

PRISCILLA FÉLIX SCHNEIDER

**RELAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO FRIO DE ESPÉCIES DO
GÊNERO *Eucalyptus* E *Pinus* COM A PRESENÇA DE
CARBOIDRATOS TOTAIS EM SEMENTES E MUDAS**

Dissertação apresentada a
Universidade do Estado de Santa
Catarina como requisito para a
obtenção do título de Mestre em
Produção Vegetal

Orientadora: Profa. Dra. Luciana
Magda de Oliveira

**LAGES
2014**

S359r Schneider, Priscilla Félix
Relação da tolerância ao frio de espécies do gênero *Eucalyptus* e *Pinus* com a presença de carboidratos totais em sementes e mudas / Priscilla Félix Schneider. - Lages, 2014.
119 p: il. ; 21 cm

Orientadora: Luciana Magda de Oliveira
Bibliografia: p. 117-119
Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2014.

1. Açúcares. 2. Descongelamento. 3. Tolerância ao frio. I. Schneider, Priscilla Félix. II. Oliveira, Luciana Magda de. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. IV. Título

CDD: 631.521 - 20.ed.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do
CAV/ UDESC

PRISCILLA FÉLIX SCHNEIDER

**RELAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO FRIO DE ESPÉCIES DO
GÊNERO *Eucalyptus* E *Pinus* COM A PRESENÇA DE
CARBOIDRATOS TOTAIS EM SEMENTES E MUDAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Banca Examinadora

Orientadora: _____

Profa. Dra. Luciana Magda de Oliveira

Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro: _____

Prof. Dr. Cristiano André Steffens

Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro:  _____

Dra. Elisa Serra Negra Vieira

Embrapa Florestas

Lages, SC, 27 de fevereiro de 2014.

DEDICATÓRIA

Dedico à minha
família!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, saúde e força para continuar todos os dias.

Aos meus pais, Ivanei Cruz Schneider e Zenaide Félix Schneider, que sempre me apoiaram nos meus estudos, não somente financeiramente, mas também com palavras de incentivo.

À minha irmã Aline Félix Schneider pela ajuda no início do experimento e por ser um exemplo a ser seguido como pesquisadora!

Ao meu noivo, Leonardo Muniz, meu grande parceiro! Esteve ao meu lado nos momentos de nervosismo e mesmo sem entender o que eu fazia, me apoiou, pois sabia da importância do meu trabalho para mim.

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

À minha orientadora Profa. Luciana Magda de Oliveira pela oportunidade, pela amizade sincera, orientação, dedicação e paciência durante os ensinamentos científicos, além de incentivar-me profissionalmente.

À Profa Cileide Maria Medeiros Coelho de Souza pelo apoio e ensinamentos em diferentes fases de execução do experimento.

Aos colegas mestrandos, Vinícius Spolaor Fantinel, Emerson Couto da Rocha, Romell Ribeiro, Dalciana Vicente e Elisama Alves pelo apoio e auxílio no experimento e nas análises. Agradeço, principalmente, a Flávia Regina da Costa, minha grande parceira em todos os momentos dessa dissertação, não teria conseguido sem você! Obrigada a todos pela amizade e pelos momentos divertidos que tivemos no laboratório!

A todos bolsistas e voluntários, Natalie Mendes, Marluci Pozzan, Mara Luana Engel, Karla Fernanda de Oliveira e Josué Spitzner. O experimento não teria sido possível sem vocês!

Aos colegas do laboratório de sementes pelo auxílio e companhia em análises.

Aos amigos Leticia Moro, Adriano da Costa, Izabel Klug, Janice Gmach, Carolina Delgado, Kristiana Fiorentin dos Santos, Jussara Stinghen, pela amizade incontestável, simpatia, incentivo e confiança no meu trabalho.

À empresa Klabin, pela parceria estabelecida.

À bióloga e pesquisadora Mireli Moura Pitz Floriani pelo apoio, orientação, auxílio em várias etapas do experimento e pela amizade.

À engenheira florestal e melhorista Regiane Estopa pelo auxílio na obtenção das sementes.

A Universidade do Estado de Santa Catarina, que tem sido a minha casa nos últimos sete anos. Agradeço a todos os professores, servidores e amigos que fiz nessa instituição. Tenho orgulho de pertencer à família CAV/UDESC!

Àqueles que, involuntariamente, omiti.

Muito obrigada!

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

RESUMO

SCHNEIDER, Priscilla Félix. **Relação da tolerância ao frio de espécies do gênero *Eucalyptus* e *Pinus* com a presença de carboidratos totais em sementes e mudas.** 2014.119 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias, Lages, 2014.

Objetivou-se avaliar a concentração de carboidratos solúveis totais em diferentes espécies de *Eucalyptus* e *Pinus taeda* Le sua relação com a tolerância ao frio, além de determinar o melhor método de descongelamento em sementes de *Eucalyptus*. Foram utilizadas sementes puras de três clones das espécies: *Eucalyptus dunii Maiden*, *E. benthamii Maiden et Cambage* *E. grandis Hill ex Maiden* e *E. saligna Smith*. Utilizou-se mudas de *E. benthamii* e *E. dunnii*, de dois clones cada. As sementes e as mudas, foram submetidas à rustificação em três períodos a temperaturas de 5 °C e de 1 °C. Ao final de cada nível de rustificação, as sementes foram submetidas a quatro gradientes (-2, -4, -6 e -8 °C), com exposição de três horas. A temperatura foi alterada para 15 °C e 9 °C. Determinou-se a concentração de açúcares e a sobrevivência das após a rustificação. As sementes foram submetidas a dois métodos de descongelamento, banho maria e ambiente. O experimento foi realizado com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e teste de comparação de médias (Tukey a p<0,05). Os resultados indicaram que a concentração de açúcares não influencia a tolerância ao frio em -8°C e, o melhor método de descongelamento é em temperatura ambiente.

Palavras-chave: Açúcares, Descongelamento, Tolerância ao frio.

ABSTRACT

SCHNEIDER, Priscilla Félix. **Relationship of cold tolerance of species of the genus Eucalyptus and Pinus in the presence of total carbohydrates in seeds.** 2014. 119 p. Dissertation (MSc in Plant Production) - Santa Catarina State University. Post graduate Program in Agriculture Science, Lages, 2014.

Aimed to evaluate the concentration of soluble carbohydrates in different species of *Eucalyptus* and *Pinus taeda* L and its relationship with cold tolerance, and determine the best method to defrost in seeds of *Eucalyptus*. Pure seeds from three clones of the species were used: *Eucalyptus dunnii* Maiden, Maiden et Cambage benthamii *E. grandis* Hill ex Maiden and *E. saligna*. Was used seedlings *E. benthamii* and *E. dunnii*, two clones each. Seeds and seedlings were subjected to hardening into three periods at temperatures of 5 ° C and 1 ° C, photoperiod and thermoperiod 12 hours. At the end of each level of hardening, the seeds were subjected to four gradients (-2 , -4 , -6 and -8 ° C) , with an exposure of three hours. Before hardening, and photoperiod were maintained in controlled thermoperiod 20 ° C and 12 ° C and a treatment for three days and the other for six days. The temperature was changed to 15 ° C and 9 ° C. Then reduced to 10 ° C and 5 ° C. Determined the concentration of sugars and survival after hardening. Seeds were subjected to two methods of thawing water bath and environment. Data were subjected to analysis of variance and mean comparison test (Tukey $p < 0.05$). The results indicated that the sugar concentration does not influence cold tolerance at - 8 ° C and the best method is to thaw at room temperature.

Keywords: Defrost, sugars, tolerance to cold.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Germinação em espécies/progênies de eucalipto após o processo de rustificação (tratamento1)	56
Figura 2 Germinação em espécies/progênies de eucalipto após o processo de rustificação (tratamento 2)	58
Figura 3 Curva de embebição de sementes do gênero <i>Eucalyptus</i>	59
Figura 4. Concentração de açúcares solúveis em espécies/progênies de eucalipto após a rustificação (T1)	60
Figura 5 Concentração de açúcares solúveis em espécies/progênies de eucalipto após a rustificação (T2)	61
Figura 6 Concentração média de açúcares e germinação média em espécies do gênero <i>Eucalyptus</i> , (tratamento 1 e 2).63	
Figura 7 Germinação em clones de <i>Pinus</i> após o processo de rustificação (Tratamentos 1 e 2).	93
Figura 8 Concentração de Açúcares solúveis em clones de <i>Pinus</i> após a rustificação (tratamentos 1 e 2)	95

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Tratamentos utilizados para o processo de rustificação de sementes de <i>Eucalyptus</i> spp.	52
Quadro 2 Tratamentos utilizados para o processo de rustificação de sementes de <i>Pinus taeda L.</i>	89
Quadro 3 Tratamentos utilizados para o processo de rustificação de mudas de <i>Eucalyptus</i> spp.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Caracterização física e fisiológica de clones de diferentes espécies de eucaliptos	54
Tabela 2 Caracterização física e fisiológica de sementes de diferentes clones de espécies de <i>Eucalyptus</i>	77
Tabela 3 Germinação (%) de sementes de diferentes clones de <i>Eucalyptus</i> submetidas ao descongelamento em temperatura ambiente e em banho maria, além da testemunha (não submetida ao congelamento).	78
Tabela 4 Caracterização Física e fisiológica de clones de <i>Pinus taeda</i>	92

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1	O GÊNERO EUCALYPTUS.....	26
2.1.1	<i>Eucalyptus dunnii</i> Maiden	27
2.1.2	<i>Eucalyptus benthamii</i> Maiden	28
2.1.3	<i>Eucalyptus saligna</i> Smith	29
2.1.4	<i>Eucalyptus grandis</i> Hill Ex Maiden	29
2.2	O GÊNERO PINUS	30
2.3	TOLERÂNCIA AO FRIO	32
2.4	DESCONGELAMENTO	36
2.5	REFERÊNCIAS	38
3	CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS E TOLERÂNCIA AO FRIO EM SEMENTES DE ESPÉCIES DO GÊNERO EUCALYPTUS	46
3.1	RESUMO.....	46
3.2	ABSTRACT	47
3.3	INTRODUÇÃO	48
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	50
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.6	CONCLUSÃO.....	64
3.7	REFERÊNCIAS	65
4	COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE DESCONGELAMENTO EM ESPÉCIES DO GÊNERO EUCALYPTUS	70
4.1	RESUMO.....	70
4.2	ABSTRACT	71
4.3	INTRODUÇÃO	72
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	74
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.6	CONCLUSÃO.....	80
4.7	REFERÊNCIAS	81
5	CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS E TOLERANCIA AO FRIO EM SEMENTES DE PINUS TAEDA L.....	84
5.1	RESUMO.....	84
5.2	ABSTRACT	85
5.3	INTRODUÇÃO	86

5.4	MATERIAL E MÉTODOS	88
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
5.6	CONCLUSÃO	98
5.7	REFERÊNCIAS	99
6	CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS E TOLERÂNCIA AO FRIO EM MUDAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO EUCALYPTUS	104
6.1	RESUMO	104
6.2	ABSTRACT.....	105
6.3	INTRODUÇÃO.....	106
6.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	108
6.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	112
6.6	CONCLUSÃO	116
6.7	REFERÊNCIAS	117

1 INTRODUÇÃO

O setor florestal tem uma significativa contribuição na economia do Brasil, uma vez que representa aproximadamente 5% do PIB e 8% das exportações nacionais. Além disso, geram 1,6 milhões de empregos diretos, 5,6 milhões de empregos indiretos, uma receita anual de R\$ 20 bilhões e, ainda, paga anualmente R\$ 3 bilhões de impostos. O país apresenta o maior programa de reflorestamento do mundo, com 5,98 milhões de hectares de florestas plantadas, cujas espécies de maior destaque são dos gêneros *Eucalyptus*, com 3,75 milhões, e *Pinus*, com 1,80 milhões de hectares (BRACELPA, 2013). 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), fenômeno natural que pode trazer perdas significativas na produção florestal, sendo necessária a seleção de espécies e/ou genótipos que sejam adequadas a essas condições climáticas, ou seja, que tenham tolerância a geadas. No entanto, a seleção de espécies e/ou genótipos poder levar muito tempo, devido ao fato de ser realizada, geralmente, em idade adulta da planta; o que torna fundamental a utilização de alternativas que visam uma seleção precoce de material.

A seleção precoce identifica, por meio de caracteres das árvores em idade juvenil ou até mesmo ainda nas sementes, o desempenho de um indivíduo adulto, diminuindo, assim, o tempo para se completar um ciclo de seleção. É preciso identificar, ainda, características desejáveis em clones para que se possam selecionar os genótipos mais adequados para cada condição climática.

Existem espécies de *Eucalyptus* que aparentemente se comportam bem em toda extensão territorial do Brasil, como *E. grandis*, *E. saligna* e *E. urophylla*; porém são sujeitas aos efeitos da geada (GOLFARI, et al., 1978). Já o *E. dunnii* e *E. benthamii* são indicados para plantios em regiões com temperaturas mínimas absolutas de até -5 °C, sob condições de aclimatação prévia mediante gradual redução da temperatura na estação fria (FAO, 1981). Em relação ao *Pinus*, no Sul do Brasil, *P. taeda* é

considerada uma das espécies mais plantadas por ser tolerante ao frio.

Entretanto, algumas florestas implantadas com estas espécies, identificadas como tolerantes ao frio, vêm apresentando problemas devido a danos por geadas, 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 período de rustificação ou aclimatação, onde as plantas percebem reduções na temperatura e no fotoperíodo que antecedem o inverno (NILSEN e ORCUTT, 1996).

Segundo Larcher (2000), para as plantas que devem atravessar com sucesso um período de congelamento severo, é essencial que seu protoplasma seja tolerante ao congelamento. Essa condição de tolerância ao congelamento é alcançada pela elevada incorporação de fosfolipídeos estáveis nas biomembranas, mesmo sob baixas temperaturas, e pela acumulação de carboidratos solúveis (açúcares e oligossacarídeos), polióis, substâncias de baixo peso molecular contendo nitrogênio (aminoácidos e poliaminas) e também, de proteínas hidrossolúveis (Palonen e Junntila, 1999). Contudo, 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 rustificação (LARCHER, 2000).

Há uma carência de informações referentes ao comportamento de espécies de *Eucalyptus* e *Pinus* frente a condições de baixa temperatura, bem como da relação da tolerância ao frio com a concentração de açúcares no tecido. A identificação de características fisiológicas, que representam a tolerância ao frio, como as concentrações de açúcares no tecido de partes da planta, pode servir como ferramentas para a seleção de espécies com potencial de cultivo em regiões frias, bem como para escolha de genótipos a serem utilizados em trabalhos de melhoramento, possibilitando a expansão da base florestal, além de gerar emprego e renda.

O objetivo geral do trabalho foi relacionar os teores de carboidratos, em sementes e mudas de diferentes espécies e

genótipos de *Eucalyptus* e em sementes de *Pinus taeda*, com a tolerância ao frio, além de comparar métodos de descongelamento em sementes do gênero *Eucalyptus*.

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 e 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 com temperaturas entre -15 °C e -18 °C (TURNBULL e ELDRIDGE, 1983).

2.1.1 *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 e 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 e LOPEZ, 1995) e, no Brasil, em Mogi Mirim, SP (PIRES e PARENTE, 1986) e em Colombo, PR (PEREIRA et al., 1986).

Segundo Higa e Carvalho (1990), o *E. dunnii* tem uma área de ocorrência natural restrita e floresce mais tarde que a maioria das espécies do gênero. A escassez de sementes está sendo solucionada parcialmente pela implantação de áreas de produção e pomares de sementes e também com o emprego de técnicas para acelerar o florescimento. Nesse sentido, o conhecimento do efeito de geadas em *E. dunnii* é fundamental para implantação de programas de produção de sementes melhoradas.

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. 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 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.

2.1.2 *Eucalyptus benthamii* Maiden

O *E. benthamii*, cujo nome comum “Camden White Gum” deriva da cidade de Camden, 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 e BROOKER, 1973).

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

Essa espécie foi introduzida no Brasil pela Embrapa Florestas, onde, em plantios, a espécie 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 geada, 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.

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 E FERREIRA, 2006).

2.1.3 *Eucalyptus saligna* Smith

O *E. saligna* apresenta sua área natural na Austrália, ocupando uma faixa costeira extensa, porém descontínua e fragmentada, desde 36° S de latitude, ao sul de Sydney, NSW, até 21° S, ao oeste de Mackay, Queensland. Apresenta rápido crescimento, chegando até 55 metros de altura e 180 cm de diâmetro à altura do peito (DAP), prefere regiões de clima temperado à subtropical. Adaptou-se bem no Brasil e por essa razão é muito utilizada em plantios comerciais (TONINI, 2003).

Amparado et al. (2008) relatam que a madeira de *E. saligna* possui bom potencial para a obtenção de peças serradas livres de defeitos, consumidas no mercado internacional para o segmento moveleiro e como esquadrias em geral; segundo o mesmo autor é necessário o desenvolvimento de materiais genéticos de espécies de eucalipto, que sejam mais facilmente processadas e secas na produção de madeira serrada de qualidade.

No Brasil, as regiões onde se desenvolvem melhor estão localizadas nos Estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo (GONZAGA, 1983). Essa espécie apresenta a mesma amplitude geográfica que o *E. grandis*, porém sobrevive em regiões mais frias (SKOLMEN, 2006).

O *E. saligna* é indicado para locais com até oito geadas anuais (FAO, 1981), sendo este parâmetro estendido até 50 geadas quando se utilizam fontes de sementes de procedências da região meridional de ocorrência na Austrália, como Yarboro State Forest, NSW. A temperatura mínima absoluta que *E. saligna* suportou na China é de até -10 °C (ARNOLD et al., 2004), exibindo boa tolerância ao frio.

2.1.4 *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. A precipitação média anual varia de 1.000 a 1.800 mm

(GONZAGA, 1983). A espécie é plantada em alta escala na região Sudeste (ROCHA e TOMASELLI, 2002).

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 a espécie florestal mais plantada 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).

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 O GÊNERO PINUS

Originário do sudeste dos Estados Unidos, *Pinus spp.* é conhecido como “slash pine” ou “american pitch pine” e, segundo Kronka et al. (2005), cresce em solos arenosos, com altitude inferior a 990 m, caracterizando-se por apresentar um clima quente, com verão úmido e primavera de menor precipitação pluviométrica.

