

Verificou-se mudanças na plasticidade das plântulas e no seu desenvolvimento e tipo de raiz.

Ao final do ensaio, aos 30 dias, as brotações de *Eucalyptus* estavam enraizadas, rustificadas. Os efeitos foram altamente significativos para o número, altura e MSPA das brotações, obtenção de raízes e comprimento.

Os clones H7, H8 e H9 oriundos de areias quartzozas tiveram maior sucesso, evidenciando potencial para propagação "in vitro". Torna-se interessante discutir se uma planta submetida ao "stress" guarda um potencial genético para se expressar melhor em um outro meio rico em nutrientes ou se a hipótese de que os esteróides desempenham um papel auxiliar na apreensão dos nutrientes do meio, auxilia nos determinantes fisiológicos ou, se interferem com a síntese de RNA ou DNA.

Dentre os tratamentos T1 (Mb + esteróide) foi promissor para obtenção de um maior número de brotações, enquanto que T3 (Mb + esteróide AIA) foi uma interação melhor para o enraizamento.

Níveis muito próximos de uma concentração da outra, demonstrou estatisticamente um resultado linear, sugerindo testes e análises para faixas intermediárias e mais distanciadas daquelas testadas no ensaio.

## CONCLUSÕES

A análise dos resultados permitiu as seguintes conclusões:

1. A interação de progesterona e estradiol na presença de AIA, evidenciou efeitos altamente significativos no alongamento e enraizamento dos clones;

2. O uso de esteróides progesterona e estradiol com AIA, permitiu a obtenção de plântulas rustificadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DAS, T. & MITRA, G.C. Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith. Plant Cell Tissue and Organ Culture, Dordrecht, 2:95-103, 1990.
- GENUS, J.M.C. Steroid hormones and plant growth and development. Phytochemistry, Belgium, 17:1-14, 1978.
- GONÇALVES, A.N. Reversão à juvenildade e clonagem de *E. urophylla* S.T. Blake. IN: Fast Growing Trees, IUFRO-SBS. Symposium, Águas de São Pedro, Ago, 1980, 6p.
- HELMKAMP, G. & BONNER, J. Some relationship os sterols to plantgrowth. Plant Physiol., Berlin, 28: 28-36, 1953.
- KOPCEWICZ, J. Effect of estrone on the content of endogenous gibberelins in dwarf pea. Naturwissenschaften, Stuttgart, 56: 33, 1969.
- KOPCEWICZ, J. Influence of estrogens on the flower formation in *Cichorium intybus* L. Naturwissenschaften, Stultgrd, 57:136, 1970.
- KUIPER, D. & KUIPER, J. Lipid composition on the roots of Plantage Species Response to alterations of the level of mineral nutrition and ecological significance. Physiologia Plantarium, Copenhagen, 9: 81-6, 1978.
- LESHEN, Y. Physiological effects of animal steroid and gonadotopic hormones on curd cuttings of *Basica olleracead*. Phytion, Buenos Aires, 24:25-9, 1967.
- LOVE, A & LOVE, D. Experiments of the effects of animal sex hormonies on dioecious plants. Arkiv for Botanik, Stockholm, 32A(13):1-60, 1945.
- SCHOLLER, W. & GOEBEL, H. Die wirkung des Follikelhormons und Pflanzen II. Biochemische Zeitschrift, Berlin, 251:223-8, 1932.
- STOHS, S. & ROSENBERG, H. Steroids and steroid metabolism in plant tissue cultures *Lloydia*, Pittsburg, 38(3): 181-94, 1975.

## EFEITO DO ABA (ÁCIDO ABCSÍSICO) NA RESISTÊNCIA A GEADAS DE *Eucalyptus viminalis* Labill.

ROSANA CLARA VICTORIA HIGA  
CNPFlorestas/EMBRAPA - Colombo-PR

### RESUMO

O objetivo do trabalho foi comparar o efeito da aplicação de ABA (ácido abscísico) e baixa temperatura, na rustificação de mudas de *E. viminalis*. Foram utilizadas mudas de duas procedências, COOLAH (NSW, lat. 31°45'S e alt. 610 m) e TENTERFIELD (NSW, lat. 29°03'S e alt. 1050 m). O primeiro tratamento consistiu na pulverização das mudas com uma solução aquosa de ABA (20 mg/l). No segundo tratamento, as mudas foram submetidas a uma temperatura de 2°C por 48 horas. As testemunhas foram pulverizadas com água destilada. Todas as pulverizações foram feitas 48 horas antes da avaliação da resistência, efetuada pelo método da condutividade elétrica. Os resultados mostraram que a aplicação de ABA aumentou significativamente a resistência a geadas de *E. viminalis*. Não foram observadas diferenças significativas entre as procedências.

