	400	5,08	5,31	5,57	5,86	6,20	6,60	7,09	7,71	8,60	10,11
PONTA GROSSA	-25,22	-50,02	880	3,18	3,40	3,65	3,93	4,25	4,63	5,09	5,69	6,54	7,99
QUEDAS DO IGUAÇU	-25,52	-53,02	513	4,49	4,70	4,93	5,19	5,50	5,86	6,30	6,87	7,67	9,03
SÃO MIGUEL DO IGUA	-25,43	-54,37	260	4,61	4,84	5,09	5,38	5,71	6,10	6,58	7,19	8,06	9,55
TELEMACO BORBA	-24,33	-50,62	768	3,42	3,63	3,86	4,13	4,44	4,80	5,25	5,82	6,63	8,01
UMUARAMA	-23,73	-53,28	480	7,18	7,46	7,77	8,13	8,54	9,02	9,61	10,38	11,45	13,30

A Figura 6.1 mostra a distribuição espacial do risco de ocorrência de geadas com diferentes intensidades no Estado do Paraná, para o nível de 100% de probabilidade (P100). Temperaturas mínimas acima de 3°C podem ou não estar associadas a geadas de fraca intensidade, que normalmente ocorrem em áreas de baixada, em terrenos com dificuldade de escoamento do ar frio noturno. Temperaturas mínimas inferiores a 3°C em geral causam geadas de diferentes intensidades. A presença de calmaria acentua a inversão térmica próximo ao solo, causando gradientes que fazem com que a temperatura na superfície seja negativa mesmo quando os valores no abrigo são acima de 0°C (SENTELHAS et al., 1995; GRODZKI et al., 1996; ROSISCA et al., 2015).



**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.

De uma maneira geral é possível classificar as geadas de acordo com sua intensidade associadas às temperaturas mínimas de abrigo, da seguinte maneira:

**Geadas fracas:**  $4^{\circ}\text{C} < T_{\text{min}} > 2^{\circ}\text{C}$  – causam danos em espécies mais sensíveis localizadas em fundos de vale ou terrenos com dificuldade de escoamento do ar frio.

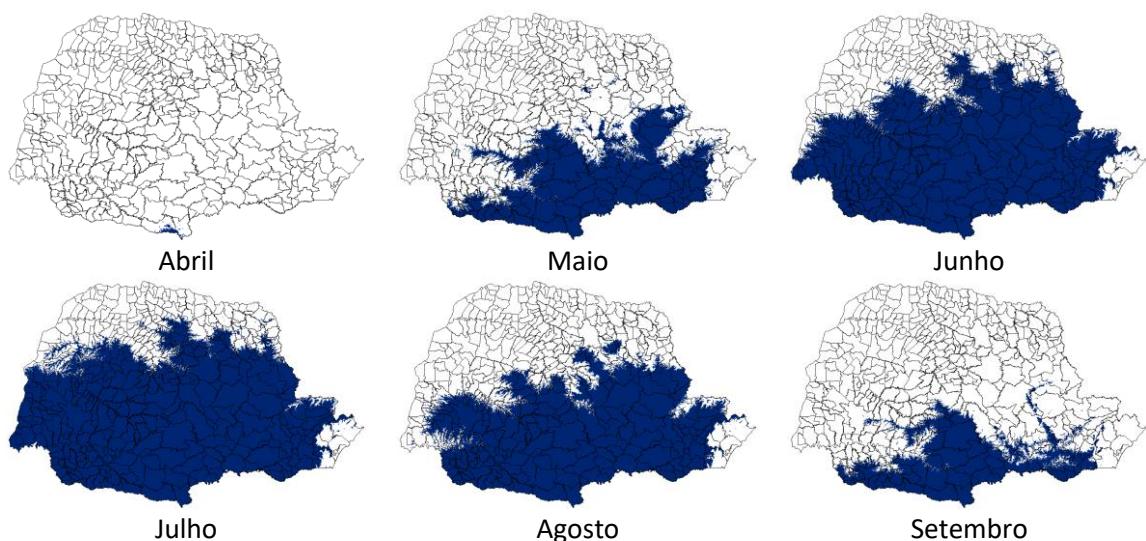
**Geadas moderadas:**  $2^{\circ}\text{C} < T_{\text{min}} > 0^{\circ}\text{C}$  – causam danos mais severos em fundos de vale e áreas com retenção de ar frio, e danos fracos a moderados nas partes mais altas, dependendo da sensibilidade das espécies.