Uma das razões mais importantes para a introdução do gênero *Pinus* no Brasil foi a necessidade da produção de madeira em plantações florestais para abastecimento industrial, visando o processamento mecânico para a produção de madeira serrada ou laminada, confecção de painéis e produção de celulose e papel (KRONKA et al., 2005), além da substituição da madeira da *Araucaria angustifolia*, cujos povoamentos naturais achavam-se em rápido processo de exaustão na década de 60.

Segundo Marchiori (2005), é largamente cultivado no sul do Brasil, onde encontra condições ideais de crescimento, desde

o Rio Grande do Sul até o centro do Paraná e sul de São Paulo. Também pode ser cultivado em áreas de maior altitude (Serra da Mantiqueira, do Mar, Bocaina e dos Órgãos) requerendo chuvas uniformemente distribuídas durante o ano, invernos frios e sem déficit hídrico (KRONKA et al., 2005).

A área total com florestas plantadas para as espécies de *Pinus* é de cerca de 1,8 milhões de ha, sendo que 1,4 milhões de hectares estão localizados na Região Sul (ABRAF, 2012).

Uma das espécies do gênero mais utilizadas em plantios comerciais é o *P. taeda*. Schultz (1999) cita que é uma das espécies mais versáteis devido à facilidade de reprodução e rápido crescimento em diferentes locais, o que a faz ser a principal espécie madeireira do sudeste dos EUA.

A capacidade de adaptação às condições edafoclimáticas explica o rápido crescimento e produtividade, podendo atingir aproximadamente $25\text{ m}^3\text{ há}^{-1}\text{ ano}^{-1}$, e ultrapassando em alguns sítios $45\text{ m}^3\text{ há}^{-1}\text{ ano}^{-1}$ (KRONKA et. al. 2005).

Os primeiros plantios com o *P. taeda* foram originários de sementes sem grau de melhoramento, mas que obtiveram alta produção de biomassa lenhosa e com grande quantidade de ramos (MARCHIORI, 2005).

Segundo Shimizu (2005), somente após diversos estudos com os materiais genéticos introduzidos no Brasil, foi possível selecionar algumas procedências de acordo com as características de cada região. Por exemplo, em locais onde as geadas não são tão severas, foi selecionado sementes da planície costeira da Carolina do Sul (EUA), enquanto que procedências da Carolina do Norte (EUA) demonstraram maior produtividade para regiões mais frias, como nas serras gaúchas e no planalto catarinense.

O gênero *Pinus* é utilizado na região sul do Brasil onde é cultivado principalmente em regiões de clima frio por resistir ao frio e por se adaptar aos solos hidromórficos e de altitudes elevadas (KRONKA et. al, 2005). *Pinus taeda* é pouco afetado por geadas; pode suportar períodos de alagamento do solo e déficit hídrico (Booth e Jovanovic, 2000). A produção de híbridos do gênero *Pinus* interespecíficos com características de resistência às geadas pode ser a alternativa mais adequada, conforme recomendado por Klock et al.(2002).

2.3 TOLERÂNCIA AO FRIO

Frio, sal ou tensões de seca são alguns dos principais fatores ambientais que afetam fortemente crescimento, produtividade e desenvolvimento de plantas (NILSEN e ORCUTT, 1996). 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 é muito 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 e 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 e 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). Tolerância a geadas envolve mecanismos de prevenção e tolerância. Em condições de temperaturas abaixo de 0 °C, o metabolismo das células é afetado, reduzindo-se ao mínimo as funções fisiológicas mais importantes (DURYEA e MCCLAIN, 1984). Tolerância é o único mecanismo eficiente de sobrevivência, onde as geadas são regulares e severas, típicas de regiões de grandes latitudes (SAKAI e LARCHER, 1987).

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 gunni* x *Eucalyptus globulus*, apontam que células de genótipo resistente contêm mais hidratos de carbono, sem aclimatação 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 aclimatação de diferentes genótipos de *Eucalyptus* em mudas em Portugal. Os resultados indicaram aumento na concentração de açúcares solúveis e que a aclimatação aumentou a capacidade do 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.

Segundo Larcher (2000), para as plantas que devem atravessar com sucesso um período de congelamento severo, é

essencial que seu protoplasma seja tolerante ao congelamento. Essa condição de rustificação ou tolerância ao congelamento é alcançada pela elevada incorporação de fosfolipídeos estáveis nas biomembranas, mesmo sob baixas temperaturas, e pela acumulação de carboidratos solúveis (açúcares e oligossacarídeos), polióis, substâncias de baixo peso molecular contendo nitrogênio (aminoácidos e poliaminas) e também, de proteínas hidrossolúveis (Palonen e Junttila, 1999). Contudo, 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 rustificação (LARCHER, 2000).

Os carboidratos formam um dos maiores grupos de compostos orgânicos encontrados na natureza e juntamente com as proteínas formam os constituintes principais do organismo vivo (BOBBIO e BOBBIO, 2003).

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).

As baixas temperaturas atuam 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 ciclítios (PETERBAUER e RICHTER 2001).

Esses compostos podem preservar a viabilidade da semente em situações de estresse, como ultra-secagem e congelamento, impedindo a cristalização da sacarose, o que resultaria na desestruturação das membranas e consequente inviabilidade (CAFREY et al., 1988). Além de atuar na proteção das membranas, esses carboidratos contribuem para a formação do estado vítreo das sementes 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 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) relataram que essas mudanças precedem algumas alterações de tolerância ao congelamento, e, não está claro se os açúcares estão relacionados à aclimatação 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. (2011), 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 relação entre tolerância ao frio e concentração de carboidratos pode auxiliar na identificação de genótipos que possam ser cultivados em condições de baixas temperaturas, o que seria mais uma opção para a exploração florestal na região, bem como aumentaria a economia da região gerando novos postos de trabalho. O uso de carboidratos como indicadores de tolerância ao frio espécies mais adequadas para as condições climáticas de regiões frias.

2.4 DESCONGELAMENTO

Criopreservação é definida como a conservação de material biológico em nitrogênio líquido a -196 °C, ou em sua fase de vapor a -150°C (KARTHA, 1985).

A capacidade de tecidos vegetais sobreviverem à criopreservação depende da sua tolerância à desidratação e à temperatura do nitrogênio líquido (-196 °C). Por isto, o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação requer conhecimento de mecanismos bioquímicos e biofísicos associados com a resposta dos tecidos à desidratação e ao congelamento (STUSHNOFF e SEUFFERHELD, 1995).

Conforme relata Santos (2001), o ponto mais crítico é o teor de água na matéria a ser criopreservada. Teores muito baixos levam à desidratação excessiva e morte das células, e elevados levam à formação de cristais de gelo no interior das células; esses, por sua vez, levam à ruptura do sistema de membranas celulares e a morte celular.

Almeida et al. (2000) observam que a perda de viabilidade em espécies expostas a criopreservação, pode ser resultante de danos físicos sofridos pelas sementes durante o processo, sugerindo utilizar diferentes velocidades de congelamento e descongelamento.

Para evitar danos nos tecidos após a criopreservação, o descongelamento deve ser feito de maneira cuidadosa. Assim, o descongelamento pode ser feito de modo lento à temperatura ambiente ou rapidamente utilizando-se um banho-maria a 37 a 40 °C (BAJAJ, 1995).

O método de descongelamento utilizado depende do tipo de material que está sendo preservado. Sementes ortodoxas podem ser descongeladas lentamente à temperatura ambiente e, aparentemente, sem nenhum efeito prejudicial às mesmas (TOWILL, 2002).

Há controvérsias quanto à velocidade de descongelamento adequada para garantir a integridade do material quando exposto a nitrogênio líquido.

Segundo Wang (1999), o descongelamento lento é menos deletério para células vegetais do que o rápido. Para as células vegetais, a desplasmólise rápida pode levar à morte da célula. Já

Villamil (1997) relata que quanto mais rápido ocorrer o descongelamento das sementes, melhor a preservação de suas características fisiológicas.

Desta forma, é necessário o estabelecimento de padrões e especificações para a crioconservação de sementes de cada espécie em particular; e este protocolo está condicionado a determinação do conteúdo de água ideal, bem como das taxas apropriadas de congelamento e descongelamento (SALOMÃO et al. 2002).

2.5 REFERÊNCIAS

ABRAF. Anuário estatístico da ABRAF 2012 ano base 2011 / **ABRAF.** – Brasília: 2012.

ALMEIDA, F. de A.C.; MORAIS, A.M. de; CARVALHO, J.M.F.C.; GOUVEIA, J.P.G. de Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Bras. de Eng. Agríc. e Ambiental**, Campina Grande – PB, v. 6, n.2, p.295-302, 2002.

ALVES, I. C. N.; GOMIDE, J. L.; COLODETTE, J. L.; SILVA, H. D Caracterização tecnológica da Madeira de *Eucalyptus benthamii* para produção de celulose Kraft. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 167-174, 2011

AMPARADO, Kelysson; MONTEIRO DE CARVALHO, Alexandre; GARCIA, Rosilei Aparecida e DE FIGUEIREDO LATORRACA, João Vicente. **Rev. Forest. Venez** vol.52, n.1 p. 71-76, 2008.

ANNICCHIARICO, P. et al. Variation in cold tolerance and spring growth among Italian white clover populations. *Euphytica*, v.122, p.407-416, 2001.

ARNOLD, R. J.; CLARKE, B; LUO, J. **Trials of cold-tolerant eucalypt species in cooler regions of southcentral China**. Canberra: ACIAR, 2004 106 p. (ACIAR Technical reports, 57).

ASSIS, T.F. E MAFIA, R.G. Hibridação e Clonagem. In: Borém, A. **Biotecnologia Florestal**. Viçosa MG, Editora UFV. 2007. p: 93-121.

BAJAJ, Y. P. S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: **Cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin: Springer, 1995. p. 3-28.

- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P. **Introdução à química de alimentos.** 2^a ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 223p.
- BOOTH T.H.; JOVANOVIC, T. Improving descriptions of climatic requirements in the CABI Forestry Compendium.A report for the Australian Centre for International Agricultural Research.CSIRO - **Forestry and Forest Products, Client Report No. 758.** 2000.
- BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants.**2a ed. Andover, Intercept,1119p, 1999.
- CALORI, J. V.; KIKUTI, P. Propriedades fisicas e mecanicas da madeira de Eucalyptus dunnii aos 20 anos de idade. In: IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypts, 1997, Salvador.**Proceedings.** Colombo: EMBRAPA, 4v. v.3, 1997.
- 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.** DURYEA M. and BROWN, G. eds., p. 77-114, 1984.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. (Colombo, PR). **Zoneamento ecológico para plantios florestais no estado de Santa Catarina.** Colombo,1988. 113p. (EMBRAPA-CNPF. Documentos, 21).
- FAO. **El eucalipto en la repoblacion forestal.** Roma,1981.723p.
- 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 EUCLYPTUS, 1997, Salvador. **Anais...** Colombo: EMBRAPA/CNPF, 1997, v.1, p.14-34.
- FERREIRA, Aurélio Buarque de Holanda. **Dicionário Aurélio Básico da Língua Portuguesa.** Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2013.

FLORIANI, M. M. P; STEFFENS, C.A; E CHAVES, D. M. Rustificação de plantas de *Eucalyptus dunnii* Maiden e a relação entre as concentrações de açúcares solúveis totais e de prolina foliar e a tolerância ao frio. **Rev. Árvore** [online]. 2011, vol.35, n.1, pp. 21-29.

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

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.

HALL, N e BROOKER, I, 'Cannons Stringybark; *Eucalyptus cannonii*', **Forest Tree Series**, vol. 124. 1973.

HIGA, A.R.; CARVALHO, P.E.R. de. Sobrevida 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.

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 12: 103-110. 2002.

KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: Kartha, K.K. (Ed.) **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton, Florida, CRC Press,.pp.115-134.1985

KJAER, E. et al. 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.

KLOCK, U.; BOLZON DE MUÑIZ, G. I.; NISGOSKI, S.; BITTENCOURT, E. Características dos traqueóides da madeira juvenil de *Pinus maximinoi* H.E. Moore e de *Pinus taeda* L. In: CONGRESO IBEROAMERICANO DE INVESTIGACIÓN EM CELULOSA Y PAPEL, 2002, Campinas. **Anais...**São Paulo: IPT/USP, 2002

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** 27: 1395-1404. 2004.

KOSTER, K. L. e LEOPOLD, A.C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plantphysiology**, v.88 p. 829-832, 1988.

KRONKA, F.J.N.; BERTOLANI, F.; PONCE, R.H. **A cultura do pinus no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura. 156 p. 2005.

LARCHER, W. **Physiological plant ecology**. Plants under stress. Springer.Austria, 513 p. 1995.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos, Rima, p.341-398, 2000.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das gimnospermas**. Santa Maria: UFSM, 2005. 158 p

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. **Desenvolvimento (Maturação) de sementes**. In: MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: FEALQ, p.91-142, 2005.

MARSHALL, H. G. Breeding for tolerance to heat and cold. Christiansen M.N. e Lewis, C. F. (ed). **Breeding plants for less favourable environments** John Wiley e Sons, New York, p. 4-70, 1982.

MORAGA, S.P.; ESCOBAR, R.; VALENZUELA, A.S. Resistance to freezing in three *Eucalyptus globulus* Labill subspecies. **Electron. J. Biotechnology.**, vol.9, n.3, p.310-314. ISSN 0717-3458.jun. 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.; JUNTTILA, 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.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; FERREIRA, C.A.; **Eucaliptos indicados para plantio no Estado do Paraná**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006.

PEREIRA, J.C.D.; HIGA, A.R.; SHIMIZU, J.Y.; HIGA, R.C. Comparação da qualidade da madeira de três procedências de *Eucalyptus dunnii* Maiden, para fins energéticos. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Curitiba, n.13, p. 9-16, dez. 1986.

PEREIRA, A.B.; MARQUES JUNIOR, O.G.; RAMALHO, M.A.P.; ALTHOFF, P. Eficiência da seleção precoce em famílias de meios-irmãos de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., avaliadas na região noroeste do Estado de Minas Gerais. **Cerne**, v.3, p.67-81, 1997.

PETERBAUER, T. e RICHTER, A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. **Seed Science Research**, v. 11, p. 185-197, 2001

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.

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

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. 1999, 1p.

SAKAI, A; LARCHER, W. **Frost survival of plants**. Berlin: Springer-Verlag, 1987.

SALOMÃO, A.N.; SANTOS, I.R.I.; MUNDIM, R.C. Estabelecimento de método para congelamento e descongelamento de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vog.) Macbr (Caesalpinaeae), **Circular Técnica**, Brasília, n.19, p. 1.-3, set. 2002.

SCHULTZ, R.I. Genetics and tree improvement.In: SCHULTZ, R.I. **Loblolly pine: the ecology and culture of loblolly pine**

(*Pinus taeda L.*). New Orleans: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, p.1-50. 1997

SHIMIZU, J.Y. *Pinus* na silvicultura brasileira. **Revista Madeira**, n. 38, ano 14, ago., Disponível em: <<http://www.remade.com.br>> Acesso em: 03 dez.2013. 2005

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

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

SKOLMEN, R.G. *Eucalyptus saligna Smith Saligna Eucalyptus*. Disponível em:
http://na.fs.fed.us/spfo/pubs/silvics_manual/volume_2/eucalyptus/saligna.htm. Acesso 01 de mar de .2012.

SOARES, T.S.; CARVALHO, R.M.M.A.; VALE, A.B. Avaliação econômica de um povoamento de *Eucalyptus grandis* destinado a multiprodutos. **Revista Árvore**, v.27, n.5, p.689-694, 2003.

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, pp 87-101. 1995.

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

TINUS, R.W.;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. **Three Physiology**, vol.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**, vol. 114, no. 4, p. 1433-1442, 1997.

TONINI, H. **Crescimento e produção de clones de Eucalyptus saligna Smith, na depressão central e serra do sudoeste, Rio Grande do Sul.** 2003. 289f. – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

TOWILL, L. E. Cryopreservation of plant germplasm. In: TOWILL, L. E.; BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Cryopreservation of plant germplasm II.** Berlin: Springer, 2002. p. 4-21

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.

VILLAMIL, J. Crioconservación de semillas. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola**, 26. Minicurso. Campina Grande, PB, 1997.

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** 120: 391–400, 1999.

XIANG, B.; LI, B.; ISIK, F. Time trend of genetic parameters in growth traits of *Pinus taeda* L. **Silvae Genetica**, v.52, p.114-121, 2002.

3 CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS E TOLERÂNCIA AO FRIO EM SEMENTES DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Eucalyptus*

3.1 RESUMO

Objetivou-se avaliar a concentração de açúcares solúveis totais em sementes de diferentes espécies de *Eucalyptus* e sua relação com a tolerância ao frio. Foram utilizadas sementes puras de três clones das espécies: *Eucalyptus dunii* Maiden (tolerante), *E. benthamii* Maiden et Cambage (tolerante), *E. grandis* Hill ex Maiden (intolerante) e *E. saligna* Smith (intermediária). Inicialmente, as sementes foram beneficiadas, e foram determinadas características físicas (umidade) e fisiológicas das sementes (testes de germinação, primeira contagem, índice de velocidade de germinação, frio e envelhecimento acelerado). Em seguida, as sementes foram submetidas à rustificação em três períodos a temperaturas de 5 °C e de 1 °C, sob fotoperíodo e termoperíodo de 12 horas. Ao final de cada nível de rustificação, as sementes foram submetidas a quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8 °C), sendo utilizado um período de exposição de três horas em cada. Antes das sementes serem submetidas à rustificação, elas foram mantidas em fotoperíodo e termoperíodo de 12 horas, com temperaturas de 20 °C e de 12 °C sendo um tratamento durante três dias e em outro durante seis dias. Em seguida, as temperaturas foram alteradas para temperatura de 15 °C e de 9 °C. A temperatura foi reduzida para 10 °C e para 5 °C. Determinou-se a concentração de açúcares solúveis e a germinação após a rustificação. O experimento foi realizado conforme o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento de rustificação/espécie/clone. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e teste de comparação de médias (Tukey a $p < 0,05$). Os resultados obtidos indicaram que a concentração de açúcares em -8 °C não influencia a tolerância ao frio.