Palavras chave: *Eucalyptus viminalis*, ABA, resistência à geadas.

### ABSTRACT

The purpose of this study was to compare the effect of applied ABA with low temperature in conditioning *Eucalyptus viminalis* seedlings to resist frost. Two provenances, COOLAH (NSW, 31°45'S; altitude 610 m) and TENTERFIELD (NSW, 29°03'S; altitude 1050 m). The first treatment used a solution of ABA (20 mg/l) in distilled water was sprayed on the seedlings. On the second treatment the seedlings were hardened for 48 hours in a cold room at an air temperature of 2°C. Distilled water was sprayed on the control seedlings. The seedlings were sprayed 48 hours before frost assesment by the electrical conductivity method. Results showed that ABA can confer frost resistance to *E. viminalis*.

Key words: *Eucalyptus viminalis*, ABA, frost resistance.

## I. INTRODUÇÃO

A ocorrência de geadas tem sido um fator limitante no aumento da área plantada com espécies do gênero *Eucalyptus*. Uma das razões é o número reduzido de espécies que combinam rápido crescimento, qualidade da madeira desejável e resistência à geadas.

O *Eucalyptus viminalis* Labill. pertence a esse pequeno grupo e por essa razão tem sido introduzido em muitos países. A espécie apresenta uma extensa área de distribuição natural, com latitude variando de 28°-43°S e altitude variando do nível do mar a 1400m. Também apresenta alta variabilidade em relação às características mencionadas acima.

Variação da resistência à geadas entre procedências dessa espécie tem sido analisada em diferentes locais. De maneira geral, procedências de eucalipto de maiores altitudes e maiores latitudes são mais resistentes à geadas. Variação de resistência à geadas em relação a altitude tem sido observada em diversas espécies como por exemplo: em *E. pauciflora* (PRYOR 1968 citado por PATON, 1972); em *E. fastigata* (SHERRY e PRYOR, 1967) em *E. regnans* (ELDRIDGE, 1969). No entanto PATON (1972) observou que a procedência do ní-

vel do mar foi tão resistente quanto a de 1000m de altitude, enquanto que a procedência de 360m foi menos resistente que ambas. Esse resultado mostra que resistência à geadas nem sempre pode ser relacionada com altitude e existe grande variabilidade em relação a essa característica. O efeito da mudança de altitude é interpretado como sendo causado pela mudança de temperatura.

Varição entre procedências de *E. viminalis* também foi observada em plantios experimentais na Flórida e na Geórgia (USA). Segundo JAHROMI (1982) as procedências de baixas altitudes foram menos resistentes à geadas do que aquelas de maiores elevações, especialmente de locais como a Tasmânia. Varição entre e dentro de procedências também foi observada na África do Sul por NIXON (1983). Não foi observado correlação negativa entre resistência à geadas e taxa de crescimento, sendo que muitas procedências testadas apresentaram um bom desempenho para ambas as características.

Resistência à geadas não é uma qualidade permanente das plantas. O grau de resistência alcançado por uma planta é o resultado da capacidade específica e das condições ambientais a que ela é submetida. Dessa forma, a capacidade de resistir a baixas temperaturas pode variar de um período do ano para outro, assim como de um dia para o outro. A magnitude dessa capacidade num determinado período de tempo determina a eficiência do processo de adaptação (LARCHER et al. 1973).

Resistência à geadas tem sido relacionada com mais frequência à características fisiológicas do que morfológicas ou anatômicas. A maioria das pesquisas nessa área tem sido feita com base na correlação do grau de resistência com alterações bioquímicas. Resultados com diferentes espécies têm mostrado que o aumento da resistência à geadas é acompanhado por um aumento na concentração de inibidores de crescimento como o ABA e uma queda na concentração de auxinas e giberilinas (LARCHER, 1983; LEVITT, 1980).

Como outros hormônios, o ABA tem múltiplos efeitos fisiológicos, afetando as plantas em todas as suas fases. Desde a sua descoberta, o ABA tem sido relacionado com uma série de aspectos fisiológicos, sendo a maioria ligado a estresse (LARCHER, 1983). Vários trabalhos relacionam aumento na concentração de ABA com aumento no grau de resistência à geadas (IRVING, 1968; PERRY e HELLMERS, 1973; RIKIN et al. 1976). Também é sugerido que ABA pode substituir a exposição de plantas a baixas temperaturas e induzir o aumento no grau de resistência (CHEN e LI, 1982).

