

PRISCILLA FÉLIX SCHNEIDER

**TOLERÂNCIA AO FRIO EM MUDAS DE ESPÉCIES DE *Eucalyptus spp.* –
ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Produção Vegetal.

Orientadora: Dra. Luciana Magda de Oliveira

**LAGES
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Félix Schneider, Priscilla

Tolerância ao frio em mudas de *Eucalyptus* spp. ?
aspectos morfológicos e bioquímicos / Priscilla Félix
Schneider. - Lages , 2018.

73 p.

Orientadora: Luciana Magda de Oliveira

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages,
2018.

1. Estresse. 2. Temperaturas negativas. 3.
Eucalipto. I. de Oliveira, Luciana Magda. II.
Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa
de Pós-Graduação. III. Título.

PRISCILLA FÉLIX SCHNEIDER

**TOLERÂNCIA AO FRIO EM MUDAS DE ESPÉCIES DE *Eucalyptus*–
ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal.

Banca Examinadora

Orientadora: 

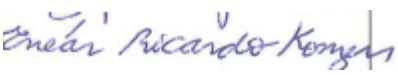
Dra. Luciana Magda de Oliveira
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro Interno: 

Dr. Márcio Carlos Navroski
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro Externo: 

Dra. Regiane Abjaud Estopa
KLABIN S.A

Membro Externo: 

Dr. Enéas Ricardo Konzen
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro Externo: 

Dr. Ezequiel Gasparin
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Lages, 30 de julho de 2018.

Dedico à minha família!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, saúde e por me guiar em todos os meus caminhos.

Aos meus pais, Ivanei Cruz Schneider e Zenaide Félix Schneider, que sempre me apoiaram nos meus estudos, com uma palavra amiga, sempre servindo de alento e incentivo.

À minha irmã, professora da UFSC, Aline Félix Schneider pela ajuda nas análises estatísticas, pelo exemplo como professora e por sempre estar disposta a me orientar.

Ao meu marido, Leonardo Muniz, meu grande amigo, amor e companheiro! Esteve ao meu lado nos momentos de tristeza, medo, alegria e nunca me deixou desanimar, pois sabia da importância do meu trabalho para mim.

Ao meu cachorro, Pepe, que é minha dose de alegre diária.

À minha família, que sempre me apoiou em todos os momentos! ´

Às irmãs Clarissas pelas orações!

À minha orientadora Profa. Luciana Magda de Oliveira pela orientação, dedicação, incentivo e paciência durante todos esses anos. Agradeço por aceitar em 2012, meu ingresso à família Sementes Florestais. Serei eternamente grata e orgulhosa por ver esse grupo crescer.

Aos colegas doutorandos pelo apoio e amizade nas disciplinas cursadas. Agradeço, principalmente, a Flávia Regina da Costa, minha parceira, comadre e amiga a quem em todos os momentos dessa caminhada esteve ao meu lado.

Aos colegas de laboratório, Alexandra, Louise, Émerson, Romell, Bruno, Maikeli e Anieli pelo auxílio e companhia em análises. Obrigada a todos pela amizade e pelos momentos divertidos que tivemos no laboratório!

Aos amigos do IFSC Janaína Muniz, Fabio Junior, Eduardo Esmério, Diogo Amarildo e Gizelli Lima pela simpatia, incentivo e confiança no meu trabalho.

À Dra Jacqueline Pereira Vistuba, por desvendar os mistérios da cromatografia, sem medir esforços.

À empresa Klabin, pela parceria estabelecida.

À Dra engenheira florestal e melhorista Regiane Estopa pelo auxílio em todo o projeto e fases do experimento.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e contribuírem com melhorias ao trabalho.

À Universidade do Estado de Santa Catarina, através dos professores, servidores e amigos que fiz nessa instituição. Tenho orgulho de pertencer à família “caviana”!

Muito obrigada!

“Combati o bom combate, acabei a carreira, guardei a fé.”
2 Timóteo 4:7

RESUMO

Objetivou-se relacionar aspectos morfológicos e bioquímicos de mudas clonais de *Eucalyptus grandis*, *E. dunnii* e *E. benthamii*, com a tolerância ao frio; bem como avaliar a sobrevivência dessas mudas em campo, após períodos de frio, com e sem aclimação. Foram utilizados clones das espécies: *Eucalyptus dunnii* Maiden, *E. benthamii* Maiden et Cambage e *E. grandis* Hill ex Maiden. As mudas foram submetidas a cinco tratamentos em diferentes processos: pré-aclimação, aclimação e temperaturas negativas. No processo de pré-aclimação, foram utilizadas as temperaturas alternadas de 20 °C e 12 °C, durante três dias, sob fotoperíodo e termoperíodo de 12 horas. Em seguida, alteradas para 15 °C e 9 °C, por sete dias. Então, reduzidas para 10 °C e para 5 °C, por dez dias. No processo de aclimação, foram utilizadas temperaturas de 5 °C e de 1 °C, por diferentes períodos. Já no processo de temperaturas negativas, as mudas foram submetidas a quatro gradientes (-2, -4, -6 e -8 °C), com exposição de três horas em cada. Os experimentos foram realizados com quatro repetições, por tratamento. Antes e após cada tratamento, foram determinados aspectos morfológicos (diâmetro do colo, altura e número de folhas), bioquímicos (concentrações de açúcares solúveis totais, amido, prolina e peróxido de hidrogênio), além da sobrevivência em campo das mudas aos 90 dias após a aplicação dos tratamentos. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e teste de comparação de médias (Tukey a $p < 0,05$). Os resultados indicaram que as diferentes espécies analisadas tiveram a sobrevivência reduzida ao serem expostas a temperaturas negativas. A queda foliar foi mais significativa em *E. grandis*, o qual teve menor desenvolvimento, e se mostrou mais sensível ao frio. A espécie *E. dunnii* apresentou maior sobrevivência, porém com perda da gema apical, o que pode acarretar em menor qualidade no desenvolvimento do fuste, fator indesejado pela indústria madeireira. As espécies analisadas tiveram aumento nas concentrações dos componentes bioquímicos, exceto amido, ao serem expostas a temperaturas negativas. A concentração de peróxido de hidrogênio foi mais significativa em *E. grandis*, o qual demonstrou menor tolerância ao frio. A espécie *E. dunnii* apresentou maior concentração de açúcares solúveis totais e maior tolerância ao estresse térmico.

Palavras-chave: Estresse. Temperaturas negativas. Eucalipto.

ABSTRACT

The objective was to relate morphological and biochemical aspects of clonal seedlings of *Eucalyptus grandis*, *E. dunnii* and *E. benthamii*, with cold tolerance; as well as to evaluate the survival of these seedlings in the field, after periods of cold, with and without acclimatization. Clones of the species *Eucalyptus dunnii* Maiden, *E. benthamii* Maiden et Cambage and *E. grandis* Hill ex Maiden were used. The seedlings were submitted to five treatments in different processes: pre-acclimatization, acclimatization and negative temperatures. In the pre-acclimatization process, the alternating temperatures of 20 ° C and 12 ° C were used for three days under a 12-hour photoperiod and thermoperiod. They were then changed to 15 ° C and 9 ° C for seven days. Then reduced to 10 ° C and to 5 ° C for ten days. In the acclimation process, temperatures of 5 ° C and 1 ° C were used for different periods. Already in the process of negative temperatures, the seedlings were submitted to four gradients (-2, -4, -6 and -8 °C), with exposure of three hours in each. The experiments were performed with four replicates per treatment. Morphological aspects (neck diameter, height and number of leaves), biochemical parameters (concentrations of total soluble sugars, starch, proline and hydrogen peroxide) were determined before and after each treatment, besides field survival of the seedlings at 90 days after the application of treatments. Data were submitted to analysis of variance and test of comparison of means (Tukey a $p < 0.05$). The results indicated that the different species analyzed had survival reduced when exposed to negative temperatures. The leaf fall was more significant in *E. grandis*, which had less development, and was more sensitive to cold. The species *E. dunnii* presented higher survival, but with loss of the apical bud, which can lead to a lower quality in the development of the stem, a factor unwanted by the timber industry. The species analyzed had an increase in the concentrations of biochemical components, except starch, when exposed to negative temperatures. The concentration of hydrogen peroxide was more significant in *E. grandis*, which showed lower tolerance to cold. The *E. dunnii* species had a higher concentration of total soluble sugars and a higher tolerance to thermal stress.

Keywords: Stress. Negative temperatures. Eucalyptus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Metabolismo da Prolina. Biossíntese em linha verde. Catabolismo em linha vermelha. Via ornitina em linha azul.....	35
Figura 2 -	Temperaturas e Índices pluviométricos no município de Otacílio Costa – SC em 2015, 2016 e 2017.....	43
Figura 3 -	Altura e diâmetro do colo de mudas de <i>Eucalyptus spp</i> avaliados após o recebimento.....	47
Figura 4 -	Altura e diâmetro do colo de mudas de <i>Eucalyptus spp</i>	48
Figura 5 -	Sobrevivência (%) de mudas de <i>Eucalyptus spp</i> após os tratamentos.....	49
Figura 6 -	Número de folhas em mudas de <i>Eucalyptus spp</i> após os tratamentos.....	49
Figura 7 -	Concentração de açúcares em mudas de <i>Eucalyptus spp</i>	51
Figura 8 -	Concentração de amido em mudas de <i>Eucalyptus spp</i> após os tratamentos.....	52
Figura 9 -	Concentração de prolina em mudas de <i>Eucalyptus spp</i>	53
Figura 10 -	Teor de Peróxido de Hidrogênio em mudas de <i>Eucalyptus spp</i>	54
Figura 11 -	Temperaturas e Índices pluviométricos nos meses de avaliação em campo no município de Otacílio Costa – SC.....	57
Figura 12 -	Danos no meristema apical causados, provavelmente, pelo frio. Fenômeno popularmente conhecido como “repolho”.....	58
Quadro 1 -	Tratamentos utilizados em mudas de <i>Eucalyptus spp</i> , para estudo de tolerância ao frio.....	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	O GÊNERO <i>EUCALYPTUS</i>	23
2.1.1	<i>Eucalyptus benthamii</i> Maiden	24
2.1.2	<i>Eucalyptus dunnii</i> Maiden	25
2.1.3	<i>Eucalyptus grandis</i> Hill ex Maiden	26
2.2	TOLERÂNCIA AO FRIO	27
2.3	CARBOIDRATOS	30
2.3.1	Oligossacarídeos da série Rafinose.....	30
2.3.2	Carboidratos e o Frio	31
2.4	PROLINA	32
2.5	PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	34
3.1	AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS	39
3.2	SOBREVIVÊNCIA EM CAMPO.....	39
3.3	AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS.....	40
3.4	AMIDO	41
3.5	TEOR DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	41
3.6	QUANTIFICAÇÃO DE PROLINA	42
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4	RESULTADOS	43
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

O setor brasileiro de árvores plantadas possui área de 7,84 milhões de hectares de reflorestamento, sendo responsável por 91% de toda a madeira produzida para fins industriais e 6,2% do PIB Industrial no país. É um dos segmentos com maior potencial de contribuição para a construção de uma economia verde (IBÁ, 2017).

O produto interno bruto do setor florestal é da ordem de US\$ 71,1 bilhões, o que representa 3,12% de toda a riqueza gerada pelo país e cerca de 28% do valor adicionado ao PIB pelo setor agropecuário. Além disso, gera 1,8 milhão de empregos diretos, 6,6 milhões de empregos indiretos, uma receita anual de R\$ 20 bilhões e, ainda, paga cerca de R\$ 4,5 bilhões de impostos (BRASIL, 2017).

Dentre as espécies plantadas nacionalmente, as de maior destaque são dos gêneros *Eucalyptus*, com 5,7 milhões, e *Pinus*, com 1,6 milhão de hectares. Nos últimos cinco anos, o crescimento da área plantada no país com Eucalipto foi de 2,4% ao ano (IBÁ, 2017).

Apesar da importância econômica dos plantios com espécies florestais, estima-se que 751 mil km² ou 8,8% da área total do país estejam sujeitas à ocorrência de geadas (EMBRAPA, 1988; HIGA et al., 1994; CARON et al., 2011; ELOY et al., 2013; MORAES et al., 2014), fenômeno natural que pode trazer perdas significativas na produção florestal, sendo necessária a seleção de espécies e/ou genótipos que sejam adequados a essas condições climáticas, ou seja, que tenham tolerância a geadas.

Existem espécies de *Eucalyptus* que aparentemente se comportam bem em toda extensão territorial do Brasil, como *E. grandis*, porém está sujeito aos efeitos da geada (HIGA et al., 1997; CARON et al., 2011). Já o *E. dunnii* e o *E. benthamii* são indicados para plantios em regiões com temperaturas mínimas absolutas de até -5 °C (FAO, 1981; MARADEI et al., 1988; HIGA et al., 1997). Entretanto, algumas florestas implantadas com estas espécies, identificadas como tolerantes ao frio, vêm apresentando problemas devido a danos por geadas (SILVA et al., 2009), uma vez que a tolerância ao frio é uma característica relativa, determinada por alterações fisiológicas, as quais ocorrem no tecido vegetal durante um período de preparação para suportar as temperaturas baixas de inverno.

Essa preparação é chamada de rustificação ou aclimação, onde as plantas percebem reduções na temperatura e no fotoperíodo que antecedem o inverno (NILSEN; ORCUTT, 1996). Durante esse preparo, as plantas podem produzir substâncias, como açúcares solúveis (rafinose, estaquiose e sacarose) (PETERBAUER; RICHTER 2001), proteínas hidrossolúveis e aminoácidos como a prolina (PRUDENTE, et al., 2014) que podem atuar como substâncias protetoras por meio da formação do estado vítreo celular (PALONEN; JUNTILA, 1999). No processo de aclimação, a redução gradual de temperatura estimula o aumento na concentração foliar das substâncias crioprotetoras. Porém a tolerância ao frio é variável entre as espécies (MORAGA et al., 2006).

Nem todas as plantas são capazes de sobreviver às baixas temperaturas ou a formação de gelo nos tecidos, e nem todas as espécies tolerantes ao congelamento têm a habilidade de passar pela aclimação sem prejuízos (LARCHER, 2000). As injúrias provocadas pelo frio dependem do grau de resfriamento, sua duração e a velocidade que a temperatura muda durante o resfriamento e durante o reaquecimento (CARON et al., 2011).

Os danos causados pelas baixas temperaturas podem ser identificados pela mortalidade das plantas, redução do número de folhas e do desenvolvimento de mudas (HIGA et al., 1997), e, mais especificamente, por produção de substâncias indicadoras de estresse, as espécies reativas do oxigênio (EROs) (FINKEL, 2000).

Essas moléculas são geradas em grande quantidade durante o estresse. Podem desempenhar um papel na sinalização de resposta celular ao estímulo e resposta a uma condição ambiental (LEVINE et al., 1994). A produção excessiva de substâncias (EROs), como o peróxido de hidrogênio, pode levar a inibição enzimática, oxidação de proteínas, desequilíbrio celular e morte (NEILL et al., 2002).