Palavras-chave: Eucalipto, carboidrato, seleção precoce.

3.2 ABSTRACT

Aimed to evaluate the concentration of total soluble sugars in seeds of different species of Eucalyptus and its relation to cold resistance. Pure seeds from three clones of the species were used: *Eucalyptus dunii* Maiden (tolerant) ,*E. benthamii* Maiden et Cambage (tolerant) , *E. grandis* Hill ex Maiden (intolerant) and *E. saligna* Smith (middle) . Initially, seeds were treated, and were given physical (moisture) and physiological characteristics of seeds (germination, first count, index of germination speed, cold and accelerated aging). Then the seeds were subjected to hardening into three periods at temperatures of 5 ° C and 1 ° C under controlled photoperiod and thermoperiod 12 hours. At the end of each level of hardening , the seeds were subjected to four temperature gradients below freezing (-2 , -4 , -6 and -8 ° C) , an exposure period of three hours each gradient being used . Before the seeds are subjected to hardening , they were kept at a photoperiod and thermoperiod controlled to 12 hours at temperatures of 20 ° C and 12 ° C is a treatment for three days (treatment 1) and another six days at these temperatures (treatment 2) . Then the temperature was changed to 15 ° C and 9 °C, maintaining the controlled thermoperiod photoperiod and 12 hours. Subsequently, the temperature was reduced to 10 ° C and 5 ° C. determined the concentration of soluble sugars and germination after hardening. The experiment was conducted as a completely randomized design with four replications for each treatment rustification / species / clone. Data were subjected to analysis of variance and mean comparison test (Tukey $p < 0.05$). The results indicated that the concentration of sugars should not be influencing separately for cold tolerance.

Keywords: Eucalyptus, carbohydrate, early selection.

3.3 INTRODUÇÃO

Em 2011, a área ocupada por plantios florestais de Eucalyptus e Pinus no Brasil totalizou 6.515.844 ha, sendo 74,8% correspondente à área de plantios de Eucalyptus e 25,2% aos plantios de Pinus (ABRAF, 2012). Trata-se de uma atividade importante para a economia do País, que gerou um valor bruto de produção de R\$ 56,3 bilhões em 2012, o que corresponde a 5,7% do PIB industrial brasileiro. Além do conhecido valor econômico, as plantações florestais, como as de eucalipto e Pinus, por exemplo, também provêm significativo valor social em regiões distantes dos grandes centros urbanos, sobretudo na geração de postos de trabalho (BRACELPA, 2013).

A exploração do eucalipto no Brasil ocorre devido à sua qualidade mecânica e bom desenvolvimento. Os povoamentos clonais apresentam homogeneidade de plantio, uniformidade da matéria-prima e qualidade da madeira, elevada produção de sementes, além de adequação aos mais diferentes usos e ampla aceitação no mercado (ALFENAS et al., 2004).

Algumas espécies, como o *E. dunnii* Maiden e o *E. benthamii* Maiden et Cambage, têm se destacado pelo rápido crescimento, uniformidade dos talhões, forma das árvores e tolerância à geada não muito severa (EMBRAPA, 1988). Apesar de essas espécies serem consideradas tolerantes ao frio, pode haver variação entre genótipos da mesma espécie, o que torna fundamental a seleção de genótipos antes do plantio (VIANA, 2003).

Nesse sentido, experimentos em ambiente controlados visando à seleção precoce em programas de melhoramento de espécies perenes tornariam esses programas mais eficientes em termos de tempo e custos necessários para condução e manutenção dos testes genéticos (MASSARO et al., 2010).

Segundo Annicchiarico et al. (2001), a avaliação da sensibilidade ao frio das plantas por meio da sua exposição a temperaturas inferiores a 2 °C, em ambiente controlado, pode ser um procedimento bastante eficiente na predição de sua resistência.

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 gunni* X *Eucalyptus globulus*, apontam que a estreita relação entre o teor de açúcar e a tolerância ao congelamento das células é demonstrada pelas seguintes observações: células de genótipo resistente contêm mais hidratos de carbono, sem aclimatação ao frio; 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 aclimatação de diferentes genótipos de *Eucalyptus* em mudas. Os resultados indicaram aumento na concentração de açúcares solúveis e a aclimatação aumentou a capacidade do eucalipto “suportar” a formação de gelo extracelular. Moraga et al. (2006), trabalhando com espécies do gênero *Eucalyptus* no Chile, concluíram que a concentração de açúcares solúveis total é um bom indicador da resistência a baixas temperaturas. O nível elevado de açúcares solúveis na célula auxilia na capacidade de resistir a temperaturas mais baixas, suportando a teoria de que açúcares solúveis funcionam como agentes crioprotectores em tecidos vegetais, especialmente ao nível da membrana. Tinus et al. (2000) observaram 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. Em trabalho realizado por Floriani et al. (2011), foi observado aumento na tolerância ao frio com o aumento dos teores de açúcares solúveis no período de aclimatação de até 28 dias, em mudas de *E. dunnii*.

Apesar disso, faltam estudos referentes a relação da tolerância ao frio com a concentração de açúcares em sementes de espécies de eucaliptos. A identificação de características bioquímicas, que representam a tolerância ao frio, como as concentrações de açúcares, pode servir como ferramentas para a seleção precoce de espécies com potencial de cultivo em regiões frias.

Assim, o objetivo desse trabalho foi relacionar os teores de açúcares solúveis em sementes de diferentes espécies e genótipos de *Eucalyptus*, com a tolerância ao frio

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de três clones das espécies *Eucalyptus dunii* (tolerante ao frio), *E. benthamii* (tolerante), *E. grandis Hill ex Maiden* (intolerante) e *E. saligna Smith* (intermediária), procedentes de pomar clonal localizado em Telêmaco Borba, PR. Após a colheita, as sementes foram beneficiadas com o auxílio de peneira e lupa, sendo utilizadas somente sementes puras nos experimentos.

Para caracterização inicial, as sementes foram submetidas a testes físicos e fisiológicos, como grau de umidade, germinação, índice de velocidade de germinação, envelhecimento acelerado e frio.

A determinação do grau de umidade das sementes foi realizada em estufa com circulação de ar a 105 ± 3 °C por 24 horas, usando-se três subamostras de 5 g de sementes por repetição, conforme metodologia descrita nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Para o teste de germinação foram utilizadas quatro subamostras de 0,10 g de sementes puras, semeadas em caixas tipo gerbox, com uma folha de papel de filtro previamente umedecida com 6 ml de água destilada. Foi utilizada temperatura de 25 °C, com a primeira contagem aos cinco dias e a contagem final aos 14 dias após a montagem do teste (BRASIL, 2009).

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi determinado pela contagem do número de plântulas emergidas a cada dia, a partir da semeadura até o décimo quarto dias, sendo calculado de acordo com Maguire (1962).

O teste de envelhecimento acelerado foi realizado a 42°C por 24 horas a 100% de umidade relativa. Esse teste foi conduzido pelo método do gerbox, segundo metodologia proposta por Marcos Filho (1999).

Para o teste de frio foram utilizadas quatro repetições 0,10g de sementes, que foram colocadas em um solo do tipo Cambissolo. A temperatura utilizada foi de 10 °C e o período de exposição ao frio de 7 dias. Após esse período as sementes foram colocadas para germinar, segundo descrição citada acima (teste de germinação).

Após as análises iniciais, as sementes foram submetidas à rustificação em três períodos (0,7 e 21) a temperaturas de 5 °C e de 1 °C, sob fotoperíodo e termoperíodo controlado de 12 horas. Ao final de cada nível de rustificação, as sementes foram submetidas a quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8 °C), sendo utilizado um período de exposição de três horas cada gradiente.

Antes das sementes serem submetidas à rustificação, elas foram mantidas em fotoperíodo e termoperíodo controlado de 12 horas, com temperaturas de 20 °C e 12 °C sendo um tratamento durante três dias (tratamento 1) e em outro durante seis dias nessas temperaturas (tratamento 2).

Em seguida, as temperaturas foram alteradas para temperatura de 15 °C e de 9 °C, mantendo-se o fotoperíodo e termoperíodo controlado de 12 horas. Posteriormente, a temperatura foi reduzida para 10 °C e 5 °C. Após esse período estabelece-se o Ponto Zero, onde as sementes passaram pelo processo de rustificação, conforme descrito acima (ver quadro 1) (FLORIANI et al., 2011).

Após a rustificação as sementes foram descongeladas em temperatura ambiente e, foi realizada a análise bioquímica e fisiológica das sementes. A extração e a análise dos teores de açúcares solúveis totais foram realizadas conforme metodologia descrita por Moraga et al. (2006), utilizando-se o método fenolsulfúrico.

Após a centrifugação, 1 mL da fase líquida foi transferida para outro tubo de ensaio, adicionando-se a este 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 pipetou-se 200 µL da fase aquosa obtida e adicionado 1,8 mL de água deionizada (solução 1). Desta primeira solução, retirou-se 500 µL que foram transferidos para outro tubo de ensaio, onde adicionou-se 500 µL de fenol (5%) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após isso, agitou-se em vortex e, em seguida, realizou-se a medição da absorbância da solução em espectrofotômetro, utilizando-se um comprimento de onda de 490 nm.

Quadro 1 Tratamentos utilizados para o processo de rustificação de sementes de *Eucalyptus* spp.

TRAT.	PASSO 1	PASSO 2 RUSTIFICAÇÃO	PASSO 3
T	-	Sementes recém colhidas	-
0	TRATAMENTO 1 20 °C (12h) e 12°C(12H) três dias 15 °C(12h) e 9 °C (12H) sete dias 10 °C (12h) e 5 °C (12H) Dez dias	Sem rustificação	Quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e - 8°C) por 3 horas cada
7	TRATAMENTO 1 20 °C (12h) e 12°C(12H) três dias 15 °C(12h) e 9 °C (12H) sete dias 10 °C (12h) e 5 °C (12H) dez dias.	5°C (12h) e 1°C(12H) sete dias	Quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e - 8°C) por 3 horas cada
21	TRATAMENTO 1 20 °C (12h) e 12°C(12H) três dias 15 °C(12h) e 9 °C (12H) sete dias 10 °C (12h) e 5 °C (12H) dez dias	5°C (12h) e 1°C(12H) 21 dias	Quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e - 8°C) por 3 horas cada
0	TRATAMENTO 2 20 °C (12h) e 12°C(12H) seis dias 15 °C(12h) e 9 °C (12H) sete dias 10 °C (12h) e 5 °C (12H) dez dias	Sem rustificação	Quatro gradientes de temperatura (-2, -4, -6 e - 8°C) por 3 horas cada

Continua

7	TRATAMENTO 2 20 °C (12h) e 12°C(12H) seis dias 15 °C(12h) e 9 °C (12H) sete dias 10 °C (12h) e 5 °C (12H) - dez dias	5°C (12h) e 1°C(12H) sete dias	Quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e - 8°C) por 3 horas cada
21	TRATAMENTO 2 20 °C (12h) e 12°C(12H) seis dias 15 °C(12h) e 9 °C (12H) sete dias 10 °C (12h) e 5 °C (12H) dez dias .	5°C (12h) e 1°C(12H) 21 dias	Quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e - 8°C) por 3 horas cada

Trat.= Tratamento; T = Testemunha

Fonte: produção do próprio autor.

Para obtenção dos valores de concentração de açúcares solúveis totais utilizou-se a curva de calibração $y= 0,0096x + 0,0536$ (onde: y = absorbância; x = concentração de açúcares; $R^2=0,991$).

Para avaliar a qualidade fisiológica após a rustificação, foi realizado o teste de germinação. Para esse teste foram utilizadas 0,10 g de sementes rustificadas de todas as espécies/clones submetidas à temperatura de 25 °C durante 14 dias.

Foi obtida, ainda, a curva de embebição das sementes em temperatura de aclimatação. Para isso, as sementes não rustificadas foram pesadas em 0,2 g e colocadas sobre papel à temperatura de 20 °C e de 12 °C com fotoperíodo e termoperíodo controlado de 12 horas. A cada 12 horas as sementes foram retiradas da câmara B.O.D, pesadas e colocadas novamente para embeber. As avaliações foram feitas em 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 e 144 horas.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância, e teste de comparação de médias de Tukey ($p<0,05$) para níveis de rustificação e espécies de eucaliptos.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram que a qualidade das espécies/clones dependeu do teste utilizado. No entanto, de forma geral, sementes de *E. dunni* apresentaram os piores resultados e de *E. grandis* e *E. benthammii*, os melhores (ver tabela 1).

Tabela 1 Caracterização física e fisiológica de clones de diferentes espécies de eucaliptos

Espécies	G(%)	IVG	PC (%)	U(%)	TF(%)	EA (%)
<i>E.benthamii</i>						
Clone 1	77,0 b	28,3 a	13,0 b	6,85 c	33,0 a	45,0 a
Clone 2	77,0 b	21,2 b	10,0 c	8,38 b	21,0 c	32,0 c
Clone 3	59,0 c	19,1 c	7,0 c	6,96 c	32,0 a	40,0 a
<i>E. dunnnii</i>						
Clone 1	59,0 c	19,0 c	8,0 c	8,68 a	26,0 b	24,0 d
Clone 2	60,0 c	13,2 d	50 d	7,24 c	25,0 b	24,0 d
Clone 3	57,0 c	15,1 d	5,0 d	8,75 a	19,0 c	22,0 d
<i>E. grandis</i>						
Clone 1	61,0 b	23,9 b	14,0 a	8,79 a	20,0 c	43,0 a
Clone 2	44,0 d	14,4 d	5,0 d	8,32 b	17,0 d	24,0 d
Clone 3	89,0 a	29,1 a	16,0 a	7,91 b	21,0 c	33,0 c
<i>E. saligna</i>						
Clone 1	84,0 a	20,5 b	8, 0 c	8,37 b	23,0 b	36,0 b
Clone 2	71,0 b	20,6 b	5,82 c	8,39 b	21,0 c	19,0 d
Clone 3	86,0 a	23,0 b	10,0 b	9,19 a	26,0 b	46,0 a
CV %	6,7	7,1	9,1	8,52	9,9	10,3

G = teste de germinação, IVG = Índice de velocidade de germinação, PC = primeira contagem, U = umidade, TF = teste de frio, EA = envelhecimento acelerado. Letras desiguais na coluna diferem estatisticamente pelo Teste Tukey a 5% de significância ($P<0,05$). Fonte: produção do próprio autor.

Os testes de germinação, IVG e primeira contagem em *E. dunnii* apresentaram os mais baixos valores quando comparados as demais espécies, com resultados semelhantes entre os clones.

Esses resultados podem ser devido aos fatores ambientais durante a maturação das sementes ou à qualidade genética dessas sementes (FRANÇA NETO et al., 1993). Lazarotto et al. (2013) ressaltam que o vigor, ou a viabilidade, das sementes pode ser influenciado pelas condições ambientais do local de coleta..

Segundo Tonin et al. (2000), os cultivares/lotes que apresentam sementes de maior qualidade fisiológica, geralmente, são também as mais tolerantes às condições de estresse no campo.

Em relação aos resultados do teste de germinação após a rustificação, foi verificado declínio ao longo do processo, para ambos os períodos (3 e 6 dias) e para todos os clones/espécies (ver figuras 1 e 2). Ávila et al. (2007) destacam que o estresse pode reduzir tanto a germinação quanto a velocidade de germinação, com uma grande variação de respostas entre as espécies, desde aquelas muito sensíveis até as mais resistentes.

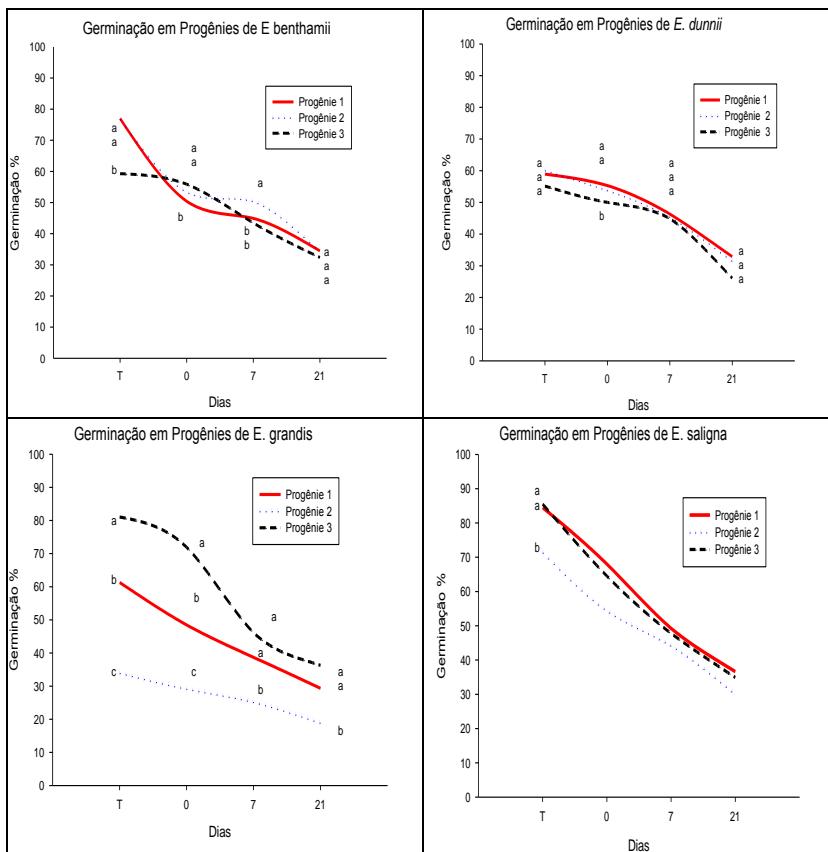
Para o tratamento 1 de rustificação, em *E. grandis* foram verificadas diferenças entre os clones testados. Os clones 1 e 3 apresentaram menor queda na germinação quando comparado ao clone 2.O clones 1 e 2 de *E. benthammii*, por exemplo, apresentaram comportamento distinto ao clone 3. Inicialmente (testemunha) estavam com 77% de sementes germinadas, caiu para 33% de sementes germinadas (ver figura 1). O clone 3 teve a menor queda em germinação. Nota-se ainda que os clones de *E. grandis* tiveram a maior diferença, entre si,nos resultados de germinação.