**Geadas severas:**  $0^{\circ}\text{C} < T_{\text{min}} < -2^{\circ}\text{C}$  – causam danos generalizados, podendo levar à morte os cultivos, dependendo da sensibilidade das espécies.

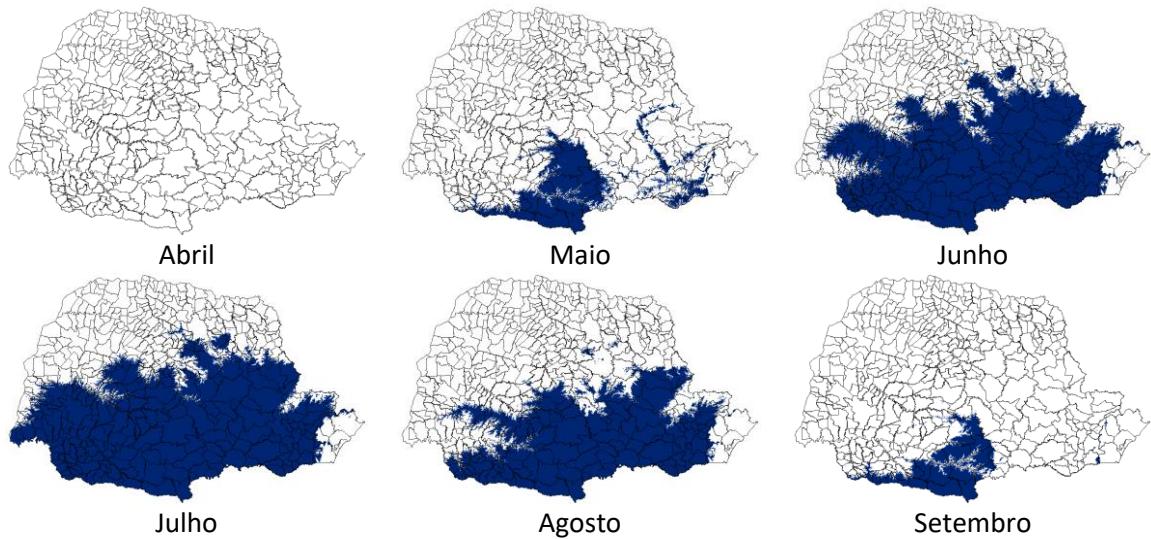
**Geadas severíssimas:**  $T_{\text{min}} < -2^{\circ}\text{C}$  – causam danos severos e de grande extensão, provocando prejuízos generalizados às atividades agrícolas e pecuárias.

Esses limites de temperaturas mínimas podem sofrer alterações na expressão do dano de acordo com as condições atmosféricas locais, mas para fins de risco espelham adequadamente o regime de geadas de uma região.