Há poucas informações referentes ao comportamento de espécies de *Eucalyptus* frente a condições de baixa temperatura, bem como da relação da tolerância ao frio e concentrações de carboidratos e aminoácidos. Nesse sentido, podem ser encontrados trabalhos realizados por Almeida et al. (1994), que avaliaram mudas de diferentes genótipos de *Eucalyptus* em Portugal; Travert et al., (1997), com o híbrido *Eucalyptus dunnii* x *Eucalyptus globulus*; Moraga et al. (2006), trabalhando com espécies do gênero *Eucalyptus* no Chile e Floriani et al. (2013), com mudas de *Eucalyptus spp* e seu comportamento após períodos de frio.

Objetivou-se com o trabalho relacionar os teores de açúcares solúveis totais, amido, prolina e peróxido de hidrogênio em mudas clonais de *Eucalyptus grandis*, *E. dunnii* e *E. benthamii*, com a tolerância ao frio; bem como avaliar a sobrevivência dessas mudas em campo, após períodos de frio, com e sem aclimação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O GÊNERO *EUCALYPTUS*

As espécies do gênero *Eucalyptus* têm sua origem na Austrália, Tasmânia e ilhas da Oceania. Pertencente à família *Myrtaceae* são árvores de grande porte e rápido crescimento, aptas ao manejo pelo sistema de talhardia, permitindo assim, a condução das rebrotas por mais duas rotações (RODERJAN, 1999).

Segundo Rizzini (1988), nas florestas australianas os eucaliptos são indiferentes às qualidades químicas do solo, crescendo bem nos substratos profundos, permeáveis, e também nos arenosos. No Brasil, os primeiros plantios comerciais de eucalipto foram realizados em 1868, no estado do Rio Grande do Sul, por Assis Brasil, o primeiro brasileiro a interessar-se pelo gênero. No período de 1905 a 1915, no estado de São Paulo, Edmundo Navarro de Andrade implantou uma série de experimentos com 144 espécies do gênero *Eucalyptus*, sob a tutela da Companhia Paulista de Estradas de Ferro (FERREIRA; SANTOS, 1997).

Existem plantios desde o Rio Grande do Sul até o Nordeste. As espécies que, aparentemente, comportam-se bem em toda extensão territorial do Brasil, como *E. grandis*, *E. saligna* e *E. urophylla*, são cultivadas com grande êxito em todo o território nacional, porém sujeitas aos danos causados por geada nas regiões onde estas ocorrem (SILVA et al., 2009).

Todas as espécies do gênero *Eucalyptus* são sensíveis a temperaturas extremamente baixas, sendo esse o maior impedimento do seu uso em regiões de clima temperado. Embora existam variações entre e dentro de espécies, os eucaliptos não toleram temperaturas abaixo de -20 °C. A maioria sofre danos abaixo de 0 °C e somente poucas sobrevivem em temperaturas entre -15 °C e -18 °C (TURNBULL; ELDRIDGE, 1983).

A produção de mudas de eucalipto, para plantio, é feita, principalmente, por meio da clonagem, que procura realizar a manutenção das características da planta matriz-elite selecionada e a implantação de talhões uniformes de elevada produtividade (ALFENAS et al., 2004).

Mesmo sendo a clonagem uma técnica que permite a manutenção das características desejadas em uma planta, podem ocorrer, em virtude do manejo, variações no crescimento de mudas no viveiro e no campo. As qualidades

morfológica e fisiológica das mudas dependem, assim, da constituição genética, das condições ambientais, dos métodos de produção e do regime de manejo (PARVIAINEN, 1981).

2.1.1 *Eucalyptus benthamii* Maiden

E. benthamii apresenta distribuição natural no litoral oriental de New South Wales, Austrália, com latitude aproximada de 34°00' S e longitude de 150°30' E. (HALL; BROOKER, 1973).

A altura da espécie varia de 30 m a 45 m, longevidade de até 200 anos e possui rápido crescimento e excelente capacidade adaptativa em vários sítios (KJAER et al., 2004).

Apresenta casca lisa, com inflorescências brancas entre março e maio, sua cápsula apresenta entre 4 e 5 mm de comprimento com dispersão das sementes entre junho e dezembro (BENSON; MCDOUGALL, 1998).

Essa espécie foi introduzida no Brasil pela Embrapa Florestas, onde, em plantios, tem mostrado rápido crescimento, boa forma de fuste e alta homogeneidade do talhão (GRAÇA et al., 1999). Essas características tornam a espécie promissora como opção para reflorestamento, e há a probabilidade da espécie ser utilizada para fins industriais.

Segundo Alves et al. (2011), a madeira do *Eucalyptus benthamii* apresenta estrutura anatômica bastante semelhante às de outras espécies do gênero e densidade básica e dimensões das fibras dentro dos parâmetros dos clones utilizados atualmente pela indústria nacional de celulose e papel.

Por ser uma espécie de clima subtropical, Assis e Mafia (2007) sugerem que o *Eucalyptus benthamii* apresenta-se como boa alternativa como componente de híbridos tolerantes ao frio. Em plantio experimental realizado em Guarapuava - PR, Paludzyszyn Filho e Ferreira (2006) constataram forte tolerância do *E. benthamii* a geadas, sendo essa superior ao *E. dunnii*. Higa e Carvalho (1990) observaram na região de Dois Vizinhos, PR sobrevivência de 70%, altura média de 16 m e DAP médio de 15 cm, aos 45 meses de idade, e concluíram que a espécie merece atenção especial dos melhoristas.

Em 2009, o IPEF doou para a North Carolina State University (NCSU) sementes de 15 espécies de *Eucalyptus* para participar de testes coordenados pela

Forest Productivity Cooperative (FPC) em sete estados do EUA com condições extremas de frio. Dentre as espécies analisadas, o *E. benthamii* resistiu ao frio de -8 °C, 3 nevascas em Raleigh e uma queda de granizo, mostrando-se superior às 12 outras espécies de eucalipto utilizadas no experimento (IPEF, 2011).

Ao comparar o desenvolvimento inicial entre mudas clonais de *E. benthamii* e *E. dunnii*, Andrade e Angelo (2016) relatam que as plantas *E. benthamii* apresentaram melhor crescimento em DAP e altura total em relação às plantas de *E. dunnii* em experimento realizado em General Carneiro PR, sob temperaturas negativas.

Essas características tornaram o *E. benthamii* uma excelente opção para reflorestamentos em regiões de clima frio, principalmente em localidades onde ocorrem geadas frequentes e severas, como no sul do Brasil (PALUDZYSZYN FILHO; FERREIRA, 2006).

2.1.2 *Eucalyptus dunnii* Maiden

O *Eucalyptus dunnii* tem uma ocorrência natural restrita ao nordeste do estado de Nova Gales do Sul e sudeste do estado de Queensland, Austrália (MARCÓ; LOPEZ, 1995).

A semelhança de latitudes tropicais e subtropicais do Brasil e Austrália tornou possível a introdução de espécies do gênero *Eucalyptus* no Brasil, para fins comerciais (SILVA, 2001). Estudos conduzidos na Austrália indicaram que, para crescimento, não há diferença entre essas duas procedências (ARNOLD et al., 2004). O mesmo foi verificado na China (WANG et al., 1999), na Argentina (MARCÓ; LOPEZ, 1995) e, no Brasil, e em Mogi Mirim, SP (PIRES; PARENTE, 1986).

De acordo com Brasil (2015), esta espécie atinge 50 m de altura e 1 a 1,5 m de diâmetro a altura do peito (DAP), com fuste de 30 a 35 m. A madeira é semelhante a do *E. grandis*, podendo ter as mesmas utilizações.

A madeira possui cor clara (ROCHA e TOMASELLI, 2002), indicada para fins estruturais, assoalhos, parquetes, carrocerias, cabos de ferramentas, etc. (CALORI e KIKUTI, 1997).

O *E. dunnii* é indicado para plantios em regiões com temperaturas mínimas absolutas entre - 3 °C e - 5°C, sob condições de aclimação prévia. Pode suportar

até 22 geadas anuais, porém se fora de época normal de ocorrência, sua mortalidade pode atingir 50% em plantios comerciais (PALUDZYSZYN FILHO e SANTOS, 2005).

No sul do Brasil, o *E. dunnii* tem se destacado pelo rápido crescimento, uniformidade dos talhões, forma das árvores e tolerância à geada não muito severas (ROCHA e TOMASELLI, 2002). Entretanto, a temperatura quando próxima de 0° ocasiona prejuízo nos indivíduos, como queima foliar, desfolha, danos no caule e nos galhos (FILHO et al., 2006)

O plantio comercial com a espécie é indicado para todo o estado de Santa Catarina em altitudes inferiores a 1.000 m, especialmente acima dos 500 m, onde o inverno é fator limitante a muitos outros eucaliptos (EMBRAPA, 1988).

Alguns testes nos Estados Unidos da América demonstraram que *E. dunnii* é, dentro do gênero *Eucalyptus*, uma das espécies mais tolerantes ao frio (FAO, 1981).

Nas regiões baixas e frias do centro-sul da China, Arnold et al. (2004) testaram diversas espécies de eucaliptos, incluindo *E. dunnii*, que apresentou boa adaptação, crescimento, forma e tolerância ao frio, entrando na lista das espécies de maior potencial.

2.1.3 *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden

O *E. grandis* é natural da Austrália, estendendo-se de forma descontínua, desde Newcastle, New South Wales (32°35' S), com clima temperado; até Atherton, Queensland (17°17' S), com clima subtropical. Os povoamentos do sul estão ao nível do mar, subindo gradualmente, até atingir 1.200 m de altitude, ao Norte da Austrália. A precipitação média anual varia de 1.000 a 1.800 mm (GONZAGA, 1983).

Árvore perenifólia, com altura variando entre 20 e 40 m, apresenta tronco retilíneo com casca pulverulenta desprendendo-se em tiras longas. Ramagem longa e robusta, formando copa aberta ou alongada. Folhas juvenis opostas, depois alternas, oval-lanceoladas, pecioladas, de 10-20 cm de comprimento (LORENZI, et al., 2003).

Segundo Silva (2001), a opção pelo *E. grandis* no Brasil está relacionada a excelente resposta silvicultural da espécie, boa forma e rápido crescimento, além de propriedades desejáveis para usos múltiplos, como massa específica média, grã direita, fácil usinagem, boa aceitação de acabamento e cor levemente avermelhada.

É uma das espécies florestais mais plantadas no Brasil, sendo sua madeira utilizada para produção de celulose e papel, painéis de fibra e aglomerado, combustível industrial e doméstico e produtos de serraria (SOARES et al., 2003).

E. grandis apresenta relativa resistência a deficiência hídrica, a madeira é leve, com cerne diferenciado. Possui boa regeneração, por meio da brotação de cepas (BATTIE-LACLAU et al., 2014).

O ritmo de crescimento e o rendimento volumétrico são, de forma geral, superiores, quando são comparados a algumas espécies nativas (BERTOLA, 2004).

Em regiões tropicais o crescimento e desenvolvimento de *E. grandis* é superior ao de outros eucaliptos, como o *E. dunnii* (SILVEIRA et al., 2014)

No entanto, apesar de todos os avanços, existem certas limitações de sua expansão na região sul do Brasil, principalmente devido à ocorrência de temperaturas mais baixas e geadas frequentes. Esse fato torna importante o desenvolvimento de pesquisas direcionadas para novas espécies e variedades, buscando avaliar o potencial para os mais diversos fins e introduzi-las de acordo com as características de cada ambiente (NISGOSKI et al., 1998).

2.2 TOLERÂNCIA AO FRIO

Frio, sal ou tensões de seca são alguns dos principais fatores ambientais que afetam fortemente o crescimento, produtividade e desenvolvimento de plantas (NILSEN; ORCUTT, 1996). Ao ocorrer geada durante cinco dias, a planta pode sofrer diversos danos, como a queda das folhas, morte do ponteiro apical ou até a morte da planta pelo frio (SELLE; VUADEN, 2007; FLORIANI et al., 2013).

Segundo Larcher (2000), a progressão e a extensão da injúria provocada pelo frio dependem do grau de resfriamento, sua duração e a velocidade que a temperatura muda durante o resfriamento e durante o reaquecimento, sendo que uma mudança brusca na temperatura, geralmente, é prejudicial.

O estresse a baixas temperaturas pode ser dividido em resfriamento, no qual a temperatura é suficientemente fria para causar injúria, mas não fria o bastante para congelar a planta; e o congelamento, que causa injúrias na planta quando a temperatura atinge o ponto de congelamento, ocorrendo a formação de cristais de gelo (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Os danos causados pelo congelamento podem ser evitados por mecanismos de proteção e evasão, de forma que o congelamento do tecido pode demorar mais ou até mesmo não ocorrer (NILSEN; ORCUTT 1996). Assim, o que define a sobrevivência de uma planta sob um clima frio é a sua capacidade de tolerância ao congelamento (LARCHER, 2000).

Tolerância é um termo que vem do latim "*tolerare*" que significa suportar, aceitar (FERREIRA, 2013). Tolerância ao frio é a habilidade da planta em sobreviver à formação do gelo extra-celular, sem sofrer danos (LARCHER, 1995). Em condições de temperaturas abaixo de 0 °C, o metabolismo das células é afetado, reduzindo-se ao mínimo as funções fisiológicas mais importantes (DURYEA; MCCLAIN, 1984).

Durante o congelamento ocorre o super-resfriamento da célula e de seu meio externo e, posteriormente, ocorre formação de gelo extracelular. O meio intracelular permanece descongelado, provavelmente devido à presença de barreiras celulares impostas pela parede celular e membrana plasmática, prevenindo a formação de cristais de gelo no citoplasma (MAZUY, 1963).

Quando a redução da temperatura é lenta ocorre perda de água do interior da célula para a solução extracelular, sendo então convertida em gelo na superfície das células ou entre o protoplasto e a parede celular. Com isso, a célula desidrata-se, reduzindo a um mínimo ou removendo completamente a água livre, evitando assim a formação de gelo em seu interior. Se a temperatura for mantida constante ocorre equilíbrio e não haverá desidratação adicional (SANTOS, 2000).

Segundo Guy (2003), a sobrevivência das células após o congelamento-descongelamento é acentuadamente maior se o resfriamento for lento. Isto é atribuído ao efeito de formação de gelo intracelular. O congelamento intracelular deve ser evitado por meio do controle da perda da água intracelular. Então o congelamento extracelular deve ocorrer antes, para permitir a sobrevivência celular e da planta quando submetida à exposição em temperaturas negativas. Isto significa que ali deve haver uma barreira entre o interior da célula e o gelo extracelular, função talvez exercida pela membrana plasmática.

Yamada et al.. (2002) comentam que as respostas ao congelamento das células de plantas tolerantes ao resfriamento não são devidas apenas às propriedades da membrana plasmática, mas também às propriedades da parede celular, servindo como barreiras contra a propagação de gelo extracelular.

Marshall (1982) comenta que a tolerância ao frio é controlada por relações fisiológicas complexas (combinações complexas de genes), além do que, os melhoristas têm usado testes de campo para seleção de material para tolerância ao frio. No entanto, em função da dificuldade de homogeneizar as condições ambientais, esses esforços de seleção geralmente não apresentam bons resultados. Assim, é preciso criar alternativas que possibilitem a seleção de espécies mais tolerantes ao frio para plantios florestais.

Os fisiologistas têm demonstrado correlações gerais entre estresses causados pela temperatura e várias variáveis, como por exemplo, concentrações de carboidratos (Marshall, 1982).