Já para *E. dunnii* foi observado que além de não ter diferença entre os clones, a redução na germinação foi menos acentuada em relação à testemunha (sem rustificação) (ver figura 1).

A maior queda nos resultados de germinação, para todas as espécies/clones, ocorreu em relação à testemunha e os 7 dias de rustificação. Isso ocorre, provavelmente, devido às sementes estarem no início da germinação visível (ver figura 3). Esses

resultados estão de acordo com os obtidos em *Brassicanapus L.* (canola), em que a aclimatação torna a espécie mais tolerante à geada e possibilita a minimização dos danos causados pelo frio (DALMAGO, 2010).

Figura 1 Germinação em espécies/progênieis de eucalipto após o processo de rustificação (tratamento1).



Fonte: produção do próprio autor.

Para imitar as condições ambientais do campo, durante o processo de rustificação, as sementes foram umedecidas

regularmente, o que pode ter prejudicado a germinação das sementes.

Santos (2000) cita que a partir da água livre presente no interior das células pode ocorrer a formação de cristais de gelo, gerando danos e perda da capacidade germinativa.

Em relação ao tratamento 2, foi verificada queda acentuada na germinação das sementes, sendo observado 100% de sementes mortas aos 21 dias de rustificação, para todas as espécies/clones (ver figura 2).

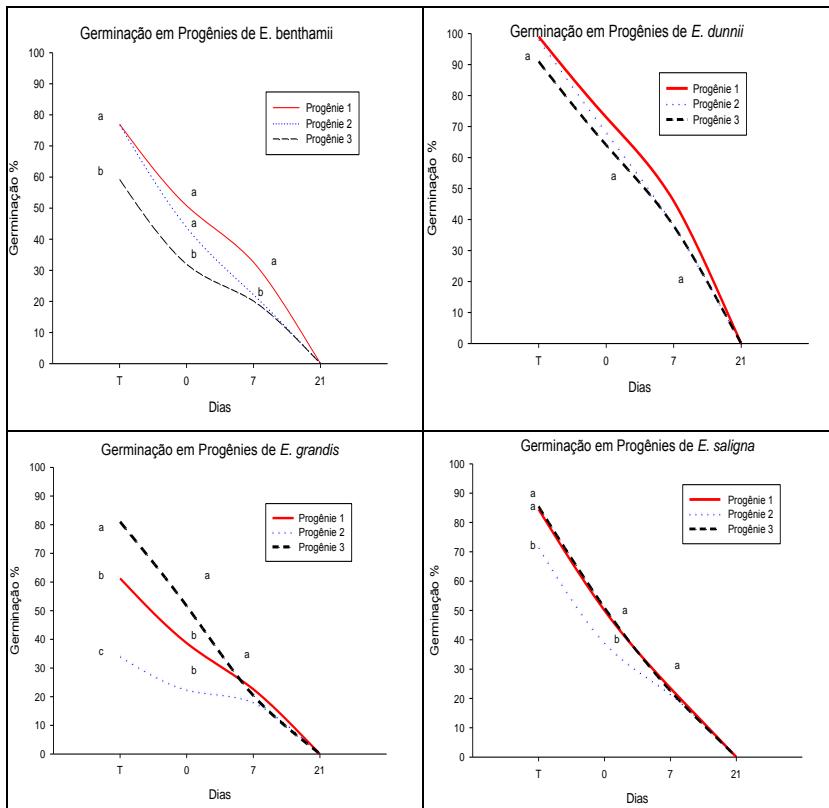
Esses resultados são verificados em sementes de outras espécies após estresse. Perez et al. (2005) observaram diminuição da viabilidade e do vigor das sementes com o aumento da intensidade dos estresses salino e térmico, ressaltando que o estresse térmico pode levar à perda de habilidade de germinar em temperaturas ótimas.

A perda do poder germinativo das sementes, no tratamento 2, pode ser devido ao fato dessas sementes estarem na fase 3 da germinação/embebição quando foram expostas a baixas temperaturas, como observado na curva de embebição das sementes (ver figura 3).

A curva de embebição em água (ver figura 3) demonstrou o padrão trifásico proposto por Bewley e Black (1994). Observou-se que a fase I, ocorreu nos primeiros 3 dias de embebição. O período de duração da fase II (LAG) foi de aproximadamente 1 dia. Já o início da fase III (germinação visível) ocorreu em 100 horas de embebição, ou seja, entre 4 e 5 dias, sendo que no sexto dia de embebição/germinação, as sementes foram expostas a baixas temperaturas.

Conforme Beckert et al. (2000), durante a fase III as sementes são mais sensíveis a fatores de estresse. O estresse térmico pode prejudicar a embebição das sementes, gerando danos ao sistema de membranas (POSMYK e JANAS, 2007), os quais prejudicam a germinação das sementes. O estresse em níveis moderados pode permitir aclimatação, adaptação e tolerância, mas em níveis mais severos pode levar até a morte celular (KRANNER et al., 2010), principalmente se o estresse ocorre durante a fase III de embebição.

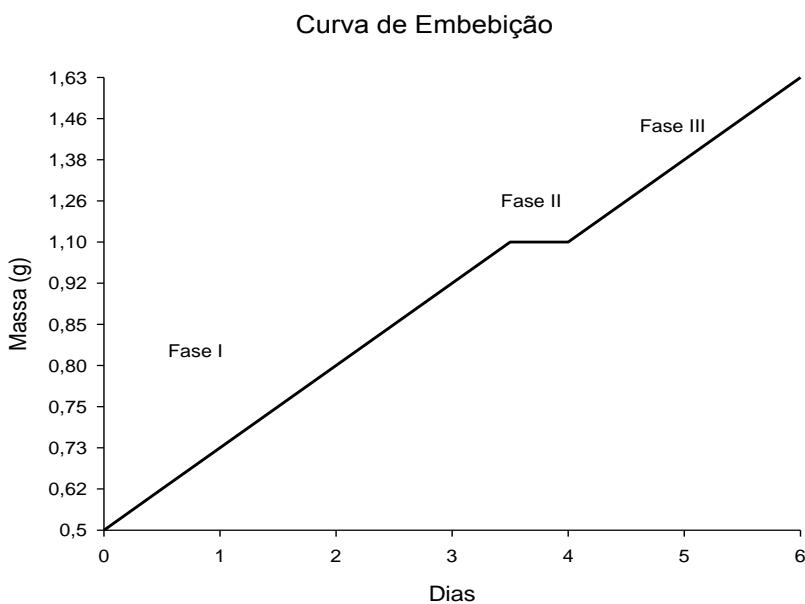
Figura 2 Germinação em espécies/progênieis de eucalipto após o processo de rustificação (tratamento 2).



Fonte: produção do próprio autor.

Apesar de ter sido observada redução na germinação das sementes após o período de baixas temperaturas, os dados obtidos na análise da concentração de açúcares solúveis totais demonstraram aumento ao longo do período de rustificação, independente da espécie, do clone e do período de rustificação (3 e 6 dias). Foi verificado maior acúmulo de açúcares em *Eucalyptus benthamii* e *E. dunnii* (ver figura 6), sendo que para *E. dunnii* maiores valores foram observados no clone 1 (ver figuras 4 e 5).

Figura 3 Curva de embebição de sementes do gênero *Eucalyptus*.



Fonte: produção do próprio autor.

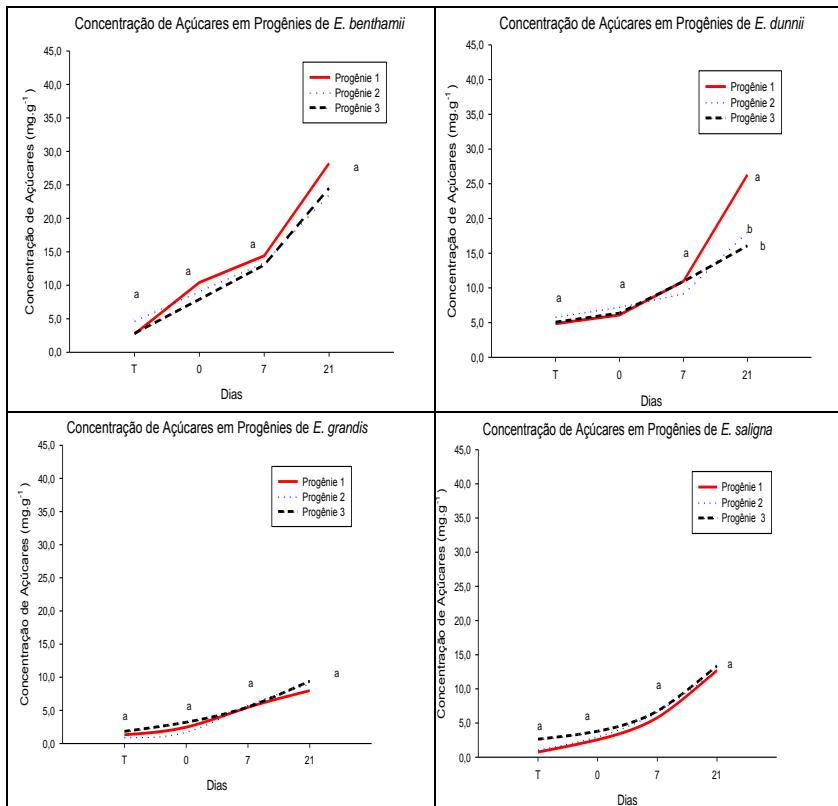
Segundo Snyder et al. (2005), algumas plantas desenvolvem mecanismos para resistirem e/ou tolerarem o congelamento.

Por isto, existe muita variabilidade entre espécies/variedades vegetais no que se refere à resistência às geadas. A mesma planta/tecido tem resistência diferenciada de acordo com o seu estado de desenvolvimento e grau de aclimatação.

O acúmulo de açúcares observados nas espécies/clones (ver figuras 4 e 5) também foi encontrado em mudas de *Eucalyptus spp* por Floriani et al. (2011), só que nesse caso houve relação entre a tolerância ao frio e a concentração de carboidratos solúveis totais, o que pode possibilitar a identificação de genótipos resistentes ao frio.

Borges et al. (2006) afirmam que a tolerância ao congelamento em *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) também pode estar relacionada às altas concentrações de açúcares.

Figura 4. Concentração de açúcares solúveis em espécies/progênies de eucalipto após a rustificação (T1).

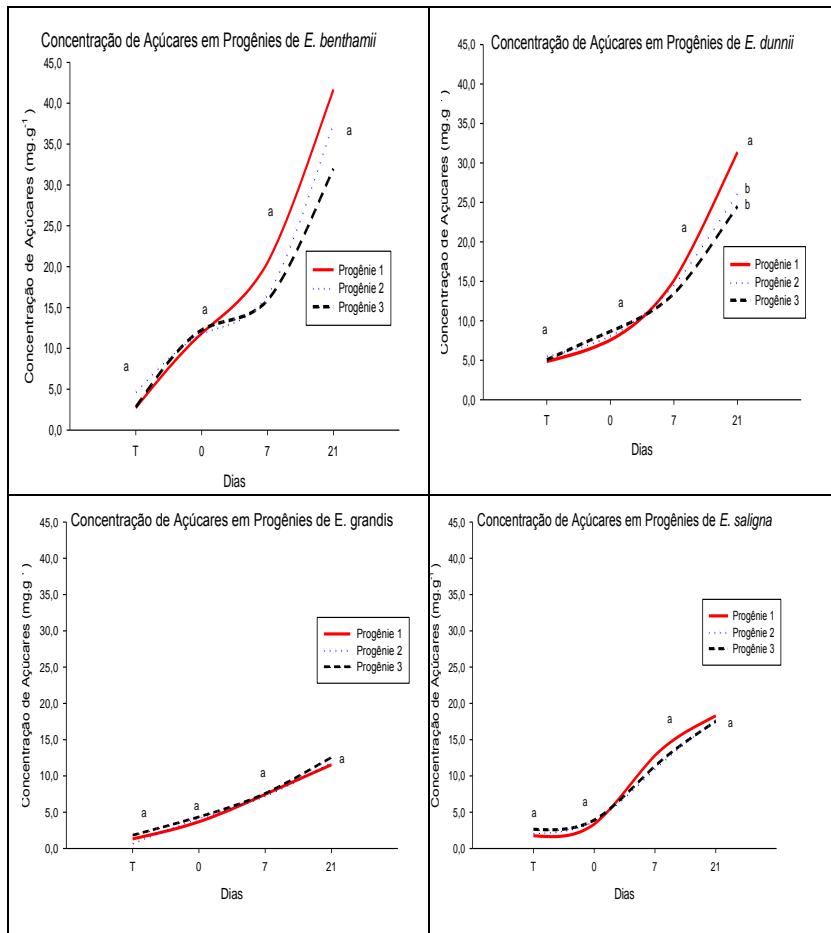


Fonte: produção do próprio autor.

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 da semente, impedindo a fusão de membranas e o rompimento dos compartimentos celulares (Hoekstra et al., 2002).

Figura 5 Concentração de açúcares solúveis em espécies/progênies de eucalipto após a rustificação (T2).



Fonte: produção do próprio autor.

Foi observado que a espécie *Eucalyptus benthammii* teve a maior produção de açúcares em relação às demais espécies (ver figura 6). Essa espécie obteve destaque na resistência à neve que ocorreu no inverno de 2013. Ressalta-se, porém, que *Eucalyptus dunnii* mesmo apresentando uma baixa qualidade fisiológica inicial de suas sementes, não teve uma queda de germinação tão acentuada. Mostrou-se uma espécie promissora a tolerância ao frio mesmo quando possui baixa qualidade.

Villela e Peres (2004) citam que a qualidade de sementes é bastante influenciada pelo seu teor de água e pela temperatura do ambiente.

Assim, mesmo com os elevados teores de açúcares observados nas sementes das diferentes espécies/clones (ver figuras 4 e 5), a qualidade foi reduzida durante a rustificação, provavelmente pela junção dos fatores baixa temperatura e alto teor de água.

É importante observar que a concentração de açúcares inicial é variável entre espécies (ver figura 6). Apesar de *E. benthammii* e *E. dunnii* produzirem mais açúcares ao longo da rustificação, são também as espécies quem possuem mais carboidrato em sua constituição natural.

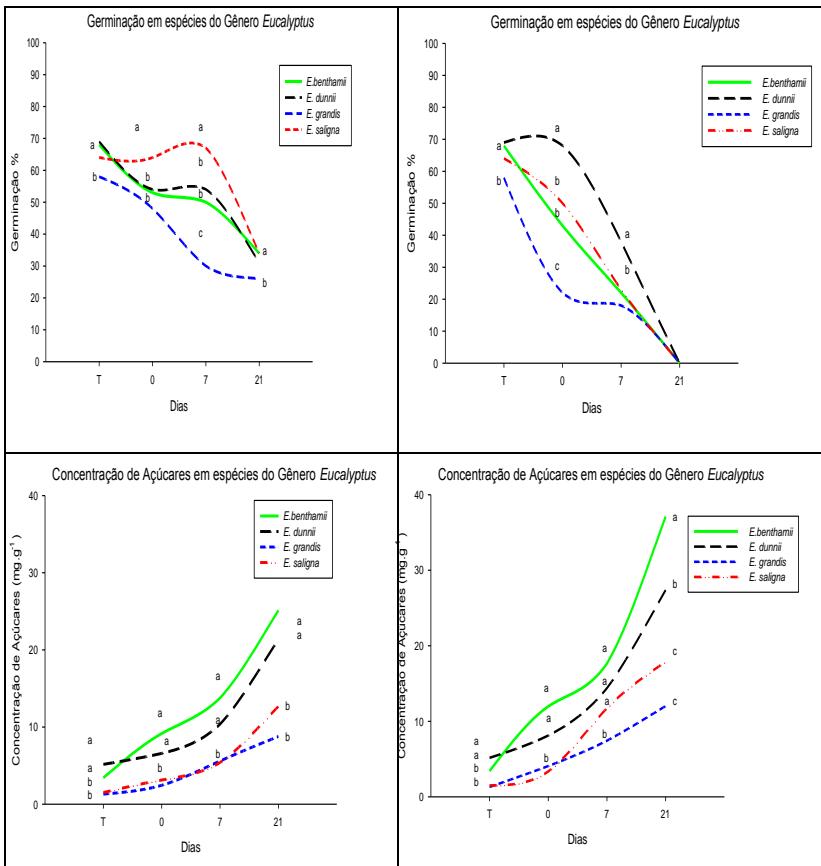
Segundo Larcher (2000), a tolerância ao frio pode ser uma característica genética. E essa característica de tolerância ao frio pode ser favorecida em espécies que já possuem maior concentração de carboidrato.

Nilsen e Orcutt (1996) afirmam que o mecanismo de tolerância ao frio inclui processos que permitem a exposição ao frio sem consequências letais para a planta.

Porém, esse estudo demonstrou que as espécies com maior carboidrato inicial, sintetizaram mais ao longo da rustificação, mas isso não foi o suficiente para manter a sobrevivência das espécies testadas.

De acordo com os resultados obtidos a rustificação não é recomendada. As sementes que passaram somente por aclimatação (ver figura 6) tiveram um índice maior ou igual de germinação que as espécies rustificadas.

Figura 6 Concentração média de açúcares e germinação média em espécies do gênero Eucalyptus, (tratamento 1 e 2).



Fonte: produção do próprio autor.

Observa-se que as sementes morrem quando foram expostas a temperaturas negativas (ver quadro 1), pois com a elevada umidade ocorreu a formação de cristais de gelo que danificaram a membrana e levaram a morte das sementes. A síntese de açúcares durante a rustificação não foi suficiente para manter a viabilidade das sementes nas espécies estudadas

3.6 CONCLUSÃO

A concentração de açúcares em -8 ° C não influencia a tolerância ao frio.

3.7 REFERÊNCIAS

ABRAF. Anuário estatístico da ABRAF 2012 ano base 2011 / **ABRAF.** – Brasília: 2012.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. de. **Clonagem e doenças do eucalipto.** Viçosa: Editora UFV, 2004. 442p.