Dada a importância do assunto, um melhor entendimento dos fatores ligados à resistência à geadas em *Eucalyptus* poderão subsidiar programas de melhoramento genético e evitar grandes danos acontecidos no passado.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da aplicação de ABA e o seu possível envolvimento na resistência à geadas de *E. viminalis*.

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Material vegetativo

Foram usadas duas procedências de *E. viminalis*: TENTERFIELD (NSW, latitude 29°03 S e altitude 1050m) e COOLAH (NSW, latitude 31°45 S e altitude 610m).

A semeadura foi feita em bandejas usando-se perlita como substrato. Estas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura variando entre 5°C e 35°C e em condições normais de luminosidade. A irrigação foi feita duas vezes ao dia e a germinação completou-se em duas semanas.

O transplante foi feito quando as mudas apresentavam dois pares de folhas. Foram usados vasos de 700ml de volume contendo uma mistura de perlita e vermiculita na proporção de 1:1. A adubação foi

feita com 1g de OSMOCOTE (ver composição química em anexo) três semanas após o transplante, quando passaram a ser irrigadas apenas uma vez ao dia. As condições foram mantidas por 16 semanas (de fevereiro a junho).

### 2. Aclimação ("rustificação")

#### a. Baixas temperaturas

As mudas foram mantidas por 48 horas numa câmara fria com temperaturas variando entre 0°C a 4°C, com média de 2°C. A duração do tratamento foi baseada nos trabalhos de PATON (1972), mostrando que esse período é suficiente para aumentar a resistência à geadas de *E. viminalis* significativamente.

#### b. Aplicação de ABA

Uma solução de ABA em água destilada na concentração de 20 mg/l foi pulverizada nas folhas das mudas de *E. viminalis* 48 horas antes da análise de resistência à geadas. As testemunhas foram pulverizadas com água destilada. A concentração de ABA usada foi baseada no trabalho de HOLUBOWICZ et al. (1982).

#### c. Avaliação da resistência à geadas

O método para avaliar resistência à geadas utilizado nesse trabalho foi o da condutividade elétrica conforme descritor por RAYMOND et al (1986). O método provou ser eficiente, apresentando a vantagem de não destruir as mudas.

O método consiste basicamente de medições da condutividade de amostras de folhas submetidas a temperaturas abaixo do ponto de congelamento e é descritor pelos autores da seguinte forma:

O equipamento usado consiste de 3 reservatórios de 12 litros cheios de uma solução de 30% etileno glicol/água nas quais suportes de acrílico com tubos de ensaio (12mm de comprimento X 75mm de altura) são suspensos. Um tanque de 100 litros com uma solução de 50% etileno glicol/água a uma temperatura de -30°C foi usado para bombear essa solução através de uma serpentina de cobre para baixar a temperatura dos reservatórios com os tubos de ensaio. A temperatura foi controlada positivamente por um "thermomix" da marca Braun.

Discos de 8mm de diâmetro foram cortados das folhas com um furador afiado e colocados nos tubos de ensaio. A temperatura dos tanques de 12 litros foi previamente regulada para 2°C, quando pequenos pedaços de gelo foram adicionados aos tubos, a fim de evitar o efeito "supercooling".

Após a adição do gelo, a temperatura foi diminuída até a mínima requerida e nela mantida por 1 hora. Os tubos foram removidos e colocados na geladeira à uma temperatura de 3°C por 24 horas. Em seguida, foram adicionados 2ml de água destilada e deionizada e deixados em temperatura ambiente por 24 horas.

A condutividade foi medida com um aparelho da marca Philips modelo PW 9501 com célula de condutividade 9515/60. Os tubos de ensaio foram então colocados numa banheira com água à 80°C por 30 minutos. Em seguida a condutividade foi novamente medida.