A avaliação da sensibilidade das plantas através da sua exposição a temperaturas inferiores a 2 °C, em ambiente controlado, pode ser um procedimento bastante eficiente na predição de resistência em função de assegurar uma homogeneidade dos níveis de frio. Em trevo branco, por exemplo, a seleção de genótipos tolerantes nos experimentos em ambientes controlados é bastante eficiente (ANNICCHIARICO et al., 2001).

Na literatura podem ser encontrados trabalhos com objetivo de relacionar a síntese de solutos, como açúcares, com a tolerância de plantas a fatores adversos.

Travert et al. (1997), trabalhando com o híbrido *Eucalyptus dunnii* x *Eucalyptus glóbulos*, apontam que células de genótipo resistente contêm mais hidratos de carbono, sem aclimação ao frio; e a incubação de células com determinados açúcares resultou num aumento na tolerância ao congelamento, e, este fato só ocorreu quando a acúmulo de açúcar dentro das células foi observado.

Almeida et al. (1994) avaliaram a resistência ao frio e a capacidade de aclimação de diferentes genótipos de *Eucalyptus* em mudas, em Portugal. Os resultados indicaram aumento na concentração de açúcares solúveis e que a aclimação aumentou a capacidade de o eucalipto “suportar” a formação de gelo extracelular.

Moraga et al. (2006), trabalhando com espécies do gênero *Eucalyptus* no Chile, chegaram a conclusão que a concentração de açúcares solúveis total é um bom indicador da resistência a baixas temperaturas.

Tinus et al. (2000) relataram uma relação próxima entre resistência ao frio e a concentração absoluta de açúcares solúveis em folhas e raízes de três espécies de coníferas de diferentes condições climáticas.

2.3 CARBOIDRATOS

Os carboidratos formam um dos maiores grupos de compostos orgânicos encontrados na natureza e juntamente com as proteínas são os constituintes principais do organismo vivo (BOBBIO; BOBBIO, 2003). Funcionam como material de reserva ou como material estrutural dos tecidos (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Nas plantas, os carboidratos são encontrados como constituintes estruturais (celulose e outros polissacarídeos de parede); reserva de energia, na forma de polímeros (como o amido); constituintes de vários metabólitos (como ácidos nucléicos e coenzimas) e numerosos glicosídeos; e como precursores requeridos para a síntese de outros metabólitos (formados a partir de dióxido de carbono e água), sendo o ponto de partida para a formação de todos os componentes orgânicos na natureza (BRUNETON, 1999).

Os carboidratos não estruturais, acumulados em folhas e frutos são o amido e os açúcares solúveis redutores e não redutores. Os principais açúcares redutores são a glicose e a frutose, já o principal açúcar não redutor é a sacarose, mobilizada nos processos de transporte na direção fonte/dreno. O amido, o qual é um carboidrato insolúvel, é a reserva mais distribuída de carbono acondicionada nas plantas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os carboidratos são sintetizados pela fotossíntese durante o ano e, no período de ausência de frutos, ocorre o aumento de sua concentração nas folhas e nas raízes das plantas. (GARCIA-LUIS et al., 1995).

2.3.1 Oligossacarídeos da série Rafinose

Os oligossacarídeos da série rafinose, são formados pela rafinose, estaquiose e verbascose, são açúcares de baixo peso molecular que contêm um ou mais grupos α -D-galactopiranosil na sua estrutura (CRISTOFARO et al., 1974).

Na estrutura dos oligossacarídeos a sacarose é a unidade básica e pode conter um ou mais grupos α -D-galactopiranosil (α -D-Gal), sendo que as unidades de α -galactosil estão sempre do lado esquerdo da sacarose, ligadas ao carbono 6 da molécula de glicose (DEY, 1985; SILVA et al., 1992)

A rafinose é um trissacarídeo ($C_{18}H_{32}O_{16}$) constituído por uma molécula de galactose, uma de glicose e outra de frutose. É conhecida também como gossipose, melitose, melitriose e α -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-frutofuranosídeo. A estaquiose ($C_{24}H_{42}O_{21}$) é um tetrassacarídeo que contém duas moléculas de galactose, uma de glicose e outra de frutose. Pode ser chamada de galactosil-rafinose, sendo conhecida também por lupeose, β -galactan, maneotreosa e α -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-frutofuranosídeo. Já a verbascose ($C_{30}H_{52}O_{26}$), é um pentassacarídeo constituído por três moléculas de galactose, uma de glicose e uma de frutose. Esta galactosil-estaquiose ou trigalactosil-sacarose pode ser denominada também de α -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-frutofuranosídeo (SILVA et al., 1992).

Os oligossacarídeos da Família Rafinose são sintetizados e armazenados em sementes e tubérculos, durante o processo de amadurecimento, permanecendo estáveis nos estágios iniciais da germinação (DEY, 1990). As proporções desses oligossacarídeos nas leguminosas variam de acordo com o grau de maturação da planta e de condições de cultivo como composição do solo e temperatura (SAKLA et al., 1988).

2.3.2 Carboidratos e o Frio

As baixas temperaturas agem na estabilidade e na atividade enzimática, favorecendo o metabolismo de carboidratos, em especial da sacarose e de outros oligossacarídeos supostamente envolvidos na manutenção da integridade das membranas celulares, como os açúcares da série da rafinose e os ciclitóis (PETERBAUER; RICHTER 2001).

Esses compostos podem preservar a viabilidade em situações de estresse, como ultra-secagem e congelamento, impedindo a cristalização da sacarose, o que resultaria na desestruturação das membranas e consequente morte (KOSTER et al., 1991). Além de atuar na proteção das membranas, esses carboidratos contribuem para a formação do estado vítreo durante a desidratação. Nesse estado de alta viscosidade, há redução acentuada, até quase paralisação das reações químicas, conservando assim intactas as estruturas celulares.

Segundo Koster et al. (1988), a presença de oligossacarídeos em uma solução de sacarose intensifica a formação do estado vítreo e previne a cristalização. Segundo Marcos Filho (2005), o estado vitrificado oferece, portanto, sérias restrições à ocorrência de reações químicas e de alterações físicas, como por exemplo, a cristalização de solutos, que danifica as células.

Moraga et al. (2006) afirmam que os teores de carboidrato solúvel total é um bom indicador da tolerância a baixas temperaturas; pois o aumento no conteúdo de oligossacarídeos em condições de estresse por temperaturas baixas contribui para o aumento da tolerância ao congelamento no inverno, o que está diretamente relacionado ao efeito desses açúcares sobre a estabilização das membranas celulares (HINCHA et al., 2002).

Wanner e Junttila (1999) observaram que alterações nas concentrações de açúcares solúveis foram como uma resposta a temperatura baixa em *Arabidopsis thaliana*, ocorrendo após duas horas de exposição das plantas a 1 °C .

Klotke et al. (2004) relatam que essas mudanças precedem algumas alterações de tolerância ao congelamento, e, não está claro se os açúcares estão relacionados à aclimação ao frio ou se agem como fonte de energia para mudanças metabólicas futuras que levam a tolerância ao congelamento.

Segundo resultados obtidos por Floriani et al. (2013), a determinação da concentração foliar de carboidratos solúveis totais em mudas de *Eucalyptus* pode ser uma característica quantitativa a ser considerada na seleção de espécies tolerantes ao frio em programas de melhoramento.

Assim, a determinação da concentração de açúcares solúveis como indicadores de tolerância ao frio pode auxiliar no desenvolvimento do melhoramento florestal e, futuramente, possibilitar a obtenção de espécies e genótipos mais adequados para as condições climáticas de regiões frias.

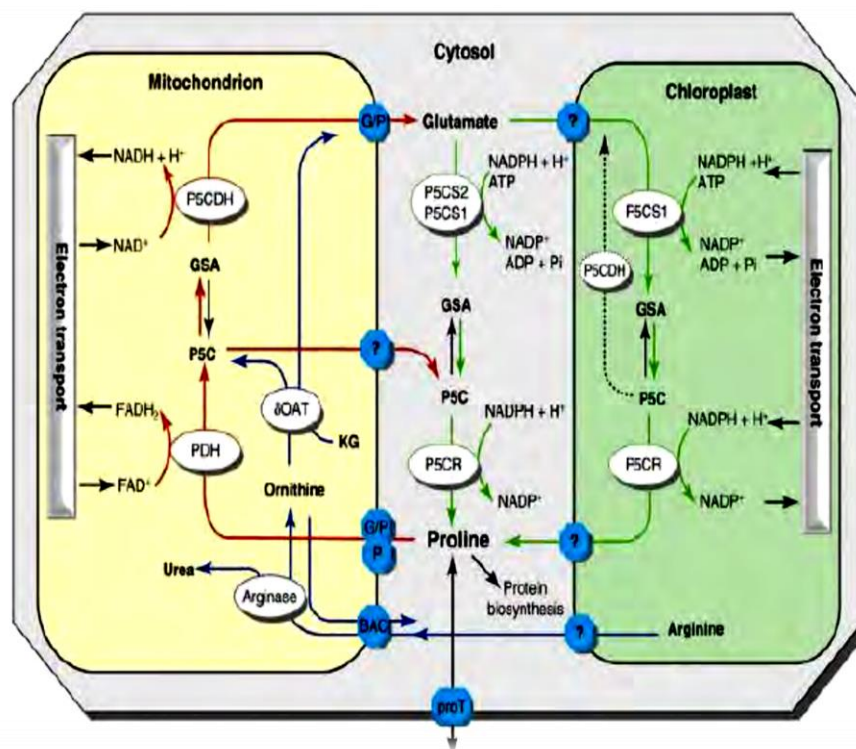
2.4 PROLINA

A prolina (L-prolina) foi sintetizada pela primeira vez por Willstater em 1900. Sendo que esse aminoácido só foi reconhecido como componente das proteínas, quando em 1901, Fischer conseguiu isolá-la a partir do hidrolisado ácido da gelatina, usando um éster (KAVI-KISHOR, et al., 2005).

O aminoácido prolina é sintetizado no citoplasma ou cloroplasto via glutamato e pirrolina-5-carboxilato (P5C) por duas sucessivas reduções, as quais são catalisadas pelas enzimas P5C sintetase – P5CS e P5C redutase – P5CR (HARE e CRESS, 1997). A via alternativa é realizada a partir da ornitina, pela enzima ornitina aminotransferase – OAT (LUTTUS et al.,1999).

A degradação desse aminoácido depende de seu catabolismo. Esse processo é restrito à mitocôndria e catalisada pelas enzimas prolina desidrogenase – PRODH, a qual catalisa a conversão de prolina em P5C, essa é oxidada a glutamato pela P5C desidrogenase (SZABADOS et al., 2010). A partir da ornitina, a prolina pode ser sintetizada por duas vias, envolvendo a transaminação, ciclização e redução (LIANG et al., 2013).

Figura 1 - Metabolismo da Prolina. Biossíntese em linha verde. Catabolismo em linha vermelha. Via ornitina em linha azul.



Fonte: Szabados et al., (2010).

A prolina é um aminoácido que se acumula naturalmente nas células e órgãos de plantas em resposta a estresses abióticos, como limitação de água, modificação

do potencial redox e estresses provocados pelo frio (PRUDENTE, et al., 2014). É conhecida pela participação como soluto compatível (VERSLUES; BRAY, 2006), e é o aminoácido mais estudado, em razão de sua sensibilidade de resposta a condições de estresse (ASHRAF et al., 2011).

Em plantas sob estresse, o conteúdo de prolina pode aumentar em comparação a plantas sob condições normais (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008), sendo que a concentração varia entre as espécies e depende do nível do estresse ao qual foram expostas (DELAUNEY; VERMA, 1993).

O acúmulo de prolina pode ativar mecanismos celulares de ajuste osmótico, reserva de carbono e nitrogênio, estabilizador de proteínas e membranas e eliminadores de radicais livres (SILVEIRA et al., 2002).

A prolina também pode atuar como removedor de espécies reativas de oxigênio (SMIRNOFF e CUMBES, 1989), sendo um detoxificante durante o estresse oxidativo, e fonte de nitrogênio e carbono (HARE; CRESS, 1997). Também pode ser um sinalizador molecular do estresse (MAGGIO et al., 2002).

Nesse sentido, indicadores fisiológicos como a concentração de prolina, hidratos de carbono e enzimas antioxidantes podem proporcionar informações sobre espécies de plantas que possuem potencial para se adaptarem a ambientes de estresse hídrico, salino ou térmico (YEO, 1994).

A demanda por espécies tolerantes aos estresses tem gerado interesse na pesquisa de mecanismos que possam ser utilizados como indicadores das respostas às condições adversas, já que pouco se sabe sobre tolerância ao estresse (KAVI KISHOR et al., 2005).

A correlação entre o acúmulo de prolina e a tolerância das plantas ao estresse ainda não está totalmente compreendida (ASHRAF et al., 2011).

2.5 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é gerado *in vivo* pela dismutação do ânion-radical superóxido (O_2^-) por enzimas oxidases ou pela β -oxidação de ácidos graxos (BARREIROS et al., 2006).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado de maneira espontânea a partir dos radicais superóxidos gerados pelo fotossistema I (PSI), (ARORA et al., 2002).

Pode ser originado durante o ciclo fotorrespiratório, com envolvimento da Rubisco (ribulose bifosfato carboxilase) nos cloroplastos (APEL; HIRT, 2004).

A Rubisco, quando a concentração de CO_2 é baixa, catalisa uma reação em que o O_2 é utilizado como substrato em relação ao CO_2 , produzindo glicolato que é translocado dos cloroplastos para os peroxissomos, onde é oxidado a peróxido de hidrogênio (APEL; HIRT, 2004).

O H_2O_2 é um oxidante considerado estável e sem carga, o que facilita sua passagem através da membrana celular e favorece a rápida resposta vegetal (APOSTOL et al., 1989).

Por ser um oxidante forte, pode iniciar o dano oxidativo nas células foliares levando à interrupção da função metabólica e perda da integridade celular, resultando em senescência (PRASAD et al., 1994),

Podem alterar o estado redox de células circundantes, com iniciação de uma resposta antioxidante agindo como um sinal de estresse oxidativo (PRASAD et al., 1994; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2000).

Além disso, o peróxido de hidrogênio é utilizado pelos fagócitos do organismo na produção de ácidos hipoalogenosos, que são oxidantes muito efetivos no combate a vírus, bactérias e outros corpos estranhos; entretanto, apresentam também efeitos deletérios quando expostos às moléculas biológicas (BARREIROS et al., 2006).

Diversas situações de estresse levam à produção na célula das plantas da maioria das formas reduzidas: H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$ e a mais poderosa oxidante, o radical hidroxila ($\text{OH}^{\bullet}$) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984).

Quando presentes em quantidades relativas baixas, as EROs, e especialmente H_2O_2 , podem agir como sinais para a ativação de respostas de defesa contra o estresse (LEVINE et al., 1994; LOW; MÉRIDA, 1996).

Porém, quantidades mais elevadas produzidas pela formação não controlada de EROs causam severa injúria, como desintegração de clorofila, fragmentação do DNA, extravasamento de íon, peroxidação de lipídios e, finalmente, morte celular (DODGE, 1994).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas mudas clonais de *Eucalyptus dunnii* Maiden, *Eucalyptus benthamii* Maiden e *Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden com 120 dias de idade, procedentes de viveiro florestal localizado no município de Telêmaco Borba, PR.

O experimento foi realizado em 3 épocas: março de 2016 (Época 1), setembro de 2016 (Época 2) e março de 2017 (Época 3).