ALMEIDA M.H, et al. Cold acclimation in Eucalyptus hybrids. **Tree Physiol** 14: 921-932, 1994.

ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A. de L.; SCAPUM, C.R. Influência do estresse hídrico simulado com manitol na germinação de sementes e crescimento de plântulas de canola. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 29, nº 1, p.98-106, 2007.

ANNICCHIARICO, P. et al. Variation in cold tolerance and spring growth among Italian white clover populations. **Euphytica**, v.122, p.407-416, 2001.

BRACELPA. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL. Relatório Estatístico 2012, São Paulo, **Bracelpa**, 2013, 44p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.

BARBEDO et al. Osmocondicionamento no Armazenamento de Sementes de Cedro-Rosa. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 19, no 2, p.354-360 – 1997.

BECKERT,O.P.; MIGUEL, M.H.; MARCOS FILHO, J. Absorção de água e potencial fisiológico em sementes de soja de diferentes tamanhos. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.57, n.3, p. 671-675, 2000.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.** 2 nd ed. New York: Plenum Press, 1994.
445 p.

BEWLEY J.D., BRADFORD, K., HILHORST, H., NONOGAKI, H
Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy. 3rd ed. 2013, Springer, XIII, 392 p.

BORGES, I.F., BARBEDO, C.J., RICHTER, A.A. e FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Variations in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of brazilwood (*Caesalpinia echinata*Lam., Leguminosae). **Brazilian Journal of Plant Physiology** 18(4): 475-482, 2006.

DALMAGO, Genei Antonio et al .Aclimatação ao frio e dano por geada em canola. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília , v. 45, n. 9, Sept. 2010.

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

FRANCA NETO, J.B.; KRYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; WEST, S.H.; MIRANDA, L.C. Soybean seed quality as affected by shriveling due to heat and drought stresses during seed filling. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 21,n. 1, p. 107-116, 1993.

FLORIANI, M.M.P; STEFFENS, C.A; E CHAVES, D. M. Rustificação de plantas de *Eucalyptus dunnii* Maiden e a relação entre as concentrações de açúcares solúveis totais e de prolína foliar e a tolerância ao frio. **Revista Árvore** [online]. 2011, vol.35, n.1, pp. 21-29.ISSN 0100-6762.

HOEKSTRA, F.A., GOLOVINA, E.A. & BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science** 6:431-438. 2001.

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.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M.F.B.; BELTRAME, R.; SANTOS, A.F.; MEZZOMO, R.; PIVETA, G.; BLUME, E. Qualidade fisiológica e tratamentos de sementes de *cedrela fissilis* procedentes do sul do Brasil. **Revista Árvore**, v.37, n.2, Viçosa, 2013.

MAGUIRE, J.D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, p. 176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. **Desenvolvimento (Maturação) de sementes**. In: MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: FEALQ, p.91-142, 2005.

MASSARO, R.A.M.; BONINE, C.A.V.; SCARPITANI, E.A.; DE PAULA, R.C. Viabilidade de aplicação da seleção precoce em testes clonais de *Eucalyptus* spp. **Ciência Florestal**, v.20, p.597-609, 2010.

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.

PEREZ, S.C.J.G.A.; JARDIM, M.M. Viabilidade e vigor de sementes de paineira após armazenamento, condicionamento e estresses salino e térmico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.6, p.587-593, 2005.

POSMYK, M.M.; JANAS, K.M. Effects of seed hydropriming in presence of exogenous proline on chilling injury limitation in *Vigna radiata* L. seedlings. **Acta Physiol Plant**, v. 29, p. 509–517, 2007.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 12 (especial): 70-84.2000.

Snyder, R.L.; De Melo-Abreu, J.P.; Matulich, S. **Frost Protection: Fundamentals, Practice and Economics**. Vol. II. United Nations, Food and Agriculture Organization, Rome, 64 pp. 2005.

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** 79: 291–297, 1997.

TINUS, R.W.; BURR, K.E.; ATZMON, N. and RIOV, J. Relationship between carbohydrate concentration and root growth potential in coniferous seedlings from three climates during cold hardening and dehardening. **Tree Physiology**, vol. 20, no. 16, p. 1097-1104. 2000.

TONIN, G.A.; CARVALHO, N.M.; KRONKA, S.N.; FERRAUDO, A.S. Influência do cultivar e do vigor no desempenho germinativo de sementes de milho em condições de estresse hídrico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.22, n.1, p.276-279, 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**, vol. 114, no. 4, p. 1433-1442, 1997.

VIANA, A. P. et al. Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* fl. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas determinada

por marcadores RAPD.**Rev. Bras. Frutic.** 2003, v. 25, n. 3, pp. 489-493.

VILLELA, F.A. e PERES, W.B. Coleta, beneficiamento e armazenamento. In **Germinação: do básico ao aplicado** (A.G. Ferreira & F.Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p.265-281. 2004.

4 COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE DESCONGELAMENTO EM ESPÉCIES DO GÊNERO *EUCALYPTUS*

4.1 RESUMO

Objetivou-se comparar dois métodos de descongelamento de sementes de diferentes espécies de *Eucalyptus* após a criopreservação. Foram utilizadas sementes puras de três clones das espécies: *Eucalyptus dunii Maiden*, *E. benthamii Maiden et Cambage*, *E. grandis Hill ex Maiden* e *E. saligna Smith*. Inicialmente, as sementes foram beneficiadas e foram determinadas características físicas e fisiológicas. Em seguida, as sementes foram submetidas foram congeladas em nitrogênio líquido (-196 °C) e armazenadas em ultra freezer a temperatura de - 80°C. Para o método por banho maria, as sementes foram descongeladas a uma temperatura de 40 °C controlada por um banho termostatizado. Já o método por temperatura ambiente consistiu no descongelamento à temperatura de 25±3 °C durante tempo 60 minutos. O experimento foi realizado conforme o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e teste de comparação de médias (Tukey a p<0,05). Os resultados obtidos indicaram que o método de descongelamento à temperatura ambiente é o mais indicado para as espécies estudadas.

Palavras-chave: *Eucalyptus*, descongelamento, qualidade fisiológica.

4.2 ABSTRACT

This study aimed to compare two methods of thawing of seeds of different species of Eucalyptus after cryopreservation . Pure seeds from three clones of the species were used: Eucalyptus dunii Maiden, E. benthamii Maiden et Cambage , E. grandis Hill ex Maiden and E. saligna . Initially, seeds were processed and were given physical and physiological characteristics. Then the seeds were submitted were frozen in liquid nitrogen (-196 ° C) and stored in ultra-freezer at a temperature of - 80 ° C. For a water bath method, the seeds were thawed at a temperature of 40 ° C controlled by a thermostatic bath. Have the method for room temperature consisted of thawing temperature of 25 ± 3 ° C for 60 minutes time. The experiment was conducted as a completely randomized design with four replications. Data were subjected to analysis of variance and mean comparison test (Tukey $p < 0.05$). The results indicated that the method of defrosting at room temperature is the most suitable for the species studied.

Keywords: Eucalyptus, defrost, physiological quality.

4.3 INTRODUÇÃO

O eucalipto é uma espécie florestal nativa da Austrália e ilhas circunvizinhas, que em função de características como crescimento rápido, adaptação e produtividade, tem sido explorado em diversos países como o Brasil (ALMEIDA, 2004).

Para ampliar o conhecimento de uma espécie é preciso estudar os métodos de armazenamento do seu material genético (FONSECA et al., 2012), o que permite saber qual é a melhor forma de se estocar sementes por um longo período de tempo sem perder sua qualidade fisiológica. (TRESENA et al., 2009).

A criopreservação é a conservação de material biológico a temperaturas baixas, interrompendo o metabolismo celular e sendo considerada uma técnica promissora de preservação em longo prazo do germoplasma de espécies vegetais (CARVALHO e VIDAL, 2003). Contudo, durante a exposição ao nitrogênio líquido sementes de algumas espécies podem ter considerável redução da sua viabilidade (BARBOUR e PARRESOL, 2003).

A utilização do nitrogênio líquido como um meio de armazenamento pressupõe que as sementes sobrevivam à exposição sem sofrer danos maiores à sua viabilidade, e para isso, o teor de água da semente é, provavelmente, o mais crítico fator para o sucesso da crioconservação, pois se o conteúdo de água da semente for muito alto, observa-se a sua morte instantânea durante o processo de congelamento e/ou descongelamento (OSPINHA et al., 2000).

Guy (2003) afirma que durante o congelamento ocorre formação de gelo extracelular, enquanto o meio intracelular permanece descongelado, devido à presença de barreiras celulares prevenindo a formação de cristais de gelo no citoplasma.

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, 2001).

Ainda não existe uma rotina de laboratório que possa garantir a conservação do germoplasma vegetal. Para o sucesso da crioconservação é preciso observar o grau de umidade da semente, a velocidade de congelamento e descongelamento e danos físicos à semente (ALMEIDA, 2000).

Assim, o objetivo desse trabalho foi comparar métodos de descongelamento em sementes de diferentes espécies e genótipos de *Eucalyptus*.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de três clones das espécies *Eucalyptus dunii* (tolerante), *E. benthamii* (tolerante), *E. grandis Hill ex Maiden* (intolerante) e *E. saligna Smith* (intermediária), procedentes de pomar clonal. Após a colheita, as sementes foram beneficiadas com o auxílio de peneira e lupa, sendo utilizadas somente sementes puras nos experimentos.

Para caracterização inicial, as sementes foram submetidas a testes físicos e fisiológicos, como grau de umidade, germinação, índice de velocidade de germinação, envelhecimento acelerado e frio.

A determinação do grau de umidade das sementes foi realizada em estufa com circulação de ar a 105 ± 3 °C por 24 horas, usando-se três subamostras de 5 g de sementes por repetição, conforme metodologia descrita nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Para o teste de germinação foram utilizadas quatro subamostras de 0,10 g de sementes puras, semeadas em caixas tipo gerbox, com uma folha de papel de filtro previamente umedecida com 6 ml de água destilada. Foi utilizada temperatura de 25 °C, com a primeira contagem aos cinco dias e a contagem final aos 14 dias após a montagem do teste (BRASIL, 2009).

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi determinado pela contagem do número de plântulas emergidas a cada dia, a partir da semeadura até o décimo quarto dias, sendo calculado de acordo com Maguire (1962).

O teste de envelhecimento acelerado foi realizado a 42 °C por 24 horas a 100% de umidade relativa. Esse teste foi conduzido pelo método do gerbox, segundo metodologia proposta por Marcos Filho (2005). Foram utilizadas caixas transparentes de plástico (gerbox), com tampa, adaptadas como mini-câmaras, dentro das quais foram adicionados 40 mL de água destilada. Foram usadas quatro subamostras de 0,10 g para cada clone/espécie.

Para o teste de frio foram utilizadas quatro repetições 0,10g de sementes, que foram colocadas em um solo do tipo Cambissolo. A temperatura utilizada foi de 10 °C e o período de exposição ao frio de 7 dias. Após esse período as sementes

foram colocadas para germinar, segundo descrição citada acima (teste de germinação).

Após as análises iniciais, as sementes foram submetidas à rustificação a temperaturas de 5 °C e de 1 °C, sob fotoperíodo e termoperíodo controlado de 12 horas. Ao final da rustificação, as sementes foram submetidas a quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8 °C), sendo utilizado um período de exposição de três horas cada gradiente.

Antes das sementes serem submetidas à rustificação, elas foram mantidas em fotoperíodo e termoperíodo controlado de 12 horas, com temperaturas de 20 °C e de 12 °C sendo um tratamento durante três dias.

Em seguida, as temperaturas foram alteradas para temperatura de 15 °C e de 9 °C, mantendo-se o fotoperíodo e termoperíodo controlado de 12 horas. Posteriormente, a temperatura foi reduzida para 10 °C e para 5 °C. Após esse período estabelece-se o Ponto Zero, onde as sementes passaram pelo processo de rustificação, conforme descrito acima (FLORIANI et al., 2011).

Após a rustificação as sementes foram congeladas em nitrogênio líquido (-196 °C) e armazenadas em ultra freezer a temperatura de -80°C, por 60 dias.

O método para descongelamento por banho maria consistiu no uso de temperatura de 40 °C controlada por um banho termostatizado durante 3 minutos. Já o método por temperatura ambiente consistiu no descongelamento à temperatura de 25±3 °C durante 60 minutos.

Após o descongelamento, foram feitas análises da qualidade fisiológica por meio do teste de germinação, seguindo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e teste de comparação de médias de Tukey ($p<0,05$) para os métodos de descongelamento e espécies/clones de eucaliptos.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram que a qualidade das espécies/clones dependeu do teste utilizado. No entanto, de forma geral, sementes de *E. dunnii* apresentaram os piores resultados (ver tabela 2).

Os testes de germinação, IVG e primeira contagem em *E. dunnii* apresentaram os mais baixos valores quando comparados as demais espécies, com resultados semelhantes entre os clones.

Esses resultados podem ser devido aos fatores ambientais durante a maturação das sementes ou à qualidade genética dessas sementes (FRANÇA NETO et al., 1993). Lazarotto et al. (2013) ressaltam que o vigor, ou a viabilidade, das sementes pode ser influenciado pelas condições ambientais do local de coleta.

Segundo Tonin et al. (2000), os cultivares/lotes que apresentam sementes de maior qualidade fisiológica, geralmente, são também as mais tolerantes às condições de estresse no campo.

Já Fonseca (2012) não encontrou diferenças entre os métodos de descongelamento banho maria e ambiente para sementes de *Pinus elliotti*, observando também perda da qualidade fisiológica das sementes.

Diniz (1999) não encontrou em seu trabalho diferenças no descongelamento utilizando micro-ondas, banho maria e temperatura ambiente.

Em relação aos resultados dos métodos de descongelamento, foi observado que, de forma geral, sementes submetidas ao método à temperatura ambiente foram as com maior germinação (ver tabela 2).

. Cavalcanti Mata (2001) indica que a qualidade das sementes, juntamente com sua capacidade de armazenamento em temperaturas criogênicas, permite viabilizar a criopreservação, porém é preciso determinar a umidade limite, pois em excesso de água pode ocorrer morte instantânea durante o processo de descongelamento (GONZAGA et al. (2008),

Tabela 2 Caracterização física e fisiológica de sementes de diferentes clones de espécies de *Eucalyptus*.

Espécies	G(%)	IVG	PC (%)	U(%)	TF(%)	EA (%)
<i>E. benthamii</i>						
Clone 1	77,0 b	28,3 a	13,0 b	6,85 c	33,0 a	45,0 a
Clone 2	77,0 b	21,2 b	10,0 c	8,38 b	21,0 c	32,0 c
Clone 3	59,0 c	19,1 c	7,0 c	6,96 c	32,0 a	40,0 a
<i>E. dunnii</i>						
Clone 1	59,0 c	19,0 c	8,0 c	8,68 a	26,0 b	24,0 d
Clone 2	60,0 c	13,2 d	50 d	7,24 c	25,0 b	24,0 d
Clone 3	57,0 c	15,1 d	5,0 d	8,75 a	19,0 c	22,0 d
<i>E. grandis</i>						
Clone 1	61,0 b	23,9 b	14,0 a	8,79 a	20,0 c	43,0 a
Clone 2	44,0 d	14,4 d	5,0 d	8,32 b	17,0 d	24,0 d
Clone 3	89,0 a	29,1 a	16,0 a	7,91 b	21,0 c	33,0 c
<i>E. saligna</i>						
Clone 1	84,0 a	20,5 b	8,0 c	8,37 b	23,0 b	36,0 b
Clone 2	71,0 b	20,6 b	5,82 c	8,39 b	21,0 c	19,0 d
Clone 3	86,0 a	23,0 b	10,0 b	9,19 a	26,0 b	46,0 a
CV %	6,7	7,1	9,1	8,52	9,9	10,3

G = teste de germinação, IVG = Índice de velocidade de germinação, PC = primeira contagem, U = umidade, TF = teste de frio, EA = envelhecimento acelerado. Letras desiguais na coluna diferem estatisticamente pelo Teste Tukey a 5% de significância ($P<0.05$).

Fonte: produção do próprio autor.

Ressalta-se que todas as espécies após o descongelamento reduziram a germinação (ver tabela 3); Provavelmente devido a danos causados pelo conteúdo de água das sementes durante o congelamento e/ou descongelamento, já que durante o processo de rustificação as sementes foram molhadas regularmente.

Por outro lado, segundo Goldfarb (2003) se o conteúdo de água nas sementes for muito baixo estas poderão perder a

plasticidade, e gerar rompimento das estruturas celulares durante o processo.

Tabela 3 Germinação (%) de sementes de diferentes clones de *Eucalyptus* submetidas ao descongelamento em temperatura ambiente e em banho maria, além da testemunha (não submetida ao congelamento).

Espécies	Testemunha	Banho Maria	Ambiente	CV%
<i>E. benthamii</i>				
Clone 1	77,0 a	38,0 b	51,0 a	15,9
Clone 2	77,0 a	54,0 a	59,0 a	16,5
Clone 3	59,0 a	43,0 b	51,0 a	9,1
<i>E. dunnii</i>				
Clone 1	59,0 a	44,0 b	52,0 a	9,0
Clone 2	60,0 a	45,0 b	54,0 a	9,2
Clone 3	57,0 a	40,0 b	50,0 a	8,7
<i>E. grandis</i>				
Clone 1	61,0 a	39,0 b	49,0 a	10,3
Clone 2	44,0 a	24,0 a	29,0 a	15,2
Clone 3	89,0 a	53,0 b	72,0 a	11,7
<i>E. saligna</i>				
Clone 1	84,0 a	51,0 b	68,0 a	13,1
Clone 2	71,0 a	40,0 b	54,0 a	13,6
Clone 3	86,0 a	52,0 b	69,0 a	12,8

Letras desiguais na linha diferem estatisticamente pelo Teste Tukey a 5 % de significância ($P < 0,05$).

Fonte: produção do próprio autor.

Ressalta-se que antes das sementes serem congeladas, elas passaram por um processo de rustificação, em que foram umedecidas para que fosse simulado as condições encontradas em campo. Não foi avaliado qual era esse índice após a rustificação. O teor de água nas sementes no momento em que foram colocadas para rustificar variou de 6% a 9%, (ver tabela 2) variando conforme espécie/clone analisado.