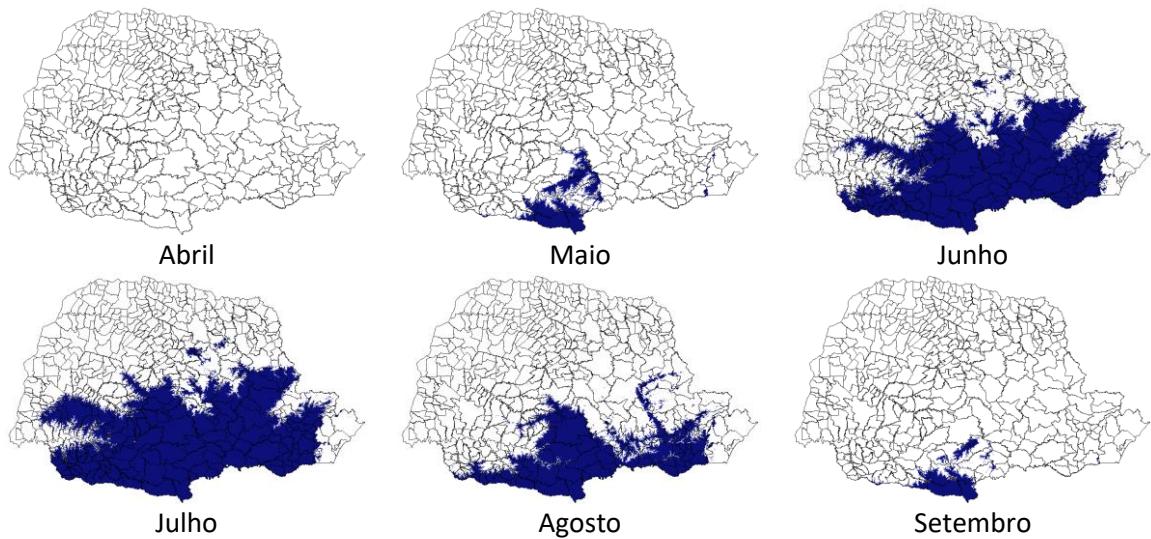
As Figuras 6.2 a 6.7 apresentam as regiões com riscos de ocorrerem temperaturas mínimas de abrigo abaixo de 3, 2, 1, 0, -1 e  $-2^{\circ}\text{C}$  para o estado do Paraná. Admitindo-se um gradiente médio de  $4^{\circ}\text{C}$  entre o abrigo e a relva (SENTELHAS et al., 1995; ROSISCA et al., 2015), essas temperaturas correspondem a aproximadamente -1, -2, -3, -4, -5 e  $-6^{\circ}\text{C}$ . Assim, de acordo com o nível de tolerância de cada espécie, é possível delimitar o período e as regiões livres de riscos de geadas. Caramori et al. (2001b) mapearam a ocorrência de temperaturas mínimas prováveis inferiores a  $3^{\circ}\text{C}$  no abrigo, para subsidiar o zoneamento da cultura do feijoeiro no Paraná. Wrege et al. (2005) mapearam as probabilidades de ocorrência de geadas com temperaturas mínimas mensais de abrigo inferiores a  $3^{\circ}\text{C}$ , as quais foram utilizadas para elaborar o zoneamento da cana-de-açúcar no Paraná.



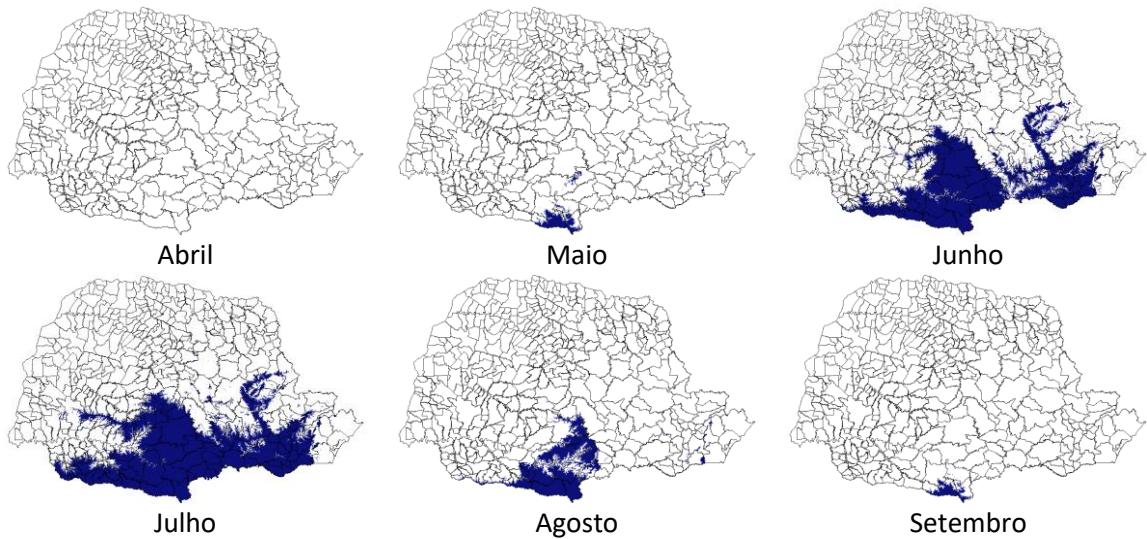
**Figura 6.2.** Temperaturas mínimas no abrigo inferiores a  $3^{\circ}\text{C}$ , mostradas em azul, no período de abril a setembro, para o estado do Paraná.