As mudas das três espécies, produzidas a partir de miniestacas, permaneceram em casa de vegetação por um período de 45 dias, mantidas nas seguintes condições: umidade relativa do ar de aproximadamente 80 %, temperatura ambiente (25 a 30 °C); com irrigação diária. As mudas foram retiradas da casa de vegetação para aclimação em casa de sombra, pelo período de 20 a 30 dias. A adubação na casa de sombra foi realizada diariamente. Em seguida, as mudas foram alternadas em 50% de ocupação da bandeja e retiradas para pleno sol, onde permaneceram de cinco a dez dias. Após, foi realizada a assepsia com lavagem com água pressurizada e hipoclorito 1 %.

Para o experimento, as mudas de cada espécie foram submetidas a tratamentos (Quadro 1) em câmaras incubadoras tipo BOD, com controle de luz e temperatura. Foram utilizadas para a Época 1, por tratamento, 8 mudas para campo e 8 mudas para análises laboratoriais. Para as Épocas 2 e 3, foram utilizadas 8 mudas por tratamento para as análises laboratoriais.

As mudas do tratamento 1 (T1), considerado a testemunha, não passaram por processos de aclimação e temperaturas negativas. No tratamento 2 (T2), as mudas foram submetidas diretamente ao processo de temperaturas negativas, por meio da exposição à quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8 °C) por 3 horas cada.

No tratamento 3 (T3), inicialmente as mudas foram pré-aclimatadas, sendo mantidas em temperaturas de 20 °C e de 12 °C, por três dias. Em seguida, as temperaturas foram alteradas para 15 °C e 9 °C, por sete dias. Posteriormente, a temperaturas foram reduzidas para 10 °C e para 5 °C, durante dez dias. Em todo o processo de pré-aclimação, foram utilizados fotoperíodo e termoperíodo de 12 horas. Após a pré-aclimação, as mudas foram expostas ao processo de temperaturas negativas, conforme descrito acima.

Para o tratamento 4 (T4), as mudas foram submetidas à pré-aclimatação, conforme citado acima, e em seguida ao processo de aclimatação, sendo submetidas a temperaturas de 5 °C e de 1 °C, sob fotoperíodo e termoperíodo de 12 horas, durante sete dias. E, em seguida, a temperaturas negativas.

No tratamento 5 (T5), as mudas passaram pelos mesmos processos citados em T4, exceto em relação ao período de exposição à aclimatação, que foi de 21 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado.

Quadro 1 - Tratamentos utilizados em mudas de *Eucalyptus spp*, para estudo de tolerância ao frio.

TRATAMENTOS	PROCESSO 1 PRÉ-ACLIAMATAÇÃO	PROCESSO 2 ACLIAMATAÇÃO	PROCESSO 3 TEMPERATURAS NEGATIVAS
T1 Testemunha	Sem Pré-Aclimatação	Sem Aclimatação	Sem Temperaturas Negativas
T2 Temperaturas Negativas	Sem Pré-Aclimatação	Sem Aclimatação	(-2, -4, -6 e -8 °C) por 3 horas cada
T3 Pré-Aclimatação e Temperaturas Negativas	20 °C (12 h) e 12 °C(12 h) – três dias 15 °C (12 h) e 9 °C (12 h) - sete dias 10 °C (12 h) e 5 °C (12 h) - dez dias	Sem Aclimatação	(-2, -4, -6 e -8 °C) por 3 horas cada
T4 Aclimatação (7 dias) e Temperaturas Negativas	20 °C (12 h) e 12 °C(12 h) – três dias 15 °C(12 h) e 9 °C (12 h) - sete dias 10 °C (12 h) e 5 °C (12 h) - dez dias.	5 °C (12 h) e 1 °C (12 h) por sete dias	(-2, -4, -6 e -8 °C) por 3 horas cada
T5 Aclimatação (21 dias) e Temperaturas Negativas	20 °C (12 h) e 12 °C(12 h) – três dias 15 °C(12 h) e 9 °C (12 h) - sete dias 10 °C (12 h) e 5 °C (12 h) - dez dias	5 °C (12 h) e 1 °C(12 h) por 21 dias	(-2, -4, -6 e -8 °C) por 3 horas cada

Fonte: Adaptado de Floriani et al. (2011).

Nas três Épocas, as mudas foram submetidas a avaliações morfológicas (altura, diâmetro de colo, número de folhas) e bioquímicas (açúcares solúveis totais, amido, peróxido de hidrogênio e prolina) no recebimento das mudas (T1) e após cada tratamento. Além disso, na Época 1, foi avaliada a sobrevivência em campo, aos 90 dias de plantio, após a aplicação dos tratamentos.

3.1 AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS

Foram avaliadas, em 40 mudas por espécie, a altura, medida com fita métrica da base até a gema apical; o diâmetro do colo, avaliado com paquímetro; e o número de folhas restantes.

3.2 SOBREVIVÊNCIA EM CAMPO

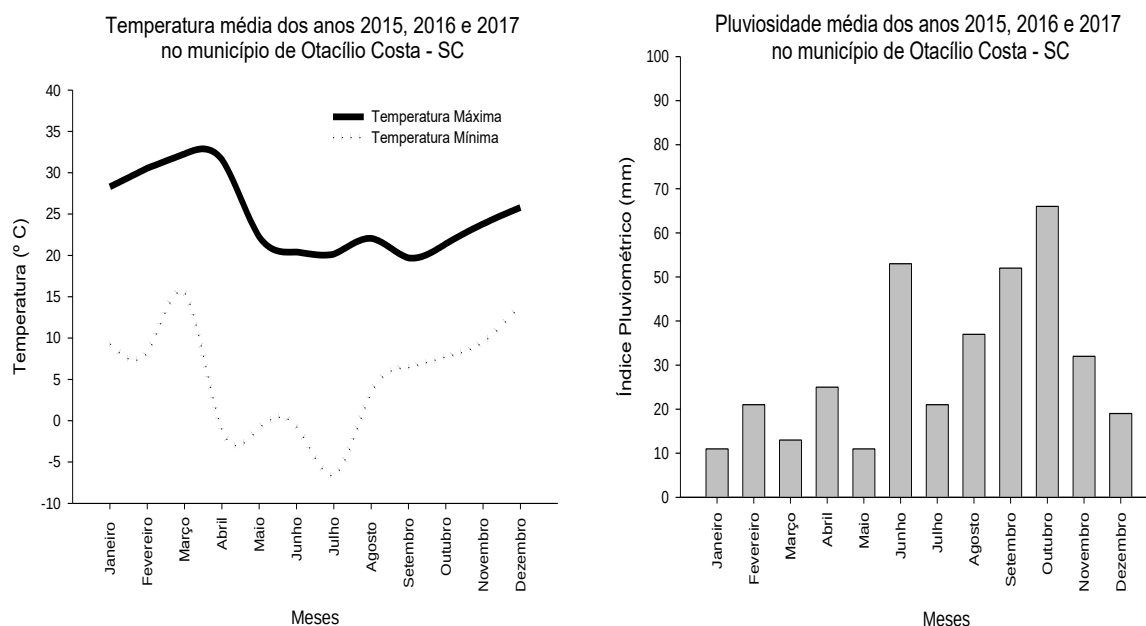
As mudas da Época 1, das três espécies e dos cinco tratamentos, foram destinadas ao campo, sendo plantadas em uma área na cidade Otacílio Costa, SC, com solo do tipo cambissolo, temperatura média de 16 °C e precipitação média anual de 10,2 mm. (Figura 2).

O plantio foi realizado em delineamento blocos ao acaso, com oito repetições de uma planta por parcela. O espaçamento foi de 3,10 m entre linhas e 2,0 m entre plantas.

Foi avaliada a sobrevivência em campo, além do crescimento em altura e diâmetro do colo, após 90 dias de plantio.

As mudas permaneceram no campo durante o período de março à julho de 2016, em que foram verificadas temperaturas mínimas de -7 °C, segundo informações da EPAGRI, SC.

Figura 2 - Temperaturas e Índices pluviométricos no município de Otacílio Costa – SC em 2015, 2016 e 2017.



Fonte: Adaptado de Epagri, SC.

3.3 AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS

A extração e a análise dos teores de açúcares solúveis totais foram realizadas conforme metodologia descrita por Moraga et al.. (2006), pelo método fenolsulfúrico. As folhas foram maceradas com aproximadamente 25 mL de nitrogênio líquido em almofariz e pistilo de porcelana. Após maceradas, foram retiradas 0,3 g de massa seca e colocadas em tubo de ensaio, e foram adicionados 3 mL de etanol a 80%, agitando e colocou-se a mistura por 30 minutos em banho-maria a uma temperatura de 60 °C. Posteriormente, a amostra foi agitada manualmente por 30 segundos e centrifugada numa temperatura de 4 °C a 4000 rpm, por 30 minutos.

Após a centrifugação, 1 mL da fase líquida foi transferida para outro tubo de ensaio, e adicionados 1 mL de clorofórmio e 1 mL de água deionizada, deixando a mistura em repouso durante 45 a 60 minutos, obtendo-se a separação de fases, compostas por pigmentos no fundo do tubo e açúcares dissolvidos em meio aquoso na parte superior.

Em outro tubo de ensaio, foram pipetados 200 µL da fase aquosa obtida e adicionados 1,8 mL de água deionizada (solução 1). Desta primeira solução, foram

retirados 500 µL, que foram transferidos para outro tubo de ensaio, onde foram adicionados 500 µL de fenol (5 %) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após isso, foi realizada a agitação em vortex e, em seguida, realizada a medição da absorbância da solução em espectrofotômetro, com um comprimento de onda de 485 nm. Para obtenção dos valores de concentração de açúcares solúveis totais, foi utilizada a curva de calibração $y = 0,0096x + 0,0536$ (onde: y = absorbância; x= concentração de açúcares; $R^2 = 0,991$).

3.4 AMIDO

Para quantificação de amido, por meio da metodologia de Fehling (Mccready, et. al,1950), obtém-se o teor de amido a partir do método de titulometria. Foram pesados 5 g da amostra seca (em estufa a 60 °C por 48 horas) e moída (no moedor até virar farinha). Colocou-se em um erlenmeyer de 300 mL com 150 mL de água destilada. Adicionou-se 4 gotas de solução de hidróxido de sódio a 10 %, aqueceu-se a 120°C a autoclave por 1 hora. Esfriou-se a amostra à temperatura ambiente. Adicionou-se 10ml de ácido clorídrico a 50%. A amostra retornou à autoclave por 30 minutos a 120°C. Esfriou-se a temperatura ambiente e ajustou o pH 7 em cada amostra. A neutralização foi feita com solução de hidróxido de sódio a 10 % para obter pH7 com auxílio de um pHmetro. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 250 mL completando o volume com água. Colocou-se na bureta a solução padrão de glicose (0,5%).

Transferiu-se, com pipeta volumétrica, 10ml de cada uma das soluções de Fehling A(solução azul clara) e B (solução incolor) para erlenmeyer de 50 mL. Aqueceu-se até ebulição e goteja-se a solução da amostra até que o líquido sobrenadante de azul fique levemente vermelho. Anotou-se o volume gasto de glicose para cada amostra titulada. Para calcular o teor amido na amostra usou-se o seguinte cálculo. % Amido: $250. TL. 0,9.100/Leitura\ média$.

3.5 TEOR DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

A análise de peróxido de hidrogênio foi realizada de acordo com Alexieva et al.. (2001). Foram utilizadas duas repetições de 0,3 gramas. Inicialmente, as amostras foram trituradas e maceradas em nitrogênio líquido, em seguida foram

adicionados 2 mL do tampão de extração (ácido tricloroacético a 0,1 %). Para a extração, o material preparado foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos. Para a quantificação, utilizaram-se 200 µL do sobrenadante acrescidos de 800 µL de iodeto de potássio e 200 µL de tampão fosfato (0,1M pH 7,5), onde ficaram no gelo por uma hora. Posteriormente, as amostras ficaram em temperatura ambiente por 15 minutos e para as leituras utilizou-se espectrofotômetro UV/VIS Spectro800S a 390 nm.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROLINA

O conteúdo de prolina foi determinado segundo Bates et al.. (1973). Para tanto, foram macerados 300 mg de material fresco em nitrogênio líquido e adicionados 10 mL de ácido sulfo-salicílico 3% (em água). Após esta etapa, foram centrifugados a 13.000 g por 20 minutos a 15 °C.

A mistura de reação, contendo 1 mL do sobrenadante, 1 mL de solução de ninidrina ácida e 1 mL de ácido acético glacial, foi incubada a 100 °C por 1 h, e os tubos de ensaio foram cobertos. Após esta etapa, foi realizado o resfriamento em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida, foram colocados 2 mL de tolueno e agitou-se os tubos vigorosamente por 15-20 segundos, deixando-os em repouso (5 a 10 min) para a separação das fases. O cromóforo foi aspirado da fase aquosa SUPERIOR à temperatura ambiente. Foi utilizado apenas tolueno como branco. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS Spectro800S a 520 nm.

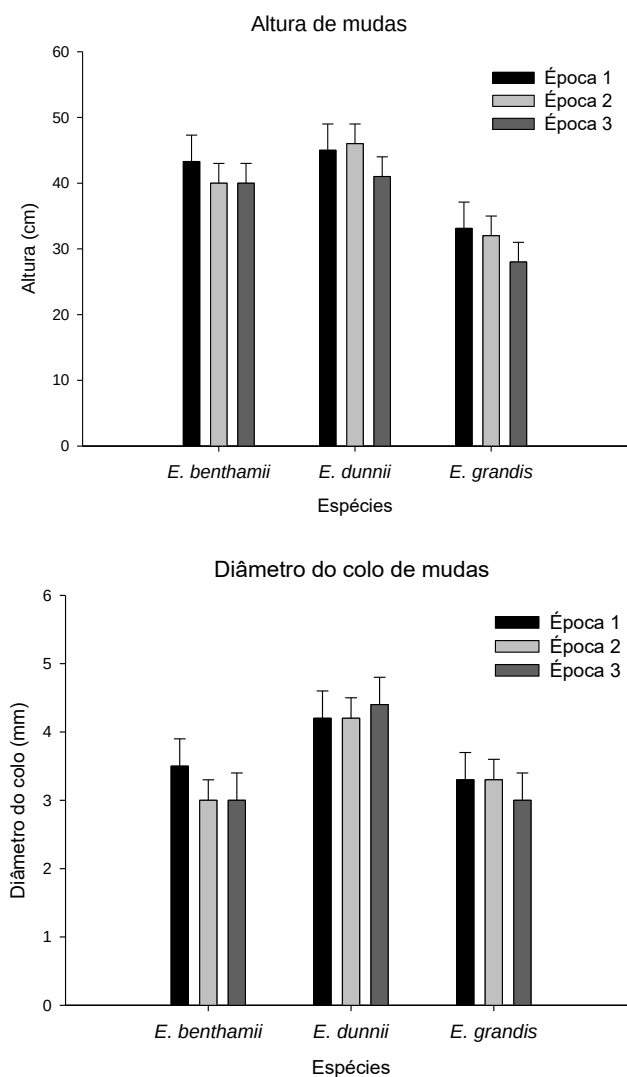
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos a teste de normalidade (teste de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov), homogeneidade das variâncias (testes de Levene e Barlett). Realizou-se a análise da variância para verificar o efeito geral dos tratamentos. Efetuou-se teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$) e regressão linear para os diferentes tratamentos e espécies.