Towill (2002) considera que o ponto mais crítico na criopreservação de sementes ortodoxas é definir o teor de água ideal antes da imersão em nitrogênio líquido.

Assim, apesar dos resultados observados indicarem que o descongelamento por meio de temperatura ambiente é o mais indicado para espécies do gênero *Eucalyptus*, é fundamental estudos que visem definir o teor máximo de água que essas sementes devem conter para evitar danos durante os processos de congelamento/descongelamento.

4.6 CONCLUSÃO

O método de descongelamento por temperatura ambiente é o mais indicado para as espécies de *Eucalyptus* estudadas.

4.7 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.C.; LANDSBERG, J.J.; SANDS, P.J. Parametrisation of 3-PG model for fast growing *Eucalyptus* grandis plantations. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.193, p.179-195, 2004.
- ALMEIDA, F. de A.C.; PITA VILLAMIL, J.M.; GOUVEIA, J.P.G. de. Efecto de la crioconservacion sobre la germinacion de semillas de leguminosas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.2, n.1, p.67-71, 2000.
- ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A. de L.; SCAPUM, C.R. Influência do estresse hídrico simulado com manitol na germinação de sementes e crescimento de plântulas de canola. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 29, nº 1, p.98-106, 2007.
- BARBOUR, J.R. e PARRESOL, B.R. Effect of liquid nitrogen storage on seed germination of 51 tree species. **Seed Technology** 2: 183-190, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.
- CARVALHO, J.M.F.; VIDAL, M.S. **Crioconservação no Melhoramento Vegetal**. Campina Grande, 2003. 22p.
- DINIZ et al. Influência das técnicas de descongelamento na qualidade fisiológica de sementes de milho crioconservadas **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.1, n.1, p.1-12, 1999.
- FRANCA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; WEST, S.H.; MIRANDA, L.C. Soybean seed quality as affected by shriveling due to heat and drought stresses during seed

filling. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 21, n. 1, p. 107-116, 1993.

FONSECA, A.G. Qualidade fisiológica de sementes de *Pinus elliotti* Engelm. submetidas a diferentes métodos de armazenamento. **CERNE**, Lavras , v. 18, n. 3, Sept. 2012.

GOLDFARB et al. Teor de água limite para crioconservação das sementes de pinhão manso. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.8, n.2, p.121-129, 2008

GONZAGA, T.W.C.; CAVALCANTI MATA, M.E.R.M.; SILVA, H.; DUARTE, M.E.M. Crioconservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.), e baráuna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.) **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.5, n.2, p.145- 154, 2003.

GONZALEZ, R.A.F. **Efeito da criopreservação usando técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino**. Pirassununga: RAF, 2004. 92p.

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

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M.F.B.; BELTRAME, R.; SANTOS, A.F.; MEZZOMO, R.; PIVETA, G.; BLUME, E. Qualidade fisiológica e tratamentos de sementes de *cedrela fissilis* procedentes do sul do Brasil. **Revista Árvore**, v.37, n.2, Viçosa, 2013.

MARCOS FILHO, J. Desenvolvimento (Maturação) de sementes. In: MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, p.91-142, 2005.

MARTÍNEZ-MONTERO, M.E.; MORA, N.; QUIÑONES, J.; GONZÁLEZ-ARNAO, M.T.; ENGELMANN, F.; LORENZO, J.C. Effect of cryopreservation on the structural and functional integrity

of cell membranes of sugarcane (*Saccharum* sp.) embryogenic calluses. **CryoLetters**, London, n.23, p.237-244, 2002.

MOLINA, T.F.; TILLMANN, M.A.A.; DODE, L.B.; VIÉGAS, J. Crioconservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 3, p. 72-81, 2006.

OSPINA, J.A.; GUEVARA, C.L.; CAICEDO, L.E.; BARNEY, V. Effects of moisture content on *Passiflora* seed viability after immersion in liquid nitrogen. In: ENGELMANN, F. and TAKAGI, H. (Eds.) **Cryopreservation of tropical plant germplasm – Posters**. Japan International Centre for Agricultural Sciences, Tsukuba/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, p. 384-388, 2000.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, n.3, p.499-514, 1973.

SANTOS, I. R. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n.20, p.60-65, mai/jun 2001.

SOARES, M.P.; ROSSI, C.A.R.; MEZZALIRA, A. Etileno glicol na criopreservação de sêmen canino. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.4, p.649-655, 2002.

TONIN, G.A.; CARVALHO, N.M.; KRONKA, S.N.; FERRAUDO, A.S. Influência do cultivar e do vigor no desempenho germinativo de sementes de milho em condições de estresse hídrico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.22, n.1, p.276-279, 2000.

TRESENA, N.L.; MATA, M. E.R.C.; DUARTE, M.E.M.; MORAES, A.M.; DIAS, V.S. Qualidade fisiológica da semente de ipê rosa (*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo) submetidas à crioconservação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 11, p. 87-92, 2009.

5 CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS E TOLERANCIA AO FRIO EM SEMENTES DE *Pinus taeda L.*

5.1 RESUMO

Objetivou-se avaliar a concentração de açúcares solúveis totais em diferentes clones de *Pinus taeda L.* e sua relação com a tolerância ao frio em sementes. Foram utilizadas sementes puras de três clones. Inicialmente, as sementes foram beneficiadas, e foram determinadas características físicas (umidade) e fisiológicas das sementes (testes de germinação, primeira contagem, índice de velocidade de germinação, frio e envelhecimento acelerado). Em seguida, as sementes foram submetidas à rustificação em três períodos a temperaturas de 5 °C e de 1 °C, sob fotoperíodo e termoperíodo de 12 horas. Ao final de cada nível de rustificação, as sementes foram submetidas a quatro gradientes de temperatura (-2, -4, -6 e -8°C), sendo utilizado um período de exposição de três horas cada. Antes das sementes serem submetidas à rustificação, elas foram mantidas em fotoperíodo e termoperíodo de 12 horas, com temperaturas de 20 °C e de 12 °C sendo um tratamento durante três dias (tratamento 1) e em outro durante seis dias nessas temperaturas (tratamento 2). Em seguida, as temperaturas foram alteradas para temperatura de 15 °C e de 9 °C, mantendo-se o fotoperíodo e termoperíodo de 12 horas. Posteriormente, a temperatura foi reduzida para 10 °C e para 5 °C. Determinou-se a concentração de açúcares solúveis e a germinação após a rustificação. O experimento foi realizado conforme o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento de rustificação/espécie/clone. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e teste de comparação de médias (Tukey a $p<0,05$). Os resultados obtidos indicaram que a concentração de açúcares não deve estar influenciando isoladamente para a tolerância ao frio. Os resultados obtidos indicaram que a concentração de açúcares não influencia isoladamente para a tolerância ao frio de sementes de *P. taeda*.

Palavras-chave: *Pinus*, carboidrato, seleção precoce.

5.2 ABSTRACT

Aimed to evaluate the concentration of total soluble sugars in different clones of *Pinus taeda* L. and its relationship to seed resistance to fro. Foram used pure seed three clones. Initially, seeds were treated, and were given physical (moisture) and physiological characteristics of seeds (germination, first count, index of germination speed, cold and accelerated aging). Then the seeds were subjected to hardening into three periods at temperatures of 5 °C and 1 °C under controlled photoperiod and thermoperiod 12 hours. At the end of each level of hardening , the seeds were subjected to four temperature gradients below freezing (-2 , -4 , -6 and -8 ° C) , an exposure period of three hours each gradient being used. Before the seeds are subjected to hardening, they were kept at a photoperiod and thermoperiod controlled to 12 hours at temperatures of 20 °C and 12 °C is a treatment for three days (treatment 1) and another six days at these temperatures (treatment 2). Then the temperature was changed to 15 °C and 9 °C, maintaining the controlled thermoperiod photoperiod and 12 hours. Subsequently, the temperature was reduced to 10 °C and 5 °C. Determined the concentration of soluble sugars and germination after hardening. The experiment was conducted as a completely randomized design with four replications for each treatment rustification / species / clone. Data were subjected to analysis of variance and mean comparison test (Tukey p < 0.05). The results indicated that the concentration of sugars should not be influencing separately for cold tolerance. The results indicated that the sugar concentration does not influence alone for the cold tolerance of seeds of *P. taeda*.

Keywords: *Pinus*, carbohydrate, early selection.

5.3 INTRODUÇÃO

De acordo com a ABRAF (2012), a área ocupada por plantios florestais de *Pinus* e *Eucalyptus* no Brasil totaliza 6.510.693 ha, sendo 73% correspondente à área de plantios de *Eucalyptus* e 27% a plantios de *Pinus*.

A maior concentração de plantios florestais destes dois gêneros ocorre nas regiões Sul e Sudeste do país (ZENID, 2009), com aproximadamente 75,2%, onde também estão localizadas as principais unidades industriais dos segmentos de celulose, papel, painéis de madeira, madeira serrada e siderurgia a carvão vegetal (ABRAF, 2012).

Em relação às florestas de *Pinus*, as espécies que mais se destacam são o *P. elliottii* e o *P. taeda*, devido a facilidade de tratos silviculturais, rápido crescimento e reprodução intensa (SHIMIZU, 2005).

O *Pinus taeda* L, também conhecido como Loblolly pine, é natural dos Estados Unidos, e sua faixa de dispersão vai desde o nível do mar até 2.500 m de altitude, ocasionalmente até 4.500 m, com ampla variação do tipo de solo (KRONKA et al., 2005). A espécie costuma ser propagada por meio de sementes, já que estas são produzidas em grande escala (GOLLE, 2010).

Nos estados do Sul do Brasil, o plantio com eucalipto se resume em apenas 11 % da área plantada, isso é muito pouco comparado aos 80% de plantios com *Pinus* (ABRAF, 2012). *P. taeda* é uma das espécies do gênero de maior desenvolvimento na Região Sul do Brasil, alcançando incrementos médios anuais (IMA) superiores a 40 m³/ha/ano aos 18 anos e níveis de produtividade entre os maiores do mundo para a espécie (FERREIRA, 2005).

Apesar da importância da espécie em regiões frias do país, faltam estudos referentes a seleção de material (clones) tolerantes ao frio, visto que, segundo Larcher (2000) a tolerância ao frio pode variar de acordo com o genótipo de uma mesma espécie.

A relação da tolerância ao frio com a concentração de açúcares, método que pode viabilizar a seleção precoce de clones, foi utilizada em trabalhos realizados por Pereira et al. (1997), Xiang et al. (2002), e Tolfo (2003). Esses autores

ressaltam que a identificação de características bioquímicas, que representam a tolerância ao frio, como as concentrações de açúcares, pode servir como ferramentas para a seleção precoce de espécies com potencial de cultivo em regiões frias.

Objetivou-se com o trabalho relacionar os teores de açúcares solúveis em sementes de diferentes genótipos de *Pinus taeda L.*, com a tolerância ao frio.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de três clones da espécie *Pinus taeda* L. procedentes de pomar clonal, localizado em Telêmaco Borba PR. A determinação do grau de umidade das sementes foi realizada em estufa com circulação de ar a 105 ± 3 °C por 24 horas, usando-se duas subamostras de 25 unidades de sementes por repetição, conforme metodologia descrita nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Para o teste de germinação, foram utilizadas quatro subamostras de 25 de sementes puras, semeadas em caixas tipo gerbox, com uma folha de papel de filtro previamente umedecida com 6 ml de água destilada. Foi utilizada temperatura de 22 °C, com a primeira contagem aos sete dias e a contagem final aos 28 dias após a montagem do teste, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi determinado pela contagem do número de plântulas emergidas a cada dia, a partir da semeadura até o 28º dias, sendo calculado de acordo com Maguire (1962).

O teste de envelhecimento acelerado foi realizado a 42 °C por 24 horas a 100% de umidade relativa. Esse teste foi conduzido pelo método do gerbox, segundo metodologia proposta por Marcos Filho (2005). Após as análises iniciais, as sementes foram submetidas à rustificação em três períodos (0,7 e 21) a temperaturas de 5 °C e de 1 °C, sob fotoperíodo e termoperíodo controlado de 12 horas. Ao final de cada nível de rustificação, as sementes foram submetidas a quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8 °C), sendo utilizado um período de exposição de três horas cada gradiente.

Antes das sementes serem submetidas à rustificação, elas foram mantidas em fotoperíodo e termoperíodo controlado de 12 horas, com temperaturas de 20 °C e 12 °C sendo um tratamento durante três dias (tratamento 1) e em outro durante seis dias nessas temperaturas (tratamento 2).

Posteriormente, a temperatura foi reduzida para 10 °C e para 5 °C. Após esse período estabelece-se o Ponto Zero, onde as sementes passaram pelo processo de rustificação, conforme descrito acima (ver quadro 2) (FLORIANI et al., 2011).

Quadro 2 Tratamentos utilizados para o processo de rustificação de sementes de *Pinus taeda L.*

TRAT.	PASSO 1	PASSO 2 RUSTIFICAÇÃO	PASSO 3
T.	-	Sementes recém colhidas	-
0	TRATAMENTO 1 20 °C (12h) e 12°C(12H) três dias 15 °C(12h) e 9 °C (12H) sete dias 10 °C (12h) e 5 °C (12H) dez dias	Sem rustificação	Quatro gradientes de temperatura (-2, -4, -6 e -8 °C) por 3 horas cada-
7	TRATAMENTO 1 20 °C (12h) e 12°C(12H) três dias 15 °C(12h) e 9 °C (12H) sete dias 10 °C (12h) e 5 °C (12H) dez dias.	5°C (12h) e 1°C(12H) sete dias	Quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8 °C) por 3 horas cada
21	TRATAMENTO 1 20 °C (12h) e 12°C(12H) seis dias 15 °C(12h) e 9 °C (12H) sete dias 10 °C (12h) e 5 °C (12H) -	5°C (12h) e 1°C(12H) 21 dias	Quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8 °C) por 3 horas cada
0	TRATAMENTO 2 20 °C (12h) e 12°C(12H) seis dias 15 °C(12h) e 9 °C (12H) sete dias 10 °C (12h) e 5 °C (12H)	Sem rustificação	

Continua

7	TRATAMENTO 2 20 °C (12h) e 12°C(12H) seis dias 15 °C(12h) e 9 °C (12H) sete dias 10 °C (12h) e 5 °C (12H) dez dias.	5°C (12h) e 1°C(12H) sete dias	Quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8 °C) por 3 horas cada
21	TRATAMENTO 2 20 °C (12h) e 12°C(12H) seis dias 15 °C(12h) e 9 °C (12H) sete dias 10 °C (12h) e 5 °C (12H) dez dias.	5°C (12h) e 1°C(12H) 21 dias	Quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8 °C) por 3 horas cada

Trat.= Tratamento; T = Testemunha

Fonte: produção do próprio autor.

As sementes foram descongeladas em temperatura ambiente por 60 minutos. A extração e a análise dos teores de açúcares solúveis totais foram realizadas conforme metodologia descrita por Moraga et al. (2006), utilizando-se o método fenolsulfúrico.

As sementes 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, logo após adicionou-se 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, adicionando-se a este 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 pipetou-se 200 µL da fase aquosa obtida e adicionado 1,8 mL de água deionizada (solução 1).

Desta primeira solução, retirou-se 500 µL que foram transferidos para outro tubo de ensaio, onde adicionou-se 500 µL de fenol (5%) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Após isso, agitou-se em vortex e, em seguida, realizou-se a medição da absorbância da solução em espectrofotômetro, utilizando-se um comprimento de onda de 490 nm. Para obtenção dos valores de concentração de açúcares solúveis totais utilizou-se a curva de calibração $y = 0,0096x + 0,0536$ (onde: y = absorbância; x = concentração de açúcares; $R^2=0,991$).

Para avaliar a qualidade das sementes após a rustificação, foi realizado o teste de germinação em 25 sementes por repetição, submetidas à temperatura de 22 °C durante 28 dias.

As sementes não germinadas foram submetidas ao teste de tetrazólio, conforme Ferreira e Borghetti (2004), por meio da imersão a 0,5% da solução durante 2 horas e avaliada sua viabilidade por meio da coloração e localização de danos.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância, análise de regressão linear, e teste de comparação de médias de Tukey ($p<0,05$) para níveis de rustificação.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os testes fisiológicos realizados o clone 1 de *Pinus* mostrou-se superior aos demais (ver tabela 4).

Os testes de germinação, IVG, primeira contagem e os testes de frio e envelhecimento acelerado no clone 1 apresentaram os mais altos valores quando comparados as demais clones. Segundo Tonin et al. (2000), as cultivares que apresentam sementes de maior qualidade fisiológica, geralmente, são também as que se apresentam mais tolerantes às condições de estresse no campo.

Outro ponto relevante observado por Ávila et al. (2007) é que o estresse pode reduzir tanto a germinação quanto a velocidade de germinação. Hellmann (2006) notou que em sementes de pau-brasil após período de exposição ao frio resultou em redução da capacidade germinativa culminando com a perda total da germinação. Nos tratamentos 1 e 2, foi observado 100% de sementes mortas após a rustificação, para todos os clones (ver figura 7).

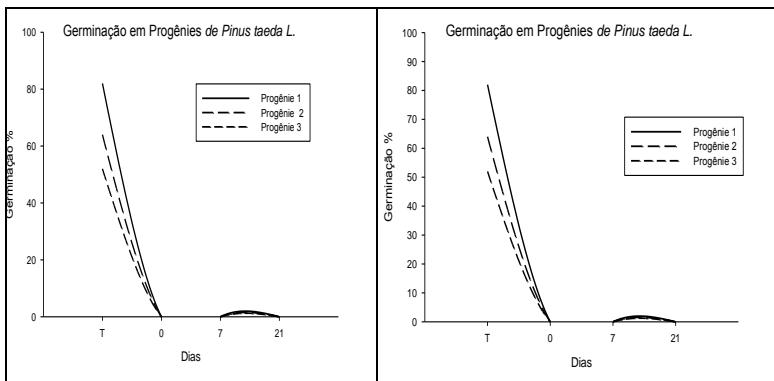
Tabela 4 Caracterização Física e fisiológica de clones de *Pinus taeda*

Tratamentos	Clone 1	Clone 2	Clone 3	CV %
Germinação %	82 a	64 b	52 b	8,91
IVG	11,71 a	8,30 b	7,40 b	10,94
Primeira Contagem %	21 a	12 b	10 b	9,04
Umidade %	7,79 a	8,42 a	8,12 a	8,21
Teste de Frio %	52 a	25 b	27 b	8,38
Envelhecimento Acelerado %	66 a	39 b	30 b	10,03

Letras desiguais na linha diferem estatisticamente pelo Teste Tukey a 5% de significância ($P<0,05$).