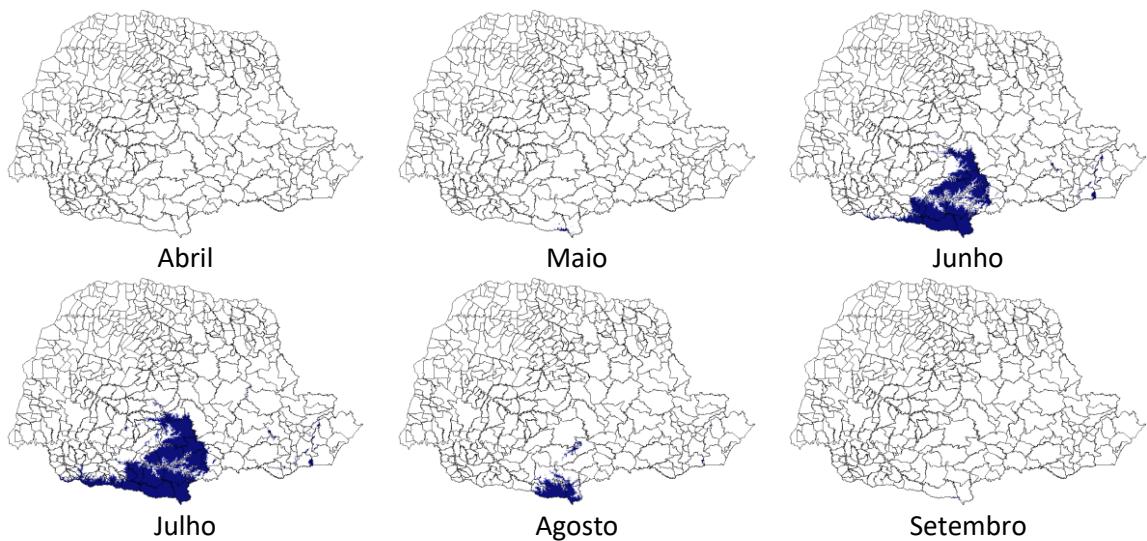
**Figura 6.3.** Temperaturas mínimas no abrigo inferiores a 2°C, mostradas em azul, no período de abril a setembro, para o estado do Paraná.



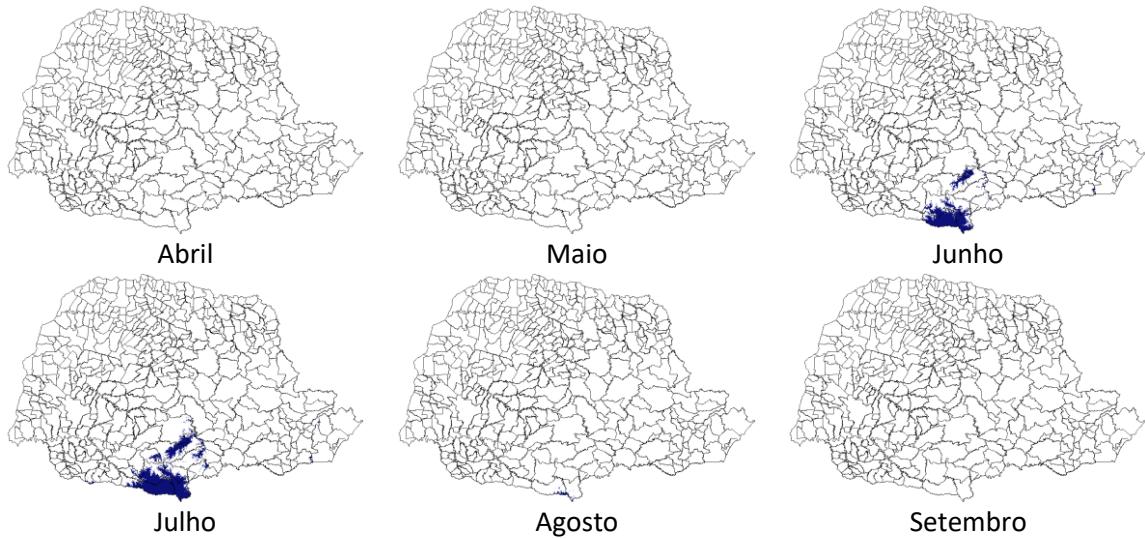
**Figura 6.4.** Temperaturas mínimas no abrigo inferiores a 1°C, mostradas em azul, no período de abril a setembro, para o estado do Paraná.