4 RESULTADOS

As mudas, das três espécies avaliadas, possuíam diferentes valores de altura e diâmetro do colo no início dos experimentos, nas três Épocas avaliadas. Foram verificadas em *E. benthamii*, em média, para as três épocas, altura de 42 cm e diâmetro do colo de 3,2 mm; em *E.dunnii*, 45 cm de altura e 4,4 mm de diâmetro e em *E. grandis*, 33 cm de altura e 3,0 mm de diâmetro. Os menores valores foram verificados em mudas de *E.grandis* na Época 2, para altura (média de 28 cm) e na Época 3, para diâmetro do colo (3,0 mm) (Figura 3).

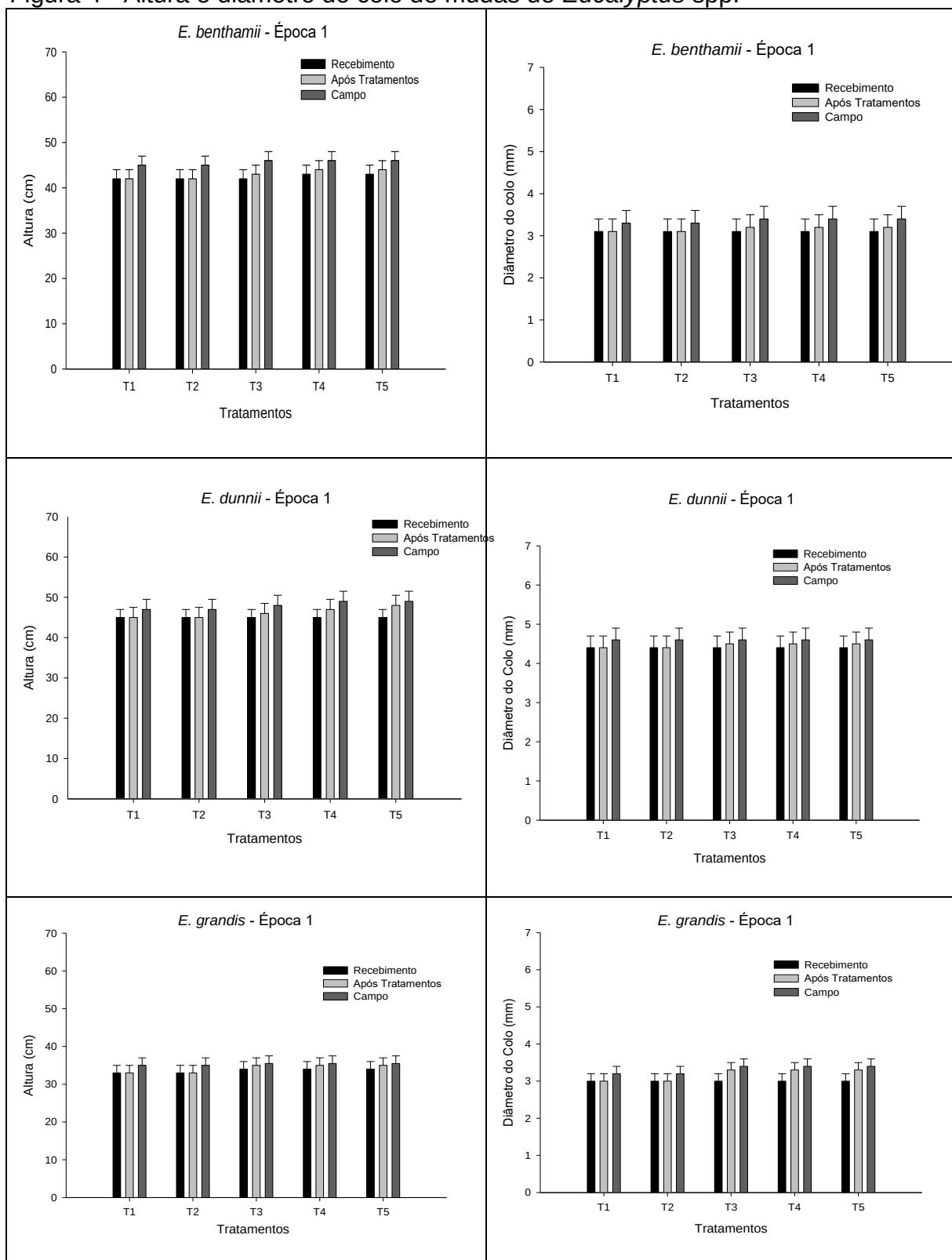
Figura 3 - Altura e diâmetro do colo de mudas de *Eucalyptus* spp. avaliados após o recebimento.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Foi verificado que os valores observados, para essas características, foram estatisticamente mantidos após os tratamentos e permanência no campo (Figura 4).

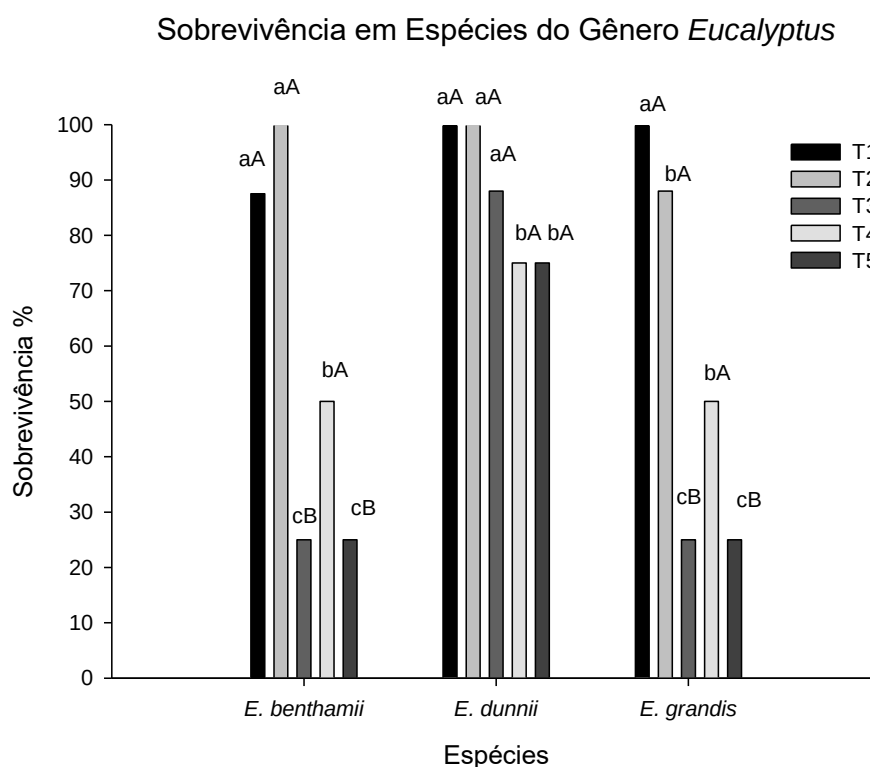
Figura 4 - Altura e diâmetro do colo de mudas de *Eucalyptus* spp.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Já os resultados de sobrevivência das mudas variaram de acordo com o tratamento utilizado. Apesar de apresentar diferenças significativas, mudas de *E. dunnii* demonstraram, de forma geral, os maiores índices de sobrevivência em relação às demais espécies (Figura 5).

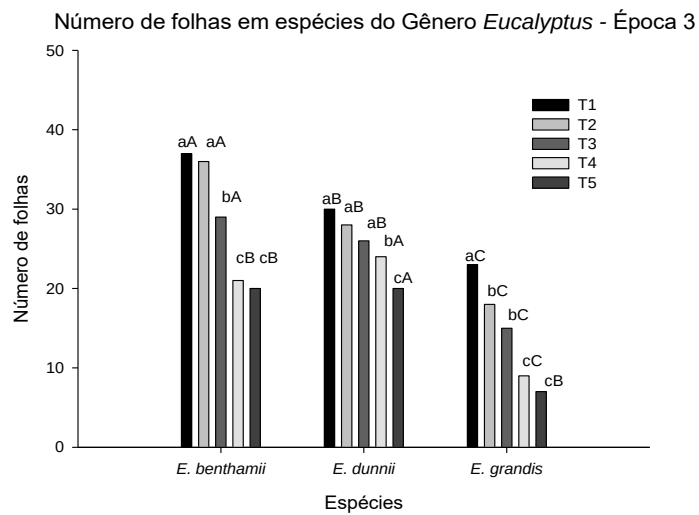
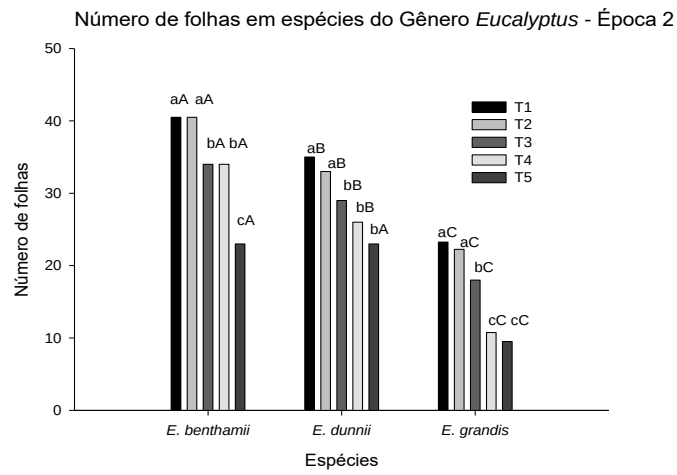
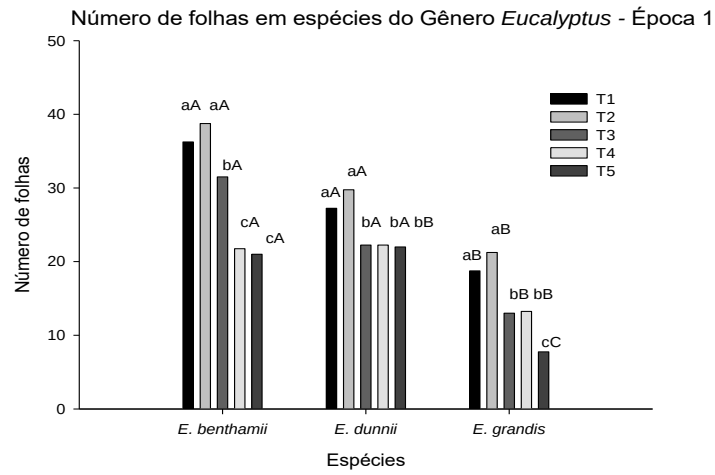
Figura 5 - Sobrevivência (%) de mudas de *Eucalyptus* spp após os tratamentos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Ao avaliar o número de folhas, após cada tratamento, é possível observar que ocorreu a queda independente da espécie analisada, exceto em relação aos tratamentos com somente temperaturas negativas (T2) e testemunha (T1), tanto para *E. dunnii* quanto para *E. benthamii*, independente da época analisada.. De forma geral, houve diferenças estatísticas entre os tratamentos e entre as espécies (Figura 6).

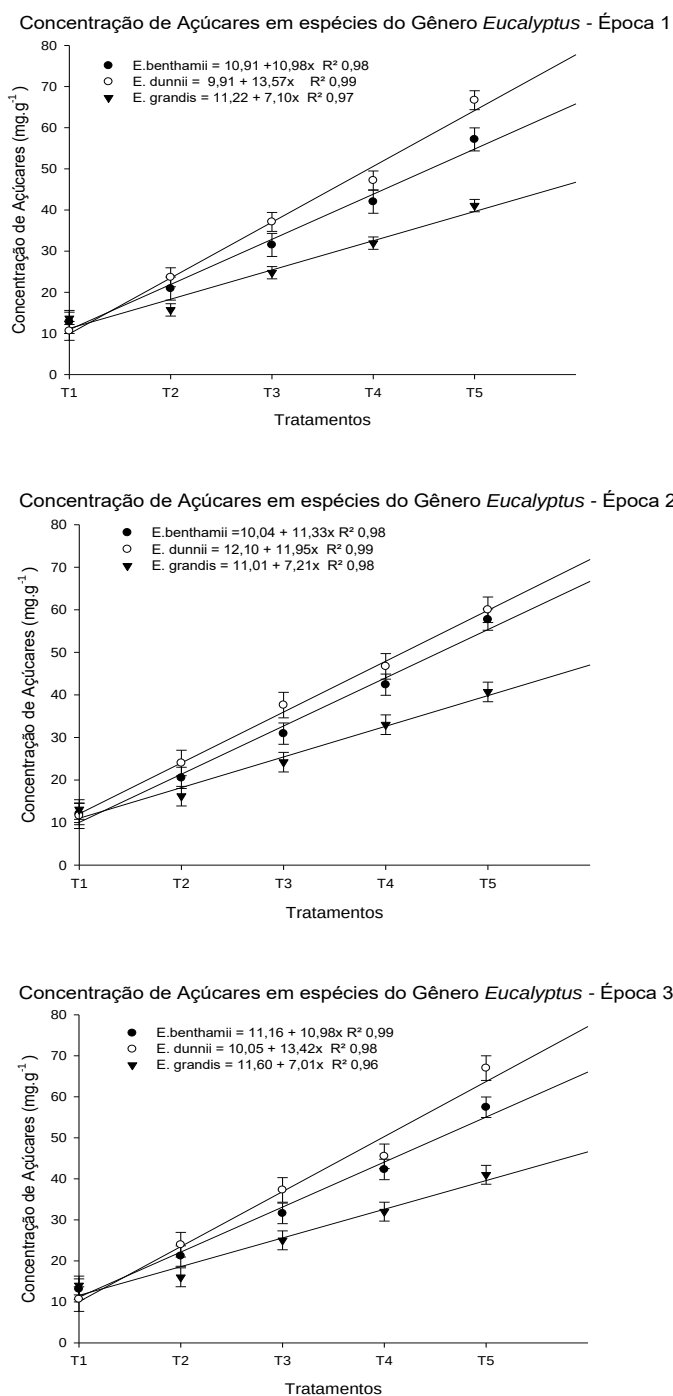
Figura 6 - Número de folhas em mudas de *Eucalyptus* spp. após os tratamentos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Os dados obtidos na análise de açúcares solúveis totais demonstraram aumentos ao longo dos tratamentos, independente da espécie, mas com maior acúmulo em mudas de *E. dunnii*, seguido de *E. benthamii* e *E. grandis* (Figura 7).