Fonte: produção do próprio autor.

Figura 7 Germinação em clones de *Pinus* após o processo de rustificação (Tratamentos 1 e 2).



Fonte: produção do próprio autor.

Foi realizado o teste de tetrazólio, conforme Ferreira e Borghetti (2004) imersão a 0,5% durante 2 horas, em todas as sementes constatou-se que realmente tinham perdido a viabilidade.

As possíveis causas podem estar relacionadas a fatores como envelhecimento natural (FERREIRA et al., 2004); variações na temperatura e umidade, (DEGAN et al., 2001); sementes ricas em óleo e a presença de alguns fungos em sementes, que causam patogenicidade (SANTOS, 2001).

A temperatura exerce um papel crucial na manutenção da integridade da semente, porque afeta diretamente a velocidade dos processos bioquímicos (BEWLEY et al., 2013). As temperaturas baixas podem contribuir em menor estabelecimento de plântulas e em redução da biomassa, sendo que a extensão do dano depende da espécie, do conteúdo inicial de água da semente, da temperatura e duração da exposição a este fator (OLIVEIRA et al., 2005).

O mecanismo fisiológico envolvido na tolerância ao frio é a conservação da atividade e funcionamento da membrana celular a baixas temperaturas. O prejuízo dessa atividade em função do frio tem uma implicação em vários processos

fisiológicos vegetais, dentre eles o funcionamento celular, as relações hídricas e o crescimento (CRUZ e MILACHI, 2000).

Durante o processo de rustificação, as sementes foram molhadas regularmente, e a disponibilidade de água em baixas temperaturas pode ter prejudicado a germinação das sementes (ver figura 7). Bewley et al. (2013) citam que os danos na embebição podem ser agravados pelas baixas temperaturas na absorção de água inicial. Nesse experimento as sementes ficaram expostas à água desde a temperatura inicial de 20/12 °C até a temperatura de -8 °C, no final da rustificação.

Fonseca et al. (2012), trabalhando com *Pinus elliottii Engelm*, observaram perda da qualidade fisiológica das sementes em tratamentos com exposição ao frio. As espécies do gênero *Pinus* possuem aproximadamente metade (48%) de suas reservas constituída por lipídeos (KRONKA et al., 2005). Esse elevado teor de óleos na composição química resulta em uma menor estabilidade das moléculas, as quais se degradam com maior velocidade, culminando em uma perda de viabilidade (BEWLEY; BLACK, 1994).

Em sementes de *Pinus thunbergii*, submetidas ao estresse térmico, foram observados altos conteúdos de lipídios, os quais foram associados à queda na viabilidade das sementes (KIM et al., 2010).

Os dados obtidos na análise da concentração de açúcares solúveis totais demonstraram aumento ao longo do período de rustificação, independente do clone e do período de rustificação (3 e 6 dias). Foi verificado maior acúmulo de açúcares após 21 dias de rustificação (ver figura 8).

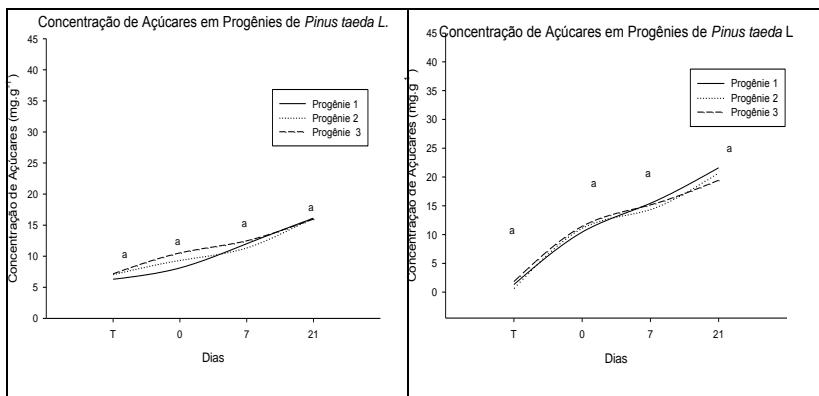
Algumas plantas desenvolveram mecanismos que resistem e/ou toleram o congelamento. A mesma planta/tecido tem resistência diferenciada de acordo com o seu estado de desenvolvimento, grau de aclimatação (SNYDER et al., 2005).

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 conduzem à degradação de componentes celulares da semente, impedindo a fusão de membranas e o rompimento de

compartimentos celulares (HOEKSTRA et al., 2001). O estado vítreo contribui provavelmente para a longevidade de sementes secas (BUITINK et al., 2000).

Figura 8 Concentração de Açúcares solúveis em clones de *Pinus* após a rustificação (tratamentos 1 e 2)



Fonte: produção do próprio autor.

O acúmulo de açúcares observados nos clones (ver figuras 8 e 9) também foi encontrado em mudas de *Eucalyptus* por Floriani et al. (2011) os resultados obtidos naquele trabalho mostram que a relação entre a tolerância ao frio e a concentração de carboidratos solúveis totais pode possibilitar a identificação de genótipos resistentes. Borges et al. (2006) afirma que a tolerância à dessecação e ao congelamento em sementes de *Caesalpinia echinata* pode estar relacionada às altas

A diminuição da temperatura durante o armazenamento estabilizaria a atividade enzimática, o que favoreceria o metabolismo de carboidratos envolvidos na manutenção da integridade das membranas celulares, como a sacarose, os oligossacarídeos da série da rafinose e os ciclítios (PETERBAUER e RICHTER, 2001).

Os resultados obtidos (ver figuras 8 e 9) discordam de Bernal-Lugo e Leopold (1998) que relacionaram a perda da

germinabilidade de sementes de milho a uma drástica diminuição nos teores de carboidratos.

Foi observado no tratamento 2 maior concentração de açúcares em relação ao tratamento 1 (ver figura 8), sendo possível constatar que um maior tempo de aclimatação (6 dias), favoreça a síntese desse polissacarídeo.

Apesar dos teores de açúcares terem sido associados à tolerância ao estresse, como frio e dessecção, para outras espécies (ALMEIDA et al., 1993; TRAVERT et al., 1997; TINUS et al., 2000; MORAGA et al., 2006 ; FLORIANI et al., 2011), esse comportamento não é uma regra. Black et al. (1999) não encontraram correlação entre a tolerância à dessecção e a presença de oligossacarídeos da série da rafinose em embriões imaturos de trigo, indicando que outros mecanismos seriam os responsáveis pela tolerância a dessecção nessas sementes. Esse mesmo fato pode ocorrer quando se trata do frio, outra condição de estresse para a planta.

Além disso, em sementes de *Caesalpinia echinata*, considerada ortodoxa e tolerante ao armazenamento em baixa temperatura, foram encontrados teores mínimos de oligossacarídeos da série da rafinose (LEDUC, 2007), indicando que para essa espécie esse açúcar não é o principal fator na aquisição da tolerância a dessecção e talvez ao frio.

Os resultados obtidos nesse trabalho concordam Peterbauer e Richter (2001) que citam que alguns estudos mostraram que nem o acúmulo dos açúcares e nem a presença das proteínas LEA são, sozinhos, suficientes para conferir tolerância ao estresse ou para manter a viabilidade de sementes.

Embora a deterioração das sementes possa estar associada ao armazenamento, o processo inicia-se logo após as sementes atingirem a maturidade fisiológica. Apesar de ser um processo irreversível e de não poder ser evitado, a deterioração pode ser retardada (MARCOS FILHO, 2005). É preciso identificar maneiras de se fazer isso em sementes de *Pinus*.

Villela e Peres (2004) citam que a longevidade de sementes é bastante influenciada, tanto pelo seu teor de água, quanto pela temperatura do ambiente. Mesmo com os elevados teores de açúcares obtidos pelos clones (ver figura 8) as sementes perderam a qualidade (ver figura 7), provavelmente

pela junção dos fatores adversos baixa temperatura e alto teor de água acumulado durante o processo de rustificação.

Outro fator que pode ter influenciado na redução da qualidade das sementes foi o fato de que, após a rustificação as sementes foram imersas em nitrogênio para que pudessem ser armazenadas rustificadas. Esse contato somado ao elevado teor de água pode ter contribuído para a deterioração das sementes.

Segundo Towill (2002), o ponto mais crítico na criopreservação (conservação em nitrogênio líquido) de sementes ortodoxas é definir o teor de água ideal antes da imersão em nitrogênio líquido. Caso os teores sejam muito baixos, podem levar à desidratação excessiva e a morte das células. Elevados, levariam à formação de cristais de gelo no interior das células, resultando na ruptura do sistema de membranas celulares, e culminando no colapso e morte.

Observa-se que a rustificação com presença de água em *Pinus* não é recomendada. As sementes que foram aclimatadas e rustificadas morreram em contato com nitrogênio líquido. Somente não morreram as testemunhas (ver figura 7) as quais não tiveram contato com o nitrogênio. Para sementes com elevado teor de lipídios, como as de *Pinus*, juntamente com a elevada umidade, pode ocorrer morte quando é criopreservada. Mesmo a síntese de açúcares crescente (ver figura 8) durante a rustificação, não foi suficiente para manter a germinação.

É preciso definir o teor de água máximo admitido pela espécie para ser criopreservada. Pois como relata Santos (2001), a elevada umidade leva à formação de cristais de gelo no interior das células e a morte celular.

5.6 CONCLUSÃO

A concentração de açúcares não é um indicador de tolerância ao frio em *Pinus taeda*.

5.7 REFERÊNCIAS

ABRAF. Anuário estatístico da ABRAF 2012 ano base 2011 / **ABRAF.** – Brasília: 2012.

ÁVILA, M.R.; BRACCINI, A. de L.; SCAPUM, C.R. Influência do estresse hídrico simulado com manitol na germinação de sementes e crescimento de plântulas de canola. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 29, nº 1, p.98-106, 2007.

BERNAL-LUGO, I.; LEOPOLD, A.C. The dynamics of seed mortality. **Journal of Experimental Botany**, Eynsham, v.49, n.326, p.1455-1461, 1998.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.** 2 nd ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BEWLEY J.D., BRADFORD, K., HILHORST, H., NONOGAKI, H **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy.** 3rd ed. 2013, Springer, XIII, 392 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.

BUITINK, J., HEMMINGA, M.A. & HOEKSTRA, F.A. Is there a role for oligosaccharides in seed longevity? An assessment of the intracellular glass stability. **Plant Physiology** 122: p.1217-1224. 2000.

DEGAN, P.; AGUIAR, I. B.; SABER, R.; PERECIN, D.; PINTO, L.R. Influência de método de secagem de sementes de Ipê branco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v. 5, n. 3, p. 492-496, 2001.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 323 p. 2004.

FLORIANI, M. M.P; STEFFENS, C.A. e CHAVES, D.M. Rustificação de plantas de *Eucalyptus dunnii* Maiden e a relação entre as concentrações de açúcares solúveis totais e de prolina foliar e a tolerância ao frio. **Revista. Árvore** [online]. 2011, vol.35, n.1, pp. 21-29. ISSN 0100-6762.

FONSECA, A.G. Qualidade fisiológica de sementes de *Pinus elliotti* Engelm. submetidas a diferentes métodos de armazenamento. **CERNE**, Lavras , v. 18, n. 3, Sept. 2012.

GOLLE, D.P. et al .Substratos alternativos e tratamentos pré-germinativos na germinação in vitro de sementes de *Pinus taeda* L. **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 34, n.1, Feb. 2010 .

KIM, D.H.; HAN, S.H.; LEE, J.C. Germination and biochemical changes in accelerated aged and osmoprimead *Pinus thunbergii* seeds. **Journal of the Korean Forestry Society**, Chunchon, v. 99, n. 2, p. 244-250, 2010.

HELLMANN, Moacir E. et al .Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água inicial. **Rev. bras. Bot.**, São Paulo , v. 29, n. 1, Mar. 2006 .

HOEKSTRA, F.A., GOLOVINA, E.A. & BUITINK, J.Mechanisms of plant desiccation tolerance.Trends in **Plant Science**. 6: p.431-438. 2001.

KRONKA, J. N.; BERTOLANI, F.; PONCE, R. H. **A cultura do Pinus no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2005.

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

LEDUC, S.N.M. **Indução de tolerância à dessecação e variação de carboidratos solúveis em sementes de Caesalpinia echinata Lam. (pau brasil) durante a maturação.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo. 2007.

MAGUIRE, J.D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, p. 176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. **Desenvolvimento (Maturação) de sementes.** In: MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: FEALQ, p.91-142, 2005.

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.

OLIVEIRA, L.M., CARVALHO, M.L.M., SILVA, T.T.A. & BORGES, D.I. Temperatura e regime de luz na germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley e *T. serratifolia* Vahl Nich. – Bignoniaceae). **Ciência e Agrotecnologia**, 29(3): 642-648; 2005.

PEREIRA, A.B.; MARQUES JUNIOR, O.G.; RAMALHO, M.A.P.; ALTHOFF, P. Eficiência da seleção precoce em famílias de meios-irmãos de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., avaliadas na região noroeste do Estado de Minas Gerais. **Cerne**, v.3, p.67-81, 1997.

PETERBAUER, T. e RICHTER, A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. **Seed Science Research** , v. 11, p. 185-197, 2001.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 20, p. 60-65, 2001

SHIMIZU, J.Y. *Pinus* na silvicultura brasileira. **Revista Madeira**, n. 38, ano 14, ago., Disponível em: <<http://www.remade.com.br>> Acesso em: 03 dez. 2013. 2005.

Snyder, R.L.; De Melo-Abreu, J.P.; Matulich, S. **Frost Protection: Fundamentals, Practice and Economics**. Vol. II. United Nations, Food and Agriculture Organization, Rome, 64 pp. 2005.

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** 79: 291–297, 1997.

TOLFO, A.L.T. **Estudos da viabilidade de aplicação da seleção precoce em testes clonais de *Eucalyptus* spp. equalidade da madeira para polpa celulósica**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 50p, 2003.

TONIN, G.A.; CARVALHO, N.M.; KRONKA, S.N.; FERRAUDO, A.S. Influência do cultivar e do vigor no desempenho germinativo de sementes de milho em condições de estresse hídrico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.22, n.1, p.276-279, 2000.

TOWILL, L.E. **Cryopreservation of plant germplasm**. In:Towill, L.E.; Bajaj,Y.P.S. eds. Cryopreservation of plant germplasm II. Biotechnology in Agriculture and Forestry, volume 50, Berlim, Springer,.p. 04-21, 2002.

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**, vol. 114, no. 4, p. 1433-1442, 1997.

VILLELA, F.A. e PERES, W.B. Coleta, beneficiamento e armazenamento. In **Germinação: do básico ao aplicado** (A.G. Ferreira & F.Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre, p.265-281. 2004.

XIANG, B.; LI, B.; ISIK, F. Time trend of genetic parameters in growth traits of *Pinus taeda* L. **Silvae Genetica**, v.52, p.114-121, 2002.

ZENID; M.A.R. NAHUF; M.J.A.C. MIRANDA; L.F.T. ROMAGNANO; O.P. FERREIRA; S. BRAZOLIN. **Madeira: uso sustentável na construção civil**. Edição 2. 103 p. 2009.

6 CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS E TOLERÂNCIA AO FRIO EM MUDAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Eucalyptus*

6.1 RESUMO

Objetivou-se avaliar a concentração de açúcares solúveis totais em diferentes espécies de *Eucalyptus* e sua relação com a resistência das mudas ao frio. Foram utilizadas mudas puras de três clones das espécies: *Eucalyptus dunii Maiden* (tolerante), *E. benthamii Maiden et Cambage* (tolerante), *E. grandis Hill ex Maiden* (intolerante) e *E. saligna Smith* (intermediária). Em seguida, as mudas foram submetidas à rustificação em três períodos a temperaturas de 5 °C e de 1 °C, sob fotoperíodo e termoperíodo controlado de 12 horas. Ao final de cada nível de rustificação, as mudas foram submetidas a quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8 °C), sendo utilizado um período de exposição de três horas cada gradiente. Antes das mudas serem submetidas à rustificação, elas foram mantidas em fotoperíodo e termoperíodo controlado de 12 horas, com temperaturas de 20 °C e de 12 °C sendo um tratamento durante três dias (tratamento 1) e em outro durante seis dias nessas temperaturas (tratamento 2). Em seguida, as temperaturas foram alteradas para temperatura de 15 °C e de 9 °C, mantendo-se o fotoperíodo e o termoperíodo controlado de 12 horas. Posteriormente, a temperatura foi reduzida para 10 °C e para 5°C. Determinou-se a concentração de açúcares solúveis e a sobrevivência após a rustificação. O experimento foi realizado conforme o delineamento blocos ao acaso, com quatro repetições para cada tratamento de rustificação/espécie/clone. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e teste de comparação de médias (Tukey a $p<0,05$). Os resultados obtidos indicaram que a concentração de açúcares não deve estar influenciando isoladamente para a tolerância ao frio.

Palavras-chave: Mudas, açúcares, clones, seleção precoce.

6.2 ABSTRACT

Aimed to evaluate the concentration of total soluble sugars in different Eucalyptus species and its relationship with seedling resistance to cold. Pure seedlings from three clones of the species were used: *Eucalyptus dunii* Maiden (tolerant), *E. benthamii* Maiden et Cambage (tolerant), *E. grandis* Hill ex Maiden (intolerant) and *E. saligna* Smith (middle). Then the seedlings were subjected to hardening into three periods at temperatures of 5 °C and 1 °C under controlled photoperiod and thermoperiod 12 hours. At the end of each level hardening, seedlings were subjected to four temperature gradients below freezing (-2, -4, -6 and -8 °C), an exposure period of three hours each gradient being used. Before the seedlings are subjected to hardening, they were maintained in photoperiod and thermoperiod controlled 12 hours, with temperatures of 20 °C and 12 °C and a treatment for three days (treatment 1) and the other for six days at these temperatures (treatment 2). Then the temperature was changed to 15 °C and 9 °C, maintaining the controlled thermoperiod photoperiod and 12 hours. Subsequently, the temperature was reduced to 10 °C and 5 °C. Determined the concentration of soluble sugars and survival after hardening. The experiment was conducted as a randomized block design with four replications for each treatment rustification / species / clone. Data were subjected to analysis of variance and mean comparison test (Tukey $p < 0.05$). The results indicated that the concentration of sugars should not be influencing separately for cold tolerance.