Dessa forma foram tomadas duas medidas de condutividade: a condutividade a temperatura desejada (ct) e a condutividade absoluta (ck) após a exposição dos discos à altas temperaturas. A condutividade foi então convertida em condutividade relativa (RC\*), calculada da seguinte forma:

$$RC^* = \frac{(ck-ct)}{ck}$$

Os valores de RC\* diminuem conforme aumenta o dano causado nos tecidos, devido ao efeito da baixa temperatura. Ambas as variáveis (ck e ct) apresentam distribuição bimodal. O valor de RC no qual 50% das plantas de *E. viminalis* são mortas por temperaturas

abaixo de 0°C foi previamente determinado e é igual a 0.8. A temperatura na qual 50% das plantas são mortas é convencionalmente chamada de Kp (derivado de "killing point").

Quatro amostras de cada muda foram submetidas a cada uma das 6 temperaturas selecionadas (-3.5°C, -4.0°C, -4.5°C, -5.0°C, -5.5°C e -6.0°C). As amostras foram coletadas de folhas completamente expandidas. Para cada muda foi calculado um valor médio de RC\* para cada temperatura testada. A interceptação entre os valores críticos de RC\* (0.8) e a curva desenhada pelas temperaturas foi considerado o Kp.

### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 1 e 2 indicam que os tratamentos usados aumentam significativamente a resistência à 'geadas nas duas procedências testadas. Embora não tenha sido estatisticamente significativo a procedência Tenterfield apresentou maior grau de resistência à geadas do que a procedência Coolah.

O grau de resistência inicial foi semelhante para as duas procedências. PATON (1982) observou resultados similares com diferentes espécies de *Eucalyptus*. O autor notou que as espécies mais resistentes apresentam o mesmo grau de resistência, mas diferem no nível final de resistência. Foi concluído que variações na capacidade de tornar-se mais resistente a geadas podem explicar a variação clinal observada entre espécies e procedências do gênero.

Embora o aumento da resistência à geadas observado após os tratamentos tenha sido relativamente pequeno, pode ser significativo em termos absolutos uma vez que pequenas alterações no Kp podem matar ou não causar qualquer dano as plantas.

Tabela 1. Efeito de baixa temperatura e aplicação de ABA na resistência à geadas (expressa em Kp / temperatura em graus centígrados) de *E. viminalis* (média de 6 mudas).

TRATAMENTO	PROCEDÊNCIA	
	COOLAH	ENTERFIELD
BAIXA TEMPERATURA	-4.18	-4.30
ABA	-4.40	-4.82
TESTEMUNHA	-3.52	-3.48
MÉDIA	-4.03	-4.20

Nesse experimento o tratamento de baixas temperaturas foi usado por apenas 48 horas. PATON (1972) demonstrou que a resistência a geadas continua a aumentar com a exposição das mudas a baixas temperaturas por um período de 5 a 10 dias.

Tabela 2. Análise de Variância (Inteiramente Casualizados) dos valores de Kp obtidos de mudas de duas procedências de *E. viminalis*.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
PROC.	1	0.2500	0.2500	1.4842
TRAT.	2	7.6517	3.8258	2.7128**
PROC.*TRAT.	2	0.3150	0.1575	0.9350
RESÍDUO	30	5.0533	0.1684	
TOTAL	35			
C.V. = 9.97 %				

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

O resultado mais importante foi o efeito da aplicação de ABA nas folhas de *E. viminalis*. Esse tratamento aumentou a resistência a geadas das mudas num período de 48 horas, ou seja, foi tão eficiente quanto baixas temperaturas. É possível que o aumento da concentração de ABA seja um dos primeiros passos no mecanismo de resistência a geadas da espécie.

Um dos maiores problemas nesse tipo de trabalho é a variabilidade observada mesmo dentro de procedências. Enquanto que para o melhorista esse fato é uma vantagem, é uma desvantagem para o estudos de fisiologia. Em trabalhos futuros recomenda-se, caso possível, o uso de clones.

### IV. CONCLUSÕES

As duas procedências de *E. viminalis* analisadas nesse trabalho apresentam variações em relação ao grau de resistência a geadas. Embora os resultados não tenham sido estatisticamente diferentes, é possível que fatores fisiológicos ou reações bioquímicas sejam diferentes nessas procedências. Também é provável que o ABA esteja envolvido no mecanismo de resistência da espécie.