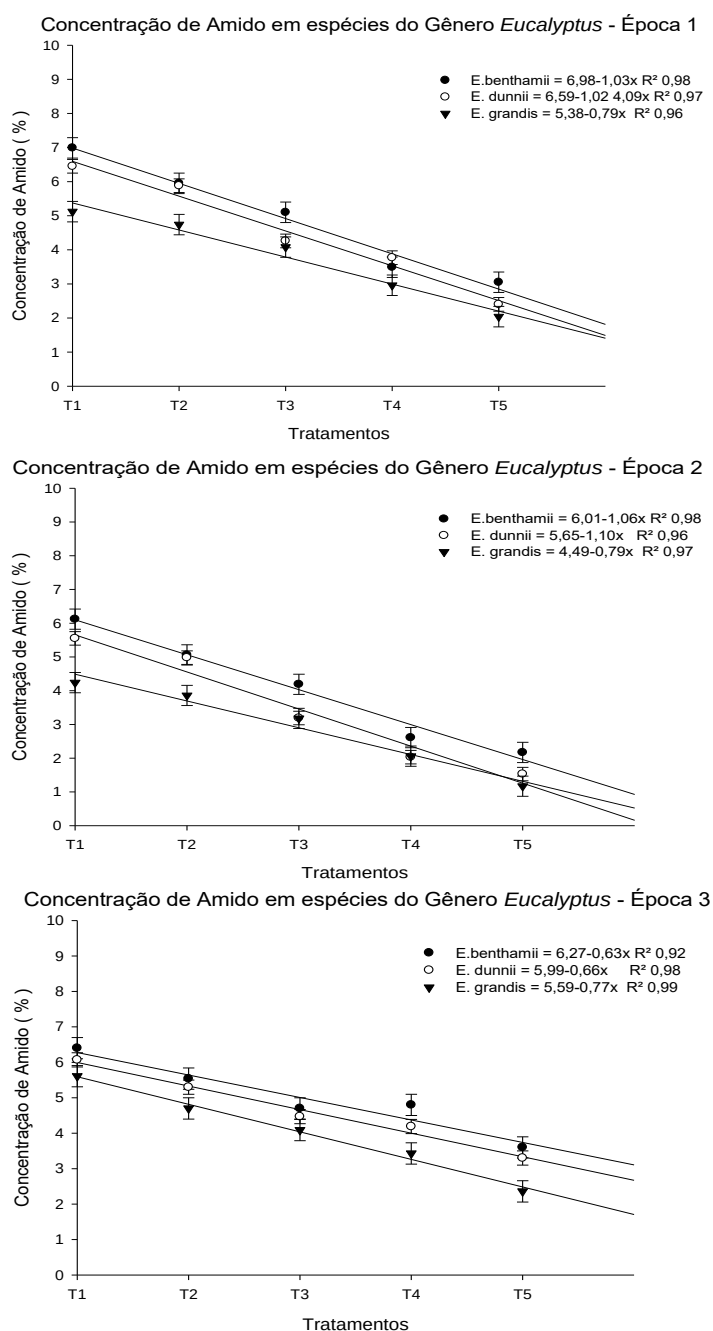
Figura 7 - Concentração de açúcares em mudas de *Eucalyptus* spp.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Os resultados de amido mostram uma queda ao longo dos tratamentos independente da época ou espécie analisada (Figura 8).

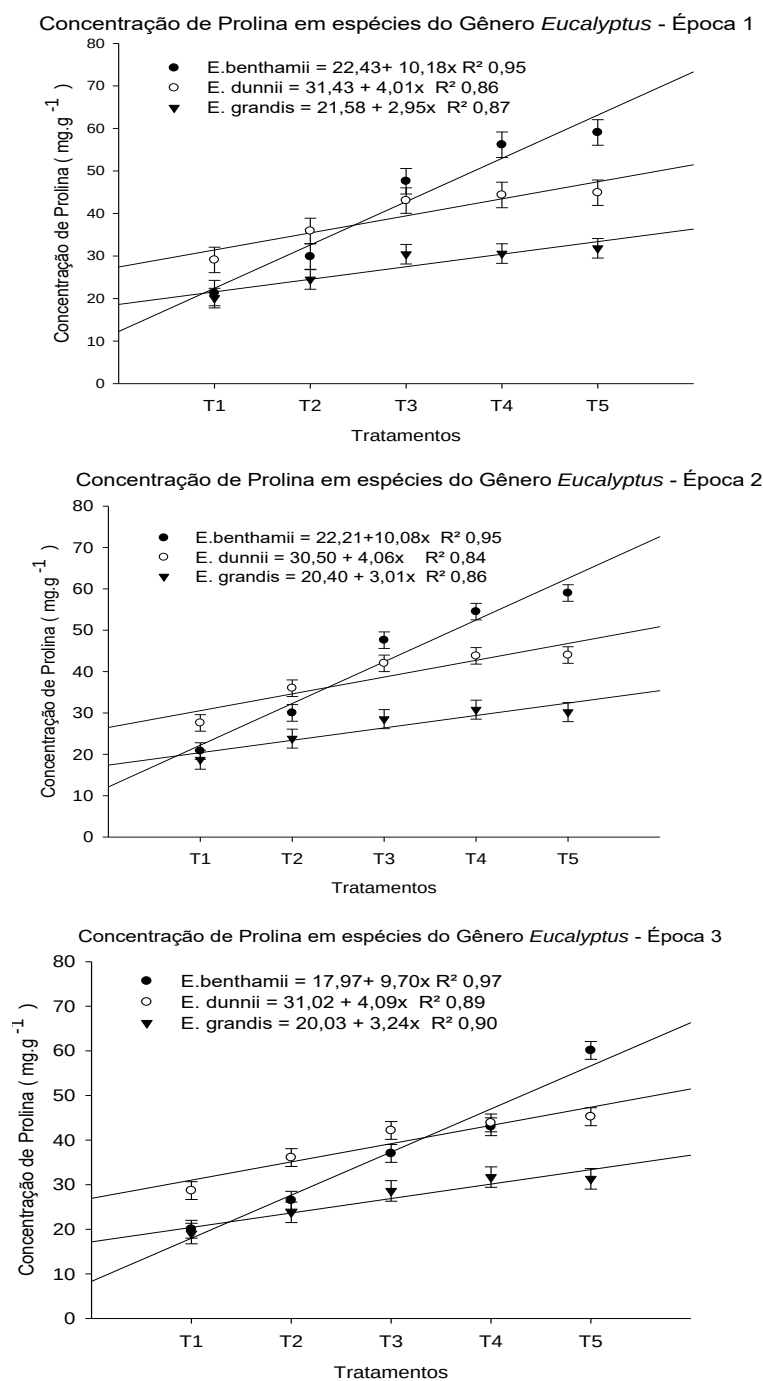
Figura 8 - Concentração de amido em mudas de *Eucalyptus* spp. após os tratamentos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Os valores obtidos para prolina demonstram tendência a maior acúmulo ao longo dos tratamentos (Figura 9), sendo superiores, nos tratamentos T1 e T2, em *E. dunnii*, e em T3, T4 e T5 em *E. benthamii*.

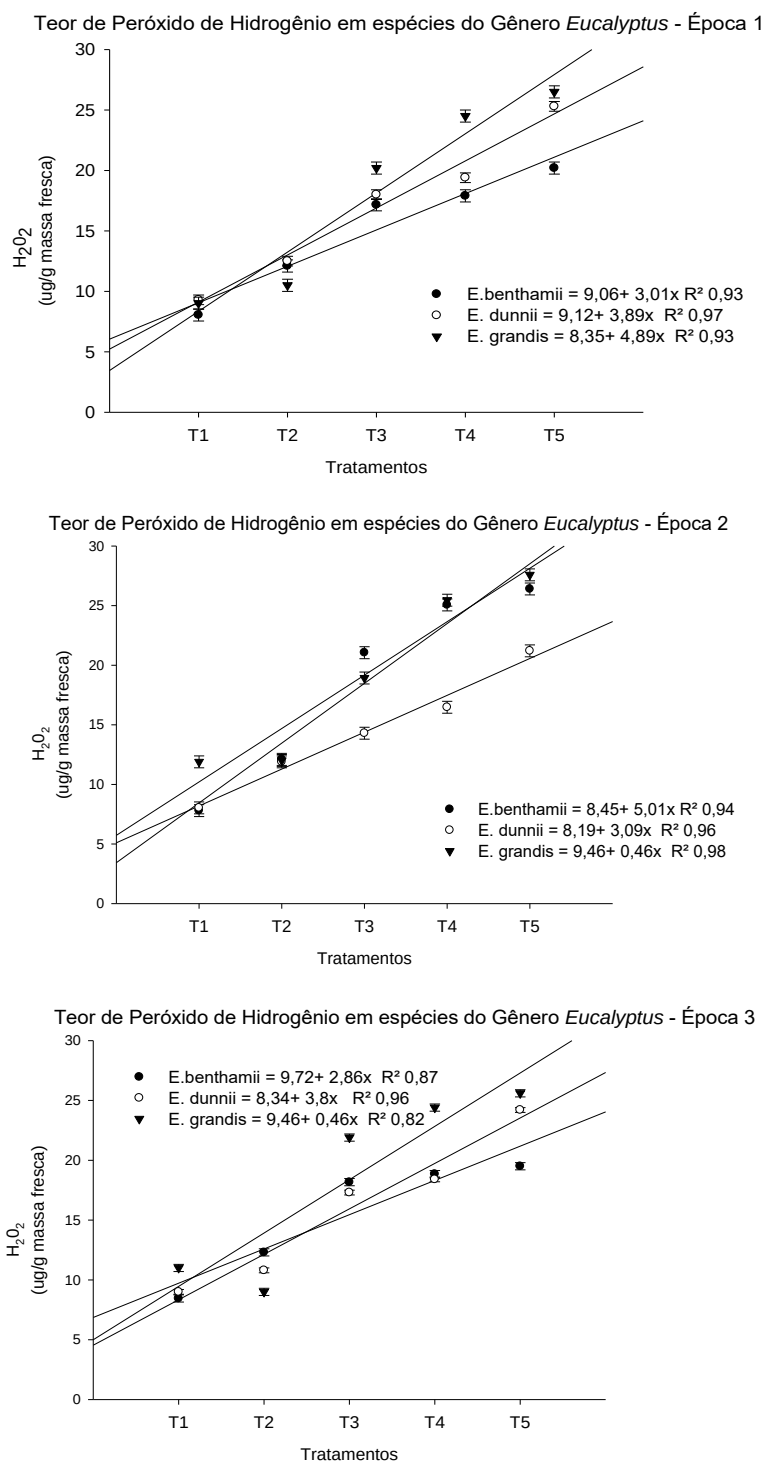
Figura 9 - Concentração de prolina em mudas de *Eucalyptus* spp.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Em peróxido de hidrogênio, ocorreu aumento de concentração, sem diferença entre *E. benthamii* e *E. dunnii*, observa-se maior acúmulo em *E. grandis* (Figura 10).

Figura 10 - Teor de Peróxido de Hidrogênio em mudas de *Eucalyptus* spp.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

5 DISCUSSÃO

A análise estatística aplicada aos resultados mostrou que houve interação entre os tratamentos e espécies ($p < 0,05$), assim como houve diferença significativa entre os resultados das análises bioquímicas obtidas nas mudas dos três ensaios.

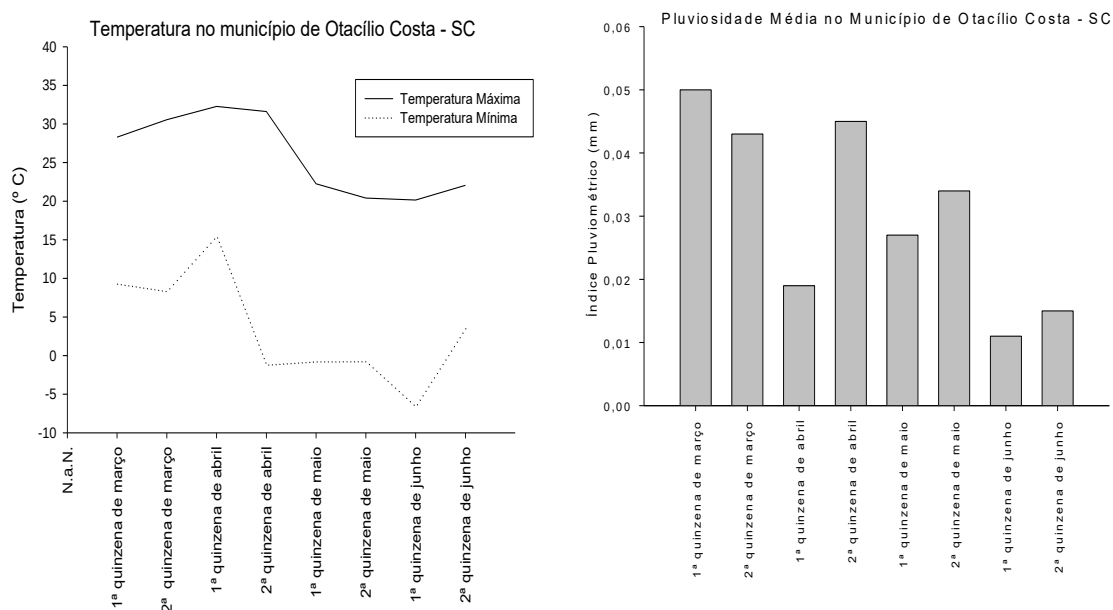
A altura e o diâmetro do colo são os parâmetros morfológicos mais utilizados para avaliação da qualidade de mudas florestais (Binotto et al., 2010). Leles et al. (2000) citam que a altura a partir de 30 cm e diâmetro de colo superior a 1 mm indicam a qualidade da muda. Todas as mudas de todas as espécies obedeceram a esses parâmetros (Figura 3). Já Alfenas et al. (2004) afirmam que mudas de *Eucalyptus* spp de boa qualidade para plantio devem apresentar diâmetro do colo igual ou superior a 4 mm, o que ocorreu, nesse experimento em *E. dunnii*. Em relação à sanidade não foi observado ataque de pragas ou presença de doenças nas mudas das três espécies.

Nota-se que os valores de diâmetro do colo são superiores para *E. dunnii*, o que pode ter contribuído para a maior sobrevivência (Figura 5). Segundo Souza et al. (2006), o diâmetro do colo é um fator fundamental na avaliação do potencial da muda para sobrevivência e bom desenvolvimento após o plantio.

Embora a altura e o diâmetro sejam importantes parâmetros para avaliação de mudas florestais, não devem ser os únicos avaliados (RITCHIE; LANDIS, 2008).

Para determinar os possíveis fatores ambientais que podem ter influenciado na sobrevivência e desenvolvimento das mudas em campo (mudas da Época 1), foram coletados dados de temperaturas média (TM), mínima ($T_{\min}$), máxima ($T_{\max}$), e precipitação (Prec.) no período de 01/03/2016 a 30/06/2016. Os dados foram coletados na estação meteorológicas da empresa Klabin, localizada em Otacílio Costa, SC nas coordenadas geográficas latitude de 27° 50' S e Longitude 50° 15' W (Figura 11).

Figura 11- Temperaturas e Índices pluviométricos nos meses de avaliação em campo no município de Otacílio Costa - SC.



Fonte: Klabin S.A 2018.

Um fator que pode ter contribuído para o comportamento das mudas a campo é que foram encaminhadas para plantio em uma época considerada inadequada, já que na região de estudo o plantio é realizado na primavera ou início do verão (informação pessoal).

A amplitude térmica registrada foi elevada, chegando a quase 33 °C de máxima encontrada (abril) e a mínima de -7 °C (junho), o que pode ter intensificado os danos observados em mudas de *E. dun nii* (Figura 12), como a quebra de dominância apical, conhecidas como repolho, a qual afeta diretamente o desenvolvimento da planta. Apesar da maior sobrevivência das mudas da espécie, em relação às demais, notou-se também que as folhas ficaram arroxeadas, secas e quebradiças após a exposição ao frio. Este fato também observado por Dobner et al.. (2009) em trabalho com a mesma espécie.

A exposição a temperaturas críticas, mesmo acima do ponto de congelamento, pode causar danos foliares, dependendo da idade dos tecidos, estado nutricional e tempo de aclimação (CARAMORI et al., 2001).