Keywords: *Eucalyptus*, seedlings, carbohydrate, early selection.

6.3 INTRODUÇÃO

A exploração do eucalipto no Brasil ocorre devido à sua qualidade mecânica e bom desenvolvimento, além de adequação aos mais diferentes usos e ampla aceitação no mercado (ALFENAS et al., 2004). Além disso, o setor florestal tem uma significativa contribuição na economia do País.

Representa cerca de 5% do PIB e 8% das exportações nacionais. Gera 1,6 milhão de empregos diretos, 5,6 milhões de empregos indiretos, uma receita anual de R\$ 20 bilhões e, ainda, paga anualmente R\$ 3 bilhões de impostos (BRACELPA, 2013).

No sul do Brasil, o *E. dunnii* e o *E. benthamii* têm se destacado pelo rápido crescimento, uniformidade dos talhões, forma das árvores e tolerância à neve como observado pela Embrapa (2013).

Apesar de essas espécies serem consideradas tolerantes ao frio, pode haver variação entre genótipos da mesma espécie, o que torna fundamental a seleção de genótipos antes do plantio (VIANA, 2003).

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 gunni* x *Eucalyptus globulus*, apontam que células de genótipo resistente contêm mais hidratos de carbono, sem aclimatação ao frio; a incubação de células com determinados açúcares resultou num aumento na tolerância ao congelamento, e, este fato só ocorreu quando a acumulação de açúcar dentro das células foi observado.

Almeida et al. (1994) avaliaram a resistência ao frio e a capacidade de aclimatação de diferentes genótipos de *Eucalyptus* em mudas em Portugal. Os resultados indicaram aumento na concentração de açúcares solúveis e que a aclimatação aumentou a capacidade do 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) descobriram 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.

Segundo Larcher (2000), para as plantas que devem atravessar com sucesso um período de congelamento severo, é essencial que seu protoplasma seja tolerante ao congelamento. Essa condição de rustificação ou tolerância ao congelamento é alcançada pela elevada incorporação de fosfolipídeos estáveis nas biomembranas, mesmo sob baixas temperaturas, e pela acumulação de carboidratos solúveis (açúcares e oligossacarídeos), polióis, substâncias de baixo peso molecular contendo nitrogênio (aminoácidos e poliaminas) e também, de proteínas hidrossolúveis. De acordo com Palonen e Junntila (1999), a intensa tolerância ao frio é acompanhada por acumulação de açúcares solúveis e aminoácidos.

Contudo, 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 rustificação (LARCHER, 2000).

A identificação de características bioquímicas, que representam a tolerância ao frio, como as concentrações de açúcares, pode servir como ferramentas para a seleção precoce de espécies com potencial de cultivo em regiões frias.

Assim, o objetivo desse trabalho foi relacionar os teores de açúcares solúveis em mudas de diferentes espécies e genótipos de *Eucalyptus*, com a tolerância ao frio.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas mudas de *Eucalyptus dunnii* Maiden (clones 1 e 2) e *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage (clones 1 e 2) com sete meses de idade, procedentes do viveiro florestal da Empresa Klabin, sendo utilizadas três plantas por repetição.

As mudas foram submetidas à rustificação em três períodos a temperaturas de 5 °C e de 1 °C, sob fotoperíodo e termoperíodo controlado de 12 horas.

Ao final de cada nível de rustificação, as mudas foram submetidas a quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8 °C), sendo utilizado um período de exposição de três horas cada gradiente.

Antes das mudas serem submetidas à rustificação, elas foram mantidas em fotoperíodo e termoperíodo controlado de 12 horas, com temperaturas de 20 °C e de 12 °C sendo um tratamento durante três dias (tratamento 1) e em outro durante seis dias nessas temperaturas (tratamento 2).

Em seguida, as temperaturas foram alteradas para temperatura de 15 °C e de 9°C, mantendo-se o fotoperíodo e o termoperíodo controlado de 12 horas.

Posteriormente, a temperatura foi reduzida para 10 °C e 5 °C. Após esse período estabelece-se o Ponto Zero, onde as mudas passaram pelo processo de rustificação, conforme descrito (ver quadro 3). (FLORIANI et al., 2011)

Após a rustificação foi realizada a análise bioquímica e a sobrevivência das mudas

Quadro 3 Tratamentos utilizados para o processo de rustificação de mudas de *Eucalyptus spp.*

TRAT.	PASSO 1	PASSO 2 RUSTIFICAÇÃO	PASSO 3
T	-	Sementes recém colhidas	-
0	TRATAMENTO 1 20 °C (12h) e 12°C(12H) três dias 15 °C(12h) e 9 °C (12H) sete dias 10 °C (12h) e 5 °C (12H) dez dias	Sem rustificação	Quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8°C) por 3 horas cada-
7	TRATAMENTO 1 20 °C (12h) e 12°C(12H) três dias 15 °C(12h) e 9 °C (12H) sete dias 10 °C (12h) e 5 °C (12H) dez dias.	5°C (12h) e 1°C(12H) sete dias	Quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8°C) por 3 horas cada
21	TRATAMENTO 1 20 °C (12h) e 12°C(12H) três dias 15 °C(12h) e 9 °C (12H) sete dias 10 °C (12h) e 5 °C (12H) dez dias.	5°C (12h) e 1°C(12H) 21 dias	Quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8°C) por 3 horas cada
0	TRATAMENTO 2 20 °C (12h) e 12°C(12H) seis dias 15 °C(12h) e 9 °C (12H) sete dias 10 °C (12h) e 5 °C (12H) dez dias	Sem rustificação	Quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8°C) por 3 horas cada

Continua

7	TRATAMENTO 2 20 °C (12h) e 12°C(12H) seis dias 15 °C(12h) e 9 °C (12H) sete dias 10 °C (12h) e 5 °C (12H) dez dias	5°C (12h) e 1°C(12H) sete dias	Quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8°C) por 3 horas cada
21	TRATAMENTO 2 20 °C (12h) e 12°C(12H) seis dias 15 °C(12h) e 9 °C (12H) sete dias 10 °C (12h) e 5 °C (12H) dez dias.	5°C (12h) e 1°C(12H) 21 dias	Quatro gradientes de temperatura abaixo de zero (-2, -4, -6 e -8°C) por 3 horas cada

Trat.= Tratamento; T = Testemunha

Fonte: produção do próprio autor.

. A extração e a análise dos teores de açúcares solúveis totais foram realizadas conforme metodologia descrita por Moraga et al. (2006), utilizando-se o 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, logo após adicionou-se 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, adicionando-se a este 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 pipetou-se 200 µL da fase aquosa obtida e adicionado 1,8 mL de água deionizada (solução 1).

Desta primeira solução, retirou-se 500 µL que foram transferidos para outro tubo de ensaio, onde adicionou-se 500 µL de fenol (5%) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após isso,

agitou-se em vortex e, em seguida, realizou-se a medição da absorbância da solução em espectrofotômetro, utilizando-se um comprimento de onda de 490 nm. Para obtenção dos valores de concentração de açúcares solúveis totais utilizou-se a curva de calibração $y = 0,0096x + 0,0536$ (onde: y = absorbância; x = concentração de açúcares; $R^2=0,991$).

Além da análise bioquímica, as mudas foram plantadas em espaçamento 1 x 1 m onde se observou a sobrevivência das mudas após 90 dias do processo de rustificação.

Segundo o sistema de Köppen (1948) o clima da região de Lages é classificado como Cfb, temperado úmido, com verões amenos, temperatura média de 14,3º C, a frequência média de geadas de 10 a 25 dias/ano, umidade relativa do ar em média de 79,3% e índice pluviométrico anual de 120,00 mm (Lages 2009).

O experimento foi realizado em blocos ao caso. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e teste de comparação de médias de Tukey ($p<0,05$) para níveis de rustificação e espécies de eucaliptos

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram que houve mortalidade de mudas após a rustificação em todos os clones testados. No entanto, de forma geral, mudas de *E. dunnii* (clone 1) apresentaram os maiores índices de sobrevivência (ver figura 9).

Para o tratamento 1 de rustificação, foram verificadas diferenças entre os clones de *E.dunnii* testados. No *E. dunnii* 1 observa-se mortalidade somente quando se compara o valor de testemunha com a rustificação. Durante os dias de rustificação (0,7 e 21) as mudas se mantiveram com a mesma qualidade em campo, não sendo observada redução na sobrevivência (ver figura 10).

Segundo Dalmago (2010), após o processo inicial de aclimatação, as espécies se tornam mais tolerantes ao frio. Isso pode explicar o porquê da queda na sobrevivência ocorrer geralmente no início da rustificação das mudas. Isso concorda com o que é descrito por Larcher (2000), onde plantas resistentes ou tolerantes ao frio podem ter sua tolerância aumentada através da indução ambiental.

Segundo Annicchiarico et al. (2001), a sensibilidade ao frio das plantas por meio da sua exposição a baixas temperaturas pode auxiliar na detecção de quais plantas são mais resistentes ao estresse em campo.

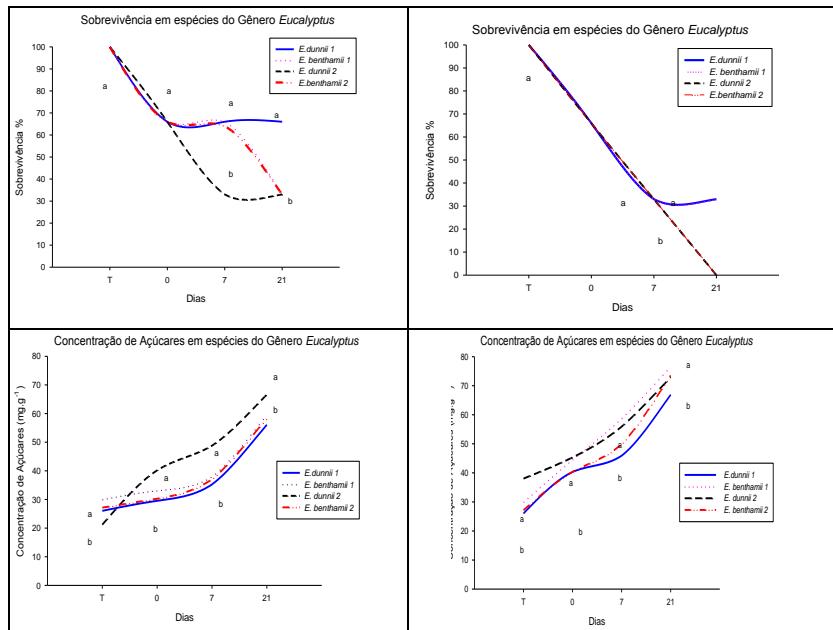
Pode-se observar que no tratamento 1 não foi observada a morte de todas as mudas após o final da rustificação. Mesmo tendo sido acentuada em *E. benthamii* 1 e 2, em *E. dunnii* 2, aproximadamente 30% das mudas se mantiveram vivas em campo. No tratamento 2, foi verificada queda acentuada na sobrevivência das mudas, sendo observado 100% de mudas mortas aos 21 dias de rustificação, para *E. benthamii* 2, em *E. dunnii* 2 (ver figura 9).

O tempo maior de aclimatação utilizado no tratamento 2 causou a diminuição do vigor das mudas e a letalidade após 21 dias de rustificação. O estresse em níveis moderados pode permitir aclimatação, adaptação e tolerância, mas em níveis mais severos pode levar a morte celular (KRANNER et al., 2010).

A intensidade de estresses ambientais, como a seca e o frio podem gerar danos (Renaut et al. 2005), sendo preciso dosar a intensidade e o tempo de exposição de frio para cada espécie. Os dados obtidos na análise da concentração de açúcares solúveis totais demonstraram aumento ao longo do período de rustificação, independente da espécie, do clone e do período de rustificação (3 e 6 dias) (ver figura 9). Foi verificado maior acúmulo de açúcares em *E. dunnii* no clone 2.

O acúmulo de açúcares observado nas espécies/clones (ver figuras 12 e 13) também foi encontrado em mudas de *Eucalyptus* por Floriani et al. (2011). Esses autores ressaltam que a relação entre a tolerância ao frio e a concentração de carboidratos solúveis totais pode possibilitar a identificação de genótipos resistentes.

Figura 9 Concentração de açúcares e Sobrevida em mudas de clones de *Eucalyptus dunnii* e *E. benthamii* após a rustificação (tratamento 1 e 2).



Fonte: produção do próprio autor.

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 da semente, impedindo a fusão de membranas e o rompimento dos compartimentos celulares (HOEKSTRA et al., 2002).

Stushnoff et al. (1998) notaram um acúmulo de rafinose em plantas de *Viola wittrockiana* durante aclimatação ao frio, esse mesmo 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.

Talvez os açúcares não sejam os únicos componentes que auxiliem as plantas em condições de estresse térmico. Muitas proteínas LEA (*Late Embriogenesis Abundant*) são também induzidas pelo frio; essas proteínas são capazes de estabilizar estruturas intracelulares sob condições de estresse (HINCHA et al., 2002). É possível observar que no tratamento 2 (ver figura 9) a espécie *E. benthammii* 1 teve a maior produção de açúcares chegando a cerca de 80mg/g após 21 dias de rustificação.

Outro ponto relevante foi o desempenho de *E. dunnii* 1 que não teve letalidade acentuada de suas mudas quando exposto ao tratamento 1 de rustificação (ver figura 9). Mesmo com os elevados teores açúcares obtidos pelas espécies/clones as mudas morreram. Isso significa que a rustificação e a indução ambiental de síntese de componentes crioprotetores não é suficiente para a manutenção das mudas com qualidade em campo.

São necessárias mais pesquisas para verificar quais os níveis de rustificação máximos toleráveis por espécie. Não pode ser descartada a participação de outros compostos como proteínas e substâncias antioxidantes e também a interação destes compostos com os carboidratos no comportamento das mudas das espécies estudadas e no seu desempenho no campo.

Segundo Massaro et al. (2010), experimentos visando a seleção precoce são necessários para redução de tempo e custos além de possibilitar maior produtividade de florestas.

Conforme o experimento realizado a rustificação não é recomendada. As mudas que passaram somente por aclimatação (ver figura 9) tiveram um índice maior ou igual de sobrevivência que as espécies rustificadas. Observa-se que as temperaturas negativas foram letais para as mudas (ver quadro 3). 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.

6.6 CONCLUSÃO

A concentração de carboidratos solúveis não é a única substância atuante na tolerância ao frio.

6.7 REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. de. **Clonagem e doenças do eucalipto.** Viçosa: Editora UFV, 2004. 442p.
- ALMEIDA M.H, et al. Cold acclimation in Eucalyptus hybrids. **Tree Physiol** 14: 921-932, 1994.
- ANNICCHIARICO, P. et al. Variation in cold tolerance and spring growth among Italian white clover populations. **Euphytica**, v.122, p.407-416, 2001.
- BRACELPA. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL. Relatório Estatístico 2012, São Paulo, **Bracelpa**, 2013, 44p.
- DALMAGO, Genei Antonio et al . Aclimatação ao frio e dano por geada em canola. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília , v. 45, n. 9, Sept. 2010.
- FLORIANI, M.M.P; STEFFENS, C.A. e CHAVES, D.M. Rustificação de plantas de *Eucalyptus dunnii* Maiden e a relação entre as concentrações de açúcares solúveis totais e de prolina foliar e a tolerância ao frio. **Revista Árvore** [online]. 2011, vol.35, n.1, pp. 21-29.ISSN 0100-6762.
- 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 12: 103-110. 2002.
- HOEKSTRA, F.A., GOLOVINA, E.A. & BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. Trends in **Plant Science** 6: p. 431-438. 2001.
- KÖPPEN, W. 1948. **Climatología: con un estudio de los climas de la tierra.** Fondo de Cultura Econômica. México. 479p.

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.

LAGES, 2009. Disponível em www.lages.sc.gov.br/cidade/perfil.php. Acessado em 01 de Dezembro de 2013.

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

MASSARO, R.A.M.; BONINE, C.A.V.; SCARPITANI, E.A.; DE PAULA, R.C. Viabilidade de aplicação da seleção precoce em testes clonais de *Eucalyptus* spp. **Ciência Florestal**, v.20, p.597-609, 2010.

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.

PALONEN, P.; JUNTTILA, 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.

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

SNYDER, R.L.; De MELO-ABREU, J.P.; MATULICHH, S. **Frost Protection: Fundamentals, Practice and Economics**. Vol. II. United Nations, Food and Agriculture Organization, Rome, 64 p. 2005.

STUSHNOFF, C., SEUFERHELD, M.J. e CREEGAN, T. 1998. Oligosaccharides as endogenous cryoprotectants in woody plants. In: P.H. Li & T.H.H. Chen (eds.). **Plant Cold Hardiness: Molecular Biology, Biochemistry and Physiology**. Plenum Press, New York, p. 302-309. 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** **79**: 291-297, 1997.

TINUS, R.W.; BURR, K.E.; ATZMON, N. and RIOV, J. Relationship between carbohydrate concentration and root growth potential in coniferous seedlings from three climates during cold hardening and dehardening. **Tree Physiology**, vol. 20, no. 16, p. 1097-1104. 2000.

TONIN, G.A.; CARVALHO, N.M.; KRONKA, S.N.; FERRAUDO, A.S. Influência do cultivar e do vigor no desempenho germinativo de mudas de milho em condições de estresse hídrico. **Revista Brasileira de Mudas**, Brasília, v.22, n.1, p.276-279, 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**, vol. 114, no. 4, p. 1433-1442, 1997.

VIANA, A. P. et al. Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas determinada por marcadores RAPD. **Rev. Bras. Frutic.** 2003, v. 25, n. 3, p. 489-493.