O presente trabalho foi desenvolvido na Australian National University para a obtenção do título de Mestrado no período de 1987 a 1989.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEN, H.H.; LI, P.H. Potato cold acclimation. In "Plant Cold Hardiness and Freezing Stresses". V. II (eds. P.H.Li e A.Sakai). Academic Press: New York. 5-22. 1982.
- ELDRIDGE, K.G. Altitudinal Variation in *Eucalyptus regnans*. PhD Thesis, Australian National University. Canberra, 1969.
- HOLUBOWICZ, T.; PIENIAZEK, J.; KHAMIS, M.A. Modification of frost resistance of fruit plants by applied growth regulators. In "Plant Cold Hardiness and Freezing Stress". V. II (eds. P.H.Li and A.Sakai) Academic Press; New York. 541-559. 1982.
- IRVING, R. M. Characterization and role of an endogenous inhibitor in the induction of cold hardiness in *Acer negundo*. *Plant Physiology* 44, 801-805. 1968.
- JAHROMI, S.T. Variation in cold resistance and growth in *Eucalyptus viminalis*. *Southern Journal of Applied Forestry* 6 (4): 221-225. 1982.
- LARCHER, W. *Physiological Plant Ecology*. Springer Verlag, Berlin (2ª edição) 1983. 303 p.
- LARCHER, W.; HEBER, V.; SANTARIUS, K.A. Limiting Temperatures for Life Functions. In "Temperature and Life" (eds. H.Precht, J.Christophersen, H.Hensel and W. Larcher) Springer-Verlag, 197-222. 1973.
- LEVITT, J. *Responses of Plants to Environmental Stresses*. V. I. Academic Press, New York. 1980. 497 p.
- NIXON, K. M. A test of Fifteen *Eucalyptus* Species and Provenances for Frost Resistance in Natal. In "Colloque International sur les Eucalyptus Resistants and Froid". IUFRO, 1983, Bordeaux, France.
- PATON, D.M. Frost Resistance in *Eucalyptus*: A New Method for Assessment of Frost Injury in Altitudinal Provenances of *E. viminalis*. *Aust. J. Bot.* 20: 127-139. 1972.
- PATON, D.M. A mechanism for frost resistance in *Eucalyptus*. In "Plant Cold Hardiness and Freezing Stress". (eds. Paul H. Li and A. Sakai) Academic Press. 77-92. 1982.
- PERRY, T.O.; HELLMERS, H. Effects of Abscisic Acid on Growth and Dormancy of Two Races of Red Maple. *Bot. Gaz.* 134 (4): 307-312. 1973.

vel do mar foi tão resistente quanto a de 1000m de altitude, enquanto que a procedência de 360m foi menos resistente que ambas. Esse resultado mostra que resistência à geadas nem sempre pode ser relacionada com altitude e existe grande variabilidade em relação a essa característica. O efeito da mudança de altitude é interpretado como sendo causado pela mudança de temperatura.

Varição entre procedências de *E. viminalis* também foi observada em plantios experimentais na Flórida e na Georgia (USA). Segundo JAHROMI (1982) as procedências de baixas altitudes foram menos resistentes à geadas do que aquelas de maiores elevações, especialmente de locais como a Tasmânia. Variação entre e dentro de procedências também foi observada na África do Sul por NEXON (1983). Não foi observado correlação negativa entre resistência à geadas e taxa de crescimento, sendo que muitas procedências testadas apresentaram um bom desempenho para ambas as características.

Resistência à geadas não é uma qualidade permanente das plantas. O grau de resistência alcançado por uma planta é o resultado da capacidade específica e das condições ambientais a que ela é submetida. Dessa forma, a capacidade de resistir a baixas temperaturas pode variar de um período do ano para outro, assim como de um dia para o outro. A magnitude dessa capacidade num determinado período de tempo determina a eficiência do processo de adaptação (LARCHER et al. 1973).

Resistência à geadas tem sido relacionada com mais frequência à características fisiológicas do que morfológicas ou anatômicas. A maioria das pesquisas nessa área tem sido feita com base na correlação do grau de resistência com alterações bioquímicas. Resultados com diferentes espécies têm mostrado que o aumento da resistência à geadas é acompanhado por um aumento na concentração de inibidores de crescimento como o ABA e uma queda na concentração de auxinas e giberilinas (LARCHER, 1983; LEVITT, 1980).

Como outros hormônios, o ABA tem múltiplos efeitos fisiológicos, afetando as plantas em todas as suas fases. Desde a sua descoberta, o ABA tem sido relacionado com uma série de aspectos fisiológicos, sendo a maioria ligado a estresse (LARCHER, 1983). Vários trabalhos relacionam aumento na concentração de ABA com aumento no grau de resistência à geadas (IRVING, 1968; PERRY e HELLMERS, 1973; RIKIN et al. 1976). Também é sugerido que ABA pode substituir a exposição de plantas a baixas temperaturas e induzir o aumento no grau de resistência (CHEN e LI, 1982).