Figura 12 - Danos no meristema apical causados, provavelmente, pelo frio. Fenômeno popularmente conhecido como “repolho”.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Em relação à amplitude térmica utilizada nos tratamentos, foi verificado que a redução de temperatura de 20 °C à -8 °C pode ter contribuído para a queda foliar observada ao longo dos tratamentos. Andrade et al. (2008) observaram em *Jatropha curcas* L. que plantas submetidas entre -3 °C e -4 °C tiveram queda foliar, porém com 100 % de recuperação.

Em trabalho realizado em Palma Sola – PR, Moraes et.al., (2014) relatam que em geadas, onde a temperatura chegou a -10 °C, foram observados danos em *E.dunnii*, contudo, apresentaram crescimento médio regular.

Mesmo com danos e queda foliar, a sobrevivência das mudas de *E.dunnii* foi mantida após os tratamentos (Figura 5). Já mudas de *E. benthamii* e *E. grandis* demonstraram comportamento semelhante após a aplicação dos tratamentos, exceto em T2, em que mudas de *E. benthamii* foram superiores em sobrevivência.

Em relação aos tratamentos, em T1 (Testemunha) e T2 (Temperaturas negativas), não foram observadas diferenças na sobrevivência das mudas entre as três espécies estudadas. Enquanto que, as menores sobrevivências, para *E.*

benthamii e *E. grandis*, foram observadas nas mudas dos tratamentos T3 e T5 (Figura 5).

A exposição das mudas previamente a temperaturas negativas, por curto período de tempo, pode ter auxiliado na manutenção da sobrevivência das mudas em campo. Os maiores danos ocasionados por geada nas plantas, segundo Pereira et al., (2001), são observados quando as geadas ocorrem no início do outono, período com atividade vegetativa existente. A ocorrência da geada já no final dessa estação (junho) pode ter contribuído com a tolerância ao frio das mudas.

A presença de substâncias protetoras, como os açúcares solúveis pode ter influenciado no comportamento observado (LARCHER, 2000). No tratamento 5, foram verificadas as maiores concentrações de açúcares solúveis em todas as espécies. A concentração de açúcares solúveis foi superior em *E. dunni*, chegando a média nas três épocas de 66,0 mg.g⁻¹.

O acúmulo de açúcares solúveis totais, ao longo da aclimação, também foi encontrado em mudas de *Eucalyptus* spp, por Moraga et al., (2006) e Floriani et al., (2013), e em plantas de quinoa, por Jacobsen et al., (2007). Esses autores ressaltam que a relação entre a tolerância ao frio e a concentração de carboidratos solúveis totais pode possibilitar a identificação de genótipos tolerantes.

Hincha et al. (2002) observaram que plantas perenes podem acumular carboidratos durante o frio e sob estresse hídrico. Já segundo Sun (1997), os açúcares podem promover a formação de um estado de gel ou vítreo em tecidos secos, o qual se caracteriza por ser um estado amorfo contínuo que tem viscosidade muito elevada. A presença do estado vítreo retarda as reações que podem conduzir à degradação de componentes celulares, impedindo a fusão de membranas e o rompimento dos compartimentos celulares (HOEKSTRA et al., 2002).

Alguns estudos destacam quais açúcares solúveis podem influenciar na tolerância a fatores adversos. Parnanova et al., (2004) comentam que o acúmulo de solutos como sacarose, estaquiose e rafinose, dentre outros, aumenta a retenção de água pelas células, promovendo a tolerância ao congelamento. Stushnoff et al., (1998) notaram um acúmulo de rafinose em plantas de *Viola wittrockiana* durante aclimação ao frio, sendo que esse acúmulo não foi observado em plantas não submetidas à exposição ao frio. Esse mesmo autor indica que uma das funções dos açúcares é a síntese de compostos crioprotetores.

Apesar desse aumento na concentração de açúcares solúveis totais nas mudas das três espécies estudadas, ao longo dos tratamentos, isso não foi suficiente para manter a sobrevivência sem danos em *E. dunnii* (Figura 11).

Em *E. benthamii*, espécie indicada para plantio em regiões frias (MORAES et al, 2014), a síntese desses componentes não foi suficiente para a manutenção da sobrevivência das mudas (Figura 5).

Foi verificado que apesar da queda foliar e da condição de estresse, o aumento da concentração de açúcares solúveis ocorreu, provavelmente, devido às reservas pré-existentes (amido) e não de maior síntese após a exposição ao frio (Figura 8).

As concentrações de amido iniciais eram estatisticamente semelhantes em *E. benthamii* e *E. dunnii*, com valores de 6%. Já *E. grandis* apresentou menores valores, independente da época analisada. As épocas analisadas tiveram diferenças nas concentrações de amido. Enquanto as épocas 1 e 3 a redução foi menos acentuada, na época 2, no tratamento 5, de maior exposição ao estresse, chegou a atingir 1% *E.dunnii*.

Alguns autores relatam que o amido é o principal carboidrato de reserva, sendo inicialmente consumido por conversão, em açúcares solúveis, os quais são usados no processo de respiração para suprimento de energia. O aumento da hidrólise do amido e a síntese de sacarose ocorrem como forma de proteção ao frio (STASSEN, 1980; MARQUAT et al..1999; MARAFON et al., 2007). Nesse sentido, verifica-se que as concentrações de amido em *E. grandis*, espécie considerada menos tolerante ao frio, foram menores em relação às demais espécies, consideradas mais tolerantes.

De acordo com Gardin (2002), o amido é quebrado pela ação de enzimas como as fosforilases e amilases. Quando é necessário elevadas quantidades de glicose, esta reação ocorre somente por através das amilases. Esta degradação auxilia na resistência ao frio, sendo que esse processo de transformação é controlado pelas temperaturas.

Segundo Rodrigues et al.. (2002), no inverno, eleva a atividade da amilase, sacarose-6-P-sintase e sacarose-sintase nos tecidos lenhosos e da casca, convertendo amido em glicose e sacarose. Esses carboidratos solúveis devem prover energia e substratos para o crescimento até a chegada da primavera.

Em frutíferas, Rakngan (1995) e Rodrigues et al., (2002) observaram que o conteúdo de amido aumenta durante o período de crescimento vegetativo e decresce durante o inverno, e o conteúdo de açúcares solúveis é aumentado, como verificado nesse trabalho.

De acordo com Hincha et al., (2002), talvez os açúcares não sejam os únicos componentes que auxiliem as plantas em condições de estresse térmico. Muitas proteínas, como a prolina, são também induzidas pelo frio; e segundo esses autores, essas proteínas são capazes de estabilizar estruturas intracelulares sob condições de estresse.

Em relação à prolina, as espécies tiveram comportamento similares nas três épocas. Nos tratamentos T4 e T5, sem diferença significativa entre eles, as mudas de *E. benthamii* se destacaram numericamente, chegando a atingir em média para as épocas $57,0 \text{ mg.g}^{-1}$. Porém, pelos resultados obtidos, sugere-se que não haja relação entre as concentrações de prolina e a tolerância ao frio das mudas das espécies estudadas. Pois mesmo com o aumento de tempo a exposição ao frio, observa-se uma estabilização nas concentrações de prolina nos tratamentos T4 e T5 para todas as espécies estudadas.

Esses resultados diferem dos observados por Dibax et al., (2010), que relatam aumento significativo nos níveis de prolina em *E. saligna*, em plantas adaptadas ao estresse térmico quando comparadas às plantas controle. Almeida et al., (1993), trabalhando com o híbrido *E. cypelloarpa* X *globulus*, mostraram relação entre o conteúdo foliar de prolina e a tolerância ao frio. Essa relação também parece ocorrer em *Theobroma cacao* (Quiñones-Galvez et al., 2015) e *Cajanus cajan* (L.) Millsp (Silva et al., 2015)

Já Floriani et al., (2011) observaram que o incremento na tolerância ao frio em *E. dunnii* em resposta ao aumento no período de aclimação, não possui relação com os teores foliares de prolina. O valor médio de prolina, encontrado por esses autores em *E. dunnii*, foi de $48,5 \text{ mg.g}^{-1}$.

Outro componente quantificado foi o peróxido de hidrogênio. Em todas as avaliações houve aumento na sua concentração. A concentração inicial maior é observada em *E. grandis* com $10 \text{ } \mu\text{g/g}$, com aumento de até $27 \text{ } \mu\text{g/g}$ no T5. A espécie *E. dunnii*, época 2, apresentou o menor acréscimo de peróxido de hidrogênio ao longo dos tratamentos, variando de $8 \text{ } \mu\text{g/g}$ na testemunha (T1) até $20 \text{ } \mu\text{g/g}$ no tratamento com 21 dias de aclimação (T5) (Figura 10).

As plantas expostas ao estresse podem não apresentar injúrias visíveis (T1), mas seu sistema antioxidante pode estar alterado, e, por meio da quantificação de substâncias reativas ao oxigênio (EROs), pode-se detectar se as condições em que a planta se encontra (CHAITANYA et al., 2002).

Essas respostas variam não somente entre espécies, como também entre plantas da mesma espécie em diferentes estádios de desenvolvimento e entre folhas da mesma planta, em fases distintas de desenvolvimento (Klump et al., 2000). Em sementes, Lehner et al., (2007) associaram a perda de viabilidade o aumento de H_2O_2 . O acúmulo observado ao longo dos tratamentos mostra que as mudas estão com a condição de estresse máxima, podendo influenciar não somente em seu desenvolvimento, como também na sua sobrevivência. Salienta-se que o maior acúmulo de peróxido de hidrogênio foi verificado em mudas de *E. grandis*.

Pode-se observar que *E. dunnii* apresentou maior sobrevivência em plantio na época não convencional (março). A qualidade inicial de suas mudas e a produção de açúcares solúveis, sua menor concentração de peróxido de hidrogênio e maior degradação de amido provavelmente, favoreceu seu desempenho em campo. Mesmo assim, o frio ocasionou danos que podem interferir na qualidade da árvore (Figura 12).

Ferreira (1989), Balmelli (1993), Higa et al., (1997) e Dobner et al., (2009) comentam que danos ao meristema apical, causados pela geada, podem bifurcar ou ramificar o eixo principal de crescimento da árvore, os quais comprometam a qualidade da madeira. Pinheiro et al., (2006) afirmam que somente a sobrevivência das plantas não indica se a espécie possui potencial produtivo para determinada região. Deve-se verificar a adaptação, como o crescimento retilíneo e sem bifurcações, forma de copa, adaptação às doenças e pragas.

Gomes et al., (2002) citam que se cultivadas em condições adversas, as mudas deverão estar com um padrão de qualidade tal que permita que sobrevivam; entretanto, foi observado que as mudas que foram levadas a campo e que resultaram em menor sobrevivência haviam passado por maiores períodos de estresse (T3, T4 e T5).

Segundo Renaut et al., (2005), a intensidade e o tempo de exposição a estresses ambientais podem gerar danos, sendo preciso avaliar esses fatores para cada espécie. Assim, o estresse em níveis moderados pode permitir aclimação, adaptação e tolerância, mas em níveis mais severos, relacionados à intensidade e

tempo, pode levar a morte celular (KRANNER et al., 2010). Há relatos que o aumento de tolerância ao frio, em resposta à aclimação, pode ser alcançado pela exposição ininterrupta das plantas a temperaturas de 0 °C a 10 °C (LEVITT, 1980; NILSEN; ORCUTT, 1996) ou de 5 °C a 15 °C, uma vez que essa faixa de temperatura pode variar entre espécies (LARCHER, 2000).

As mudas que passaram somente por temperaturas negativas (Figura 5) tiveram um índice maior de sobrevivência que as espécies aclimatadas. Observa-se que *E. dunnii* se mostrou a espécie com maior tolerância ao frio mesmo em condições regulares e alternativas de plantio. Além disso, apresentou menores concentrações de peróxido de hidrogênio, maiores concentrações de açúcares solúveis e maior degradação de amido nos tratamentos aplicados. A atuação dos açúcares não é o componente único que evita formação de cristais de gelo os quais danificaram a membrana e levaram a letalidade das mudas. São necessárias mais pesquisas para verificar como induzir e determinar a tolerância ao frio. Nas espécies e nas condições avaliadas, a aclimação prévia não foi eficaz para a manutenção da qualidade inicial e desenvolvimento das mudas. Conforme o experimento realizado a aclimação não é recomendada.

6 CONCLUSÃO

A sobrevivência foi mantida em mudas de *E dunnii* ao serem expostas a aclimatação e temperaturas negativas. Porém, a perda da gema apical, pode fazer com que seu fuste se desenvolva com menor qualidade, fator indesejado pela indústria madeireira.

As espécies analisadas tiveram aumento nas concentrações de açúcares ao longo dos tratamentos. A concentração em *E. dunnii* foi superior às outras espécies. A concentração de peróxido de hidrogênio foi mais significativa em *E. grandis*, espécie que possui menor tolerância ao frio. A espécie *E. dunnii* apresentou maior tolerância ao estresse térmico nas variáveis estudadas.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. et. al., **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. p. 442, 2004.
- ALMEIDA M.H, ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G. Cold acclimation in *Eucalyptus* hybrids. **Tree Physiol**, Oxford, v.14, p. 921-932, mar. 1994.
- ANNICCHIARICO, P. et al. Variation in cold tolerance and spring growth among Italian white clover populations. **Euphytica**, Wageningen, v.122, p.407-416, jun. 2001.
- ANDRADE, R.N.; ANGELO, A.C. CRESCIMENTO INICIAL DE *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage E *Eucalyptus dunnii* Maiden. EM GENERAL CARNEIRO – PR.. **Floresta**, Curitiba, v. 36, n. 12, p. 27-36, jan. 2016.
- APEL, K.; HIRT, H.; Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu. **Rev. Plant Biol**, Bethesda, v.55, p. 373-399, ago. 2004.
- APOSTOL, I.; HEINSTEIN, P.F.; LOW, P.S.; Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. **Plant Physiol**, Bethesda, v. 99, p.109–116, set.1989.
- ASHRAF, M.; AKRAM, N. A.; AL-QURAINY, F.; FOOLAD, M. R. Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators and mineral nutrients. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 111, n.1, p. 249- 296, mai. 2011.
- ASSIS, T.F. E MAFIA, R.G. Hibridação e Clonagem. In: Borém, A. **Biotecnologia Florestal**. Viçosa MG, Editora UFV. p 93-121 2007.
- ARNOLD, R. J.; CLARKE, B; LUO, J. **Trials of cold-tolerant eucalypt species in cooler regions of southcentral China**. Canberra, v.57, 106p. 2004
- BALMELLI, G. Daño de Heladas en *Eucalyptus*: Evaluacion de daño en especies y orígenes en el primer invierno. Tacuarembó: **Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria**, v.40, 93-99, out, 1993.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, out. 2006.

BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, Hague, v.39, p.205-207, dez.1973.

BATTIE-LACLAU, P.; BERI, C.; MIETTON, L. Photosynthetic and anatomical responses of Eucalyptus grandis leaves to potassium and sodium supply in a field experiment. **Plant, Cell & Environment**, Lavras, v.37, n.1, p.70-81, mai. 2014.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC). [Exportação dos principais produtos florestais brasileiro] In: **Aliceweb**. Brasília, 2017. Disponível em: <<http://alicesweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acesso em: 22 mai. 2018.

BERTOLA, A. Eucalipto - 100 anos de Brasil, “**falem mal, mas continuem falando de mim!**”. 2004. Disponível em < <http://www.celso-foelkel.com.br/>> acesso em 30 de jul. 2016.