**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.



**Figura 6.6.** Temperaturas mínimas no abrigo inferiores a  $-1^{\circ}\text{C}$ , mostradas em azul, no período de abril a setembro, para o estado do Paraná.



**Figura 6.7.** Temperaturas mínimas no abrigo inferiores a  $-2^{\circ}\text{C}$ , mostradas em azul, no período de abril a setembro, para o estado do Paraná.

A ocorrência de geadas durante o ano determina a estação de crescimento (WREGE et al., 2004), de acordo com o nível de sensibilidade de cada espécie.

Nos capítulos anteriores desta tese, os testes de tolerância ao frio indicaram as seguintes temperaturas críticas para cada uma das espécies avaliadas: Milheto e Sorgo  $-1,8^{\circ}\text{C}$ ; 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  $-6,2^{\circ}\text{C}$ . Considerando-se um gradiente médio de temperatura mínima entre relva e abrigo de  $4^{\circ}\text{C}$  em noites de geada (SENTELHAS et al., 1995; ROSISCA et al., 2015), pode-se confrontar essas temperaturas críticas com os riscos apresentados nas figuras 6.2 a 6.7 e identificar as áreas e períodos que devem ser evitados para cada espécie. De uma maneira geral, o estado do Paraná não apresenta restrições ao plantio do Tifton 85. A Alfafa possui restrições somente no extremo sul nos meses de junho, julho e agosto (Figuras 6.6 e 6.7). Aveia Preta, Marandu e Mombaça têm riscos de maio a setembro em áreas da região sul do estado (Figura 6.4 e 6.5). Milheto e Sorgo têm riscos a partir de maio, se estendendo por praticamente toda a região de clima Cfb (CAVIGLIONE et al., 2000; WREGE et al., 2011) nos meses de junho e julho e reduzindo o risco em agosto e setembro (Figuras 6.2 e 6.3).

Deve-se ressaltar que neste trabalho não foram avaliadas as recuperações das espécies após os testes de baixas temperaturas.

## 6.4 CONCLUSÕES

As temperaturas mínimas de abrigo mostraram ajuste adequado à distribuição de extremos considerando as variáveis altitude, latitude e longitude. O mapeamento detalhado de riscos de geadas com diferentes intensidades possibilitou identificar os períodos de uso das espécies avaliadas no estado do Paraná.

## REFERÊNCIAS

ASSIS, F.N. de ARRUDA, H.V. de PEREIRA, A.R. Aplicações de estatística a climatologia: teoria e prática. Pelotas: Universitária, 1996. 160 p.

CARAMORI, P. H.; CAVIGLIONE, J. H.; WREGE, M. S.; GONÇALVES, S. L.; FARIA, R. T.; ANDROCIOLI FILHO, A.; SERA, T.; CHAVES, J. C. D.; KOGUISHI, M. S. Zoneamento de riscos climáticos para a cultura do café (*Coffea arabica* L.) no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Passo Fundo, v. 9, n. 3, p. 486-494, 2001a.

CARAMORI, P. H.; GONÇALVES, S. L.; WREGE, M. S.; CAVIGLIONE, J. H.; OLIVEIRA, D.; FARIA, R. T.; LOLLATTO, M. A.; MARIOT, E. J.; KRANZ, W. M.; PARRA, M. S.; BIANCHINI, A. Zoneamento de riscos climáticos e definição de datas de semeadura para o feijão no Paraná. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Passo Fundo, v. 9, n. 3, p. 477-485, 2001b.