Dada a importância do assunto, um melhor entendimento dos fatores ligados à resistência à geadas em *Eucalyptus* poderão subsidiar programas de melhoramento genético e evitar grandes danos acontecidos no passado.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da aplicação de ABA e o seu possível envolvimento na resistência à geadas de *E. viminalis*.

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Material vegetativo

Foram usadas duas procedências de *E. viminalis*: TENTERFIELD (NSW, latitude 29°03 S e altitude 1050m) e COOLAH (NSW, latitude 31°45 S e altitude 610m).

A semeadura foi feita em bandejas usando-se perlita como substrato. Estas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura variando entre 5°C e 35°C e em condições normais de luminosidade. A irrigação foi feita duas vezes ao dia e a germinação completou-se em duas semanas.

O transplante foi feito quando as mudas apresentavam dois pares de folhas. Foram usados vasos de 700ml de volume contendo uma mistura de perlita e vermiculita na proporção de 1:1. A adubação foi

feita com 1g de OSMOCOTE (ver composição química em anexo) três semanas após o transplante, quando passaram a ser irrigadas apenas uma vez ao dia. As condições foram mantidas por 16 semanas (de fevereiro a junho).

### 2. Aclimação ("rustificação")

#### a. Baixas temperaturas

As mudas foram mantidas por 48 horas numa câmara fria com temperaturas variando entre 0°C a 4°C, com média de 2°C. A duração do tratamento foi baseada nos trabalhos de PATON (1972), mostrando que esse período é suficiente para aumentar a resistência à geadas de *E. viminalis* significativamente.

#### b. Aplicação de ABA

Uma solução de ABA em água destilada na concentração de 20 mg/l foi pulverizada nas folhas das mudas de *E. viminalis* 48 horas antes da análise de resistência à geadas. As testemunhas foram pulverizadas com água destilada. A concentração de ABA usada foi baseada no trabalho de HOLUBOWICZ et al. (1982).

#### c. Avaliação da resistência à geadas

O método para avaliar resistência à geadas utilizado nesse trabalho foi o da condutividade elétrica conforme descritor por RAYMOND et al (1986). O método provou ser eficiente, apresentando a vantagem de não destruir as mudas.

O método consiste basicamente de medições da condutividade de amostras de folhas submetidas a temperaturas abaixo do ponto de congelamento e é descritor pelos autores da seguinte forma:

O equipamento usado consiste de 3 reservatórios de 12 litros cheios de uma solução de 30% etileno glicol/água nas quais suportes de acrílico com tubos de ensaio (12mm de comprimento X 75mm de altura) são suspensos. Um tanque de 100 litros com uma solução de 50% etileno glicol/água a uma temperatura de -30°C foi usado para bombear essa solução através de uma serpentina de cobre para baixar a temperatura dos reservatórios com os tubos de ensaio. A temperatura foi controlada positivamente por um "thermomix" da marca Braun.

Discos de 8mm de diâmetro foram cortados das folhas com um furador afiado e colocados nos tubos de ensaio. A temperatura dos tanques de 12 litros foi previamente regulada para 2°C, quando pequenos pedaços de gelo foram adicionados aos tubos, a fim de evitar o efeito "supercooling".

Após a adição do gelo, a temperatura foi diminuída até a mínima requerida e nela mantida por 1 hora. Os tubos foram removidos e colocados na geladeira a uma temperatura de 3°C por 24 horas. Em seguida, foram adicionados 2ml de água destilada e deionizada e deixados em temperatura ambiente por 24 horas.

A condutividade foi medida com um aparelho da marca Philips modelo PW 9501 com célula de condutividade 9515/60. Os tubos de ensaio foram então colocados numa banheira com água a 80°C por 30 minutos. Em seguida a condutividade foi novamente medida.

Dessa forma foram tomadas duas medidas de condutividade: a condutividade a temperatura desejada (ct) e a condutividade absoluta (ck) após a exposição dos discos à altas temperaturas. A condutividade foi então convertida em condutividade relativa (RC\*), calculada da seguinte forma:

$$RC* = \frac{(ck-ct)}{ck}$$

Os valores de RC\* diminuem conforme aumenta o dano causado nos tecidos, devido ao efeito da baixa temperatura. Ambas as variáveis (ck e ct) apresentam distribuição bimodal. O valor de RC no qual 50% das plantas de *E. viminalis* são mortas por temperaturas