BINOTTO, A. F.; LUCIO, A.D.; LOPES, S.J. Correlations between growth variables an the Dickson quality index in Forest seedlings. **Revista Cerne**, Lavras, v. 16, n. 4, p. 457-464, fev. 2010.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P. **Introdução à química de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 223p. 2003.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**. 2a ed. Andover, Intercept, 1119 p, 1999.

CALORI, J. V.; KIKUTI, P. Propriedades físicas e mecânicas da madeira de Eucalyptus dunnii aos 20 anos de idade. In: IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypts, 1997. **Proceedings**. Colombo,. v.3, p.127-140, ago.1997.

DELAUNEY, A.J., VERMA D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **Plant Journal**; Oxford, v.4, p. :215–223; mar.1993.

DIBAX, R.; DESCHAMPS, C.; BESPALHOK FILHO, J, C.; VIEIRA, L. G. E.; MOLINARI, H. B. C.; CAMPOS, M. K. F. DE; QUOIRIN, M. Organogenesis and Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of Eucalyptus saligna with P5CS gene. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 54, n. 1, p. 6-12, dez. 2010.

DOBNER Jr., M.; HIGA, A. R.; SEITZ, R. A. Efeito da Cobertura de *Pinus taeda* L. na Proteção contra Geadas e no Crescimento de Plantas Jovens de *Eucalyptus dunnii* MAIDEN. **FLORESTA**, Curitiba, PR, v. 39, n. 4, p. 807-823, out./dez. 2009.

DURYEA, M.; McCLAIN, K. Altering seedling physiology to improve reforestation success. In: Proceedings of the Physiology Working Group Technical Session, Seedling Physiology and Reforestation Manual, Success I. (16th - 20th October, 1983, Oregon, USA). **Society of American Foresters National Convention Portland**. Oregon, v.13, p. 77-114, out, 1984.

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

FERREIRA, F. A. Patologia florestal: principais doenças florestais do Brasil. Viçosa, 335p, 1989.

FAO .FLORESTAS do Brasil em resumo: dados de 2010-2015. Brasília, DF: Serviço Florestal Brasileiro, 152 p, 2016.

FERREIRA, M.; SANTOS, P.E.T. Melhoramento genético florestal dos Eucalyptus no Brasil – breve histórico e perspectivas. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTUS, 1997, Salvador. **Anais...**Colombo, v.1, p.14-34. Dez.1997.

FERREIRA, Aurélio Buarque de Holanda. **Dicionário Aurélio Básico da Língua Portuguesa**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 445p, 2013

FINKEL, T.. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**. v.408, p.239-247, mar.2000.

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. **Rev. Árvore**, Viçosa , v. 35, n. 1, p. 21-29, Fev, 2011.

FLORIANI, M. M. P; STEFFENS, C.A; E CHAVES, 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, jan.-mar. 2013.

GOMES, J. M.; COUTO, L.; LEITE, H. G.; XAVIER, A.; GARCIA, S. L. R. Parâmetros morfológicos na avaliação da qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v.26, n.6, p.655-664, mar, 2002.

GONZAGA, J.V. **Qualidade da madeira e da celulose Kraft de treze espécies de Eucalyptus**. Viçosa/MG, UFV, 1983. 119p.

GRAÇA, M. E. C.; SHIMIZU, J. Y.; TAVARES, F. R. Capacidade de rebrota e de enraizamento de *Eucalyptus benthamii*. In: **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 39, p. 135-138, 1999.

GUY, C.L. Freezing tolerance of plants: current understanding and selected emerging concepts. **Canadian Journal of Botany**. Quebec. v. 81, p. 1216-1223, out, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. **Method in Enzymology** v.186 p.1-85, set, 1984

HARE, P.D., CRESS W.A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**; New York, v.21, p.79–102, mai, 1999.

HIGA, A.R.; CARVALHO, P.E.R. de. Sobrevivência e crescimento de doze espécies de eucalipto em Dois Vizinhos, Paraná. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO 6, 1990, Campos do Jordão. **Anais**. São Paulo: SBS, 1990. p.459-461. Publicado em Silvicultura, v.3, n.42, 1990.

HIGA, R. C. V.; HIGA, A. R.; TREVISAN, R.; SOUZA, M. V. R. Comportamento de Vinte Espécies de *Eucalyptus* em Área de Ocorrência de Geadas na Região Sul do Brasil. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. Proceedings... Colombo: EMBRAPA, 1997. v. 4.

HINCHA, D. K., ZUTHER, E., HELLWEGE, E. M. e HEYER, A. G. Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. **Glycobiology** v.12 p.103-110 2002.

HOEKSTRA, F.A., GOLOVINA, E.A. & BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. Trends in **Plant Science**. Limerick v. 6 p431-438. Jan, 2001.

IBÁ. INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. Relatório Estatístico 2014, Brasília, **Ibá**, São Paulo, 79p. 2017.

IPEF. Eucalyptus doados pelo IPEF sobrevivem ao rigoroso inverno americano. **IPEF Notícias**. Piracicaba, n. 207, p. 6, jan/fev, 2011.

JACOBSEN, S. E; MONTEROS, C.; CORCUERA, L.J.; BRAVO, L.A Frost resistance mechanisms in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). **European Journal of Agronomy**, v. 26, n. 4, p. 471-475, 2007.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima,. 398 p. 2007.

KAVI-KISHOR, P.B, SANGAM S; AMRUTHA R.N; SRI-LAXMI P .Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Curl. Sci.** v.88 p.3-15, mar,2005.

KJAER, E.; THOMSEN, A.; LARSEN, A.B.; Strategies for conservation of forest genetic resources. Conservation of *Eucalyptus benthamii*: an endangered eucalypt species from eastern Australia. In: **FAO, FLD, IPGRI**. . Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute, v. 1,. p. 5-24. 2004.

KLOTKE, J., KOPKA, J., GATZKE, N. e HEYER, A. G. Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation – evidence for a role of raffinose in cold acclimation. **Plant, Cell and Environment**. Lavras, v.27, p.1395-1404. 2004.

KOSTER, K. L.; LEOPOLD, A.C.; MEYER, L.M. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant physiology**, Bethesda. v.88 p. 829-832, 1988

KOSTER, K.L.Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology** Bethesda. v.96, p.302-304. 1991.

KRANNER, I.; MINIBAYEVA, F. V.; BECKETT, R. P.; SEA, C. E. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, v.188, p. 655–673, 2010.

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

LELES, P.S.; MORGADO, I. F.; NUNES, F.J. Qualidade de mudas de *Eucalyptus spp.* produzidas em blocos prensados e em tubetes. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 24, n. 1, p. 13-20, 2000.

LIANG, X., ZHANG, L., NATARAJAN, S. K.; BECKER, D. F. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid. Redox Signal. Front Plant Science*, v.19, p. 998–1011. Jul.2013.

LORENZI, H. **Arvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum.. 368 p. 2003.

LUTTS, S.; MAJERUS, V.; KINET, J.-M. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Physiologia Plantarum**, v.105, p.450-458, 1999

MAGGIO, A.; MIYAZAKI, S.; VERONESE, P.; FUJITA, T.; IBEAS, J. I; DAMSZ, B.; NARASIMHAN, M. L; HASEGAWA, P. M.; JOLY, R. J.; BRESSAN, R. A. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? **The Plant Journal**, Heslington, v. 36, n. 6, p. 699-712, mar, 2002.

MARADEI, D., REPETTI, R., ZILLI, N. **E. dunnii, un nuevo recurso forestal para la industria**. ATIPCA, Buenos Aires, v. 27, n. 4, p. 43-53, ago. 1988.

MARCO, M. A.; LOPEZ, J. A. **Performance of Eucalyptus grandis and Eucalyptus dunnii in the Mesopotamia region, Argentina**. In: CRCTHF-IUFRO CONFERENCE, 1995, Hobart. Eucalypt plantations: improving fibre yield and quality. Hobart: CRC. p. 40-45, 1995.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, p.91-142, 2005.

MORAES, C. B.; FREITAS, T. C. M.; PIERONI, G. B.; ZIMBACK, L.; RESENDE, M. D. V.; MORI, E. S. Estimativas dos parâmetros genéticos para seleção precoce de clones de *Eucalyptus* para região com ocorrência de geadas. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 42, n. 102, p. 219 - 22, 2014.

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

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

NISGOSKI, S.; MUÑIZ, G. I. B. de; KLOCK, U. Caracterização anatômica da madeira de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 8, n. 1, p. 67-76, 1998.

PALONEN, P.; JUNTILA, O. Cold hardening of raspberry plants in vitro is enhanced by increasing sucrose in the culture medium. **Physiologia Plantarum**, vol. 106, no. 4, p. 386-392, 1999.

PALUDZYSZYN FILHO, E; FERNANDES, J. S. C; RESENDE, M. D. V. de. Avaliação e seleção precoce para crescimento de Pinus taeda. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília , v. 37, n. 12, Dec. 2002.

PARVANOV, D., IVANOV, S., KONSTANTINOVA, T., KARANOV, E., ATANASSOV, A., TSVETKOV, T. Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress. **Plant Physiology and Biochemistry** v.42. p:57-63. Jul.2004.

PARVIAINEN, J. V. Qualidade e avaliação da qualidade de mudas florestais. In: SEMINÁRIO DE SEMENTES E VIVEIROS FLORESTAIS, 1.Curitiba. **Anais...** Curitiba: FUPEF, 1981. p.59-90. 1981.

PIRES, C. L. da S.; PARENTE, P. R. Comparison of species and provenances of Eucalyptus in the Mogi Mirim region, São Paulo. **Boletim Técnico do Instituto Florestal de São Paulo**, v. 40, p. 314-325, 1986.

PRASAD, T.K.; ANDERSON, M.D.; STEWART, C.R.; Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. **Plant Physiol.** v.105, p.619–627.1994.

PRUDENTE, D.O; PAIVA, R; NERY, F.C; PAIVA, P.D.O, REIS, M.V; SILVA L.C; Criopreservação de Gemas Laterais de Mangabeira: o Papel da Prolina. **Revista Saúde e Ciência**. São Paulo. v.3. p. 86-93, set-dez, 2014.

QUINONES-GALVEZ, Janet et al.. Caracterización bioquímica de hojas de clones de Theobroma cacao y su relación con los tricomas. **Rev. colomb. biotecnol** [online], vol.17, n.2, p.33-43. Ago. 2015.

RENAUT, J. HOFMANN, L. e HAUSMAN, J.F. Biochemical and physiological mechanisms related to cold acclimation and enhanced freezing in poplar plantlets. **Physiologia Plantarum** v.125, p.82-94. Set-Out, 2005.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil – manual de dendrologia brasileira**. Edgard Blücher, 2ª Ed. São Paulo, 304p. 1988.

ROCHA, M. P.; TOMASELLI, I. Efeito de modelo de desdobro na qualidade da madeira serrada de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus dunnii*. **Cerne**, Lavras, v. 8, n. 2, p. 70-83, 2002.

RODERJAN, C. V. **O gênero Eucalyptus L’Herit (1788)–Myrtaceae**. Nota. Departamento de Silvicultura e Manejo – Setor de Ciências Agrárias – Universidade Federal do Paraná. 1p. 1999.

SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, D.S. Stress induced injury and antioxidant enzymes in relation to drought tolerance in wheat genotypes.-**Biol. Plant**. v. 40. p.357–364, 1997/98.

SILVA, J. C. *et al.*. Eucalipto: a madeira do futuro. **Revista da Madeira**, edição especial, 114p. 2001.

SILVA, A. L. L.; OLIVEIRA, Y; ALCANTARA, G. B.; Santos, M.; Quoirin, Tolerância ao resfriamento e congelamento de folhas de eucalipto. **Biociências**, v.17, p.86-90. 2009.

SILVA, J.; SACCINI, V. A. V.; SANTOS, D. M. M. dos Estresse térmico no acúmulo de prolina livre de plântulas de guandu oriundas de sementes tratadas com poliaminas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 103-122, jan./fev. 2015

SILVEIRA, J. A. G.; ROCHA, I. M. A.; VIÉGAS, R. A. Metabolic responses of cowpea and cashew plants exposed to salt and water stress: new aspects on proline accumulation. 2002.

SMIRNOFF N.;CUMBES, Q.J.Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry** v.28 p.1057–1060, jul,1989.

SOUZA, C. A. M.; OLIVEIRA, R. B.; MARTINS FILHO, S.; LIMA, J. S. Desenvolvimento em campo de espécies florestais em diferentes condições de adubação. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.16, p.243-249, set. 2006.

STUSHNOFF, C. E SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of apple (*Malus* species) genetic resources. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 32, Cryopreservation of Plant Germplasm I**. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, v.15.p. 87-101.1998.

SUN, W.Q. Glassy state and seed storage stability: the WLF kinetics of seed viability loss at T-Tg and the plasticization effect of water on storage stability. **Ann Bot** v.79, p.291–297, 1997.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, Netherlands, v. 15, n. 2, p. 89-97, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Sunderland: Sinauer Associates, 764p. 2006.

TINUS, RW.;BURR, K.E.; ATZMON,N. and RIOV, J. Relationship between carbohydrate concentration an root growth potential in coniferous seedlings from three climate during cold hardening and dehardening. **Tree Physiology**, v.20,n.16, p.1097-1104, 2000.

TRAVERT, S.; VALERIO, L.; FOURASTE, I.; BOUDET, A.M. and TEULIERES, C. Enrichment in specific soluble sugars of two eucalyptus cell-suspension cultures by various treatments enhances their frost tolerance via a noncolligative mechanism. **Plant Physiology**, v. 114, n.4, p. 1433-1442, 1997.

TURNBULL, J.W. and ELDRIDGE, K.G. The natural environment of Eucalyptus as the basis for selecting frost resistance species. In: **Proceedings of IUFRO/AFOCEL symposium on frost resistant Eucalyptus**. (26th - 30th September, Bordeaux, France). p. 43-62,1983.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: A review. **Amino Acids**, Wien, v. 35, p. 753-759, 2008.

VERSLUES, P.E., BRAY E.A. Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. **Journal of Experimental Botany**;v.57. p.201–212. Mai, 2006.

WANG, G.; ARNOLD, R. J.; GARDINER, C. A.; ZHANG, J.; WU, Z. Seed source variation for growth in *Eucalyptus dunnii*; results from trials in south central China. **Australian Forestry**, Canberra, v. 62, n. 2, p. 120-127, 1999.

WANNER, L; JUNTILLA, O. Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Physiol** Bethesda, v.120 p.391–400, 1999.

WILCKEN, C. F.; LIMA, A. C. V.; DIAS, T. K. R.; MASSON, M. V.; FERREIRA FILHO, P. J.; POGETTO, M. H. F. A. D. **Guia prático de manejo de plantações de eucalipto**. Botucatu: FEPAF. 25 p. 2008.

YAMADA, T., KURODA, K., JITSUYAMA, Y., TAKEZAWA, K., ARAKAWA, K. & FUJIKAWA, S. Roles of the plasma membrane and the cell wall in the responses of plant cells to freezing. **Planta** v.215. p. 770-778. 2002.

YEO, A.R. Physiological criteria in screening and breeding. In: YEO, A.R.; FLOWERS, T.J. (Ed). **Soil mineral stresses: approaches to crop improvement**. Berlin: SpringerVerlag, v.16.p. 37-60. 1994.