CAVIGLIONE, J. H.; KIIHL, L. R. B.; CARAMORI, P. H.; OLIVEIRA, D. **Cartas climáticas do Paraná**. Londrina: IAPAR, 2000. CD.

FARR, T. G.; KOBRECK, M. Shuttle radar topography mission produces a wealth of data. **American Geophysical Union Eos**, Washington, v. 81, p. 583-585, 2000.

FARR, T.G.; ROSEN, P.A.; CARO, E.; CRIPPEN, R.; DUREN, R.; HENSLEY, S.; KOBRECK, M.; PALLER, M.; RODRIGUEZ, E.; ROTH, L.; SEAL, D.; SHAFFER, S.; SHIMADA, J.; UMLAND, J.; WERNER, M.; OSKIN, M.; BURBANK, D.; ALSDORF, D. The shuttle radar topography mission. **Reviews of Geophysics**, Hoboken, v. 45, 2007.

GRODZKI, L.; CARAMORI, P.H.; BOOTSMA, A. Riscos de ocorrência de geada no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v.4, n.1, p.93-99, 1996.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 2000. 531 p.

ROSISCA, J. R.; COSTA A. B. F.; ZARO, G. C.; CARAMORI, P. H.; SILVA, M. A. A. Temperature gradient between shelter and grass in nights with frost. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CLIMATOLOGIA, 6, 2015, Natal. **Anais...** Natal: [S.n.], 2015.

Disponível em: <http://www.sbmet.org.br/portal/sbmet/detalhe.php?id=45>. Acesso em 15 dez 2016.

SENTELHAS, P. C.; ORTOLANI, A. A.; PEZZOPANE, J. R. M. Diferença de temperatura entre abrigo meteorológico e a relva, em noites de geada, no Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v. 54, n. 2 p. 437-445, 1995.

THOM, H. C. S. **Some methods of climatological analysis**. Geneva: World Meteorological Organization, 1966. 53 p. WMO, 199; TP, 103; Technical note, 81.

WREGE, M. S.; CARAMORI, P. H.; GONCALVES, A. C. A.; CAVIGLIONE, J. H.; GONÇALVES, S. L.; FERREIRA, R. C. Ocorrência da primeira geada de outono e última de primavera no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 12, n. 1, p. 143-150, 2004.

WREGE, M. S.; CARAMORI, P. H.; GONÇALVES, A. C. A.; BERTONHA, A.; FERREIRA, R. C.; CAVIGLIONE, J. H.; FARIA, R. T. DE; FREITAS, P. S. L. DE; GONÇALVES, S. L. Regiões potenciais para cultivo da cana-de-açúcar no Paraná, com base na análise do risco de geadas. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 13, p. 113-122, 2005.

WREGE, M.S.; STEINMETZ, S.; REISSER JUNIOR, C.; ALMEIDA, I. R. (Ed.). **Atlas climático da Região Sul do Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; Colombo: Embrapa Florestas, 2011. 336 p.

## 7 CONCLUSÃO GERAL

As metodologias utilizadas nesta tese possibilitaram identificar de forma quantitativa as temperaturas mínimas de início de danos nas forrageiras avaliadas. De acordo com os critérios quantitativos baseados em condutividade elétrica da solução embebida com discos de folhas pós-teste, fluorescência da clorofila e atividade enzimática, foram identificadas as seguintes temperaturas a partir das quais se iniciaram os danos: Sorgo e Milheto -1,8°C; Marandu e Mombaça -2,7°C; Aveia Preta -4,1°C, Alfafa -4,6°C e Tifton 85 sem danos até -6,2°C. A análise da anatomia das folhas das espécies estudadas após os testes permitiu confirmar os resultados apresentados pelos três métodos de avaliação de tolerância ao frio.

A disponibilidade de séries históricas de temperaturas mínimas possibilitou o mapeamento dos riscos de ocorrência desses valores críticos no Paraná, bem como delimitar o período do ano de baixo risco de danos para essas espécies.