



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

ELAYNE KATIA DOS SANTOS GALVÃO

**TOLERÂNCIA, TEMPERATURA LETAL E MEMÓRIA DE ACLIMATAÇÃO DE
Eucalyptus spp. SUBMETIDOS À GEADA.**

JERÔNIMO MONTEIRO – ES
2024

ELAYNE KATIA DOS SANTOS GALVÃO

**TOLERÂNCIA, TEMPERATURA LETAL E MEMÓRIA DE ACLIMATAÇÃO DE
CLONE DE *Eucalyptus* SUBMETIDOS À GEADA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do título de doutora em Ciências Florestais na Área de Concentração Ciências Florestais. Orientador: José Eduardo Macedo Pezzopane. Coorientadores: João Vitor Toledo e Talita Miranda Teixeira Xavier.

JERÔNIMO MONTEIRO – ES

2024

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

G182t Galvão, Elayne Katia dos Santos, 1992-
Tolerância, temperatura letal e memória de aclimação de clone de
Eucalyptus submetidos á geada. / Elayne Katia dos Santos Galvão.
- 2024. 81p. : il.

Orientador: José Eduardo Macedo Pezzopane.

Coorientadores: João Vitor Toledo, Talita Miranda Teixeira
Xavier.

Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e
Engenharias.

1. temperatura baixa. 2. frio. 3. eucalipto. 4. estresse
térmico. 5. sobrevivência. 6. nível de dano. I. Pezzopane, José
Eduardo Macedo. II. Toledo, João Vitor. III. Xavier, Talita
Miranda Teixeira. IV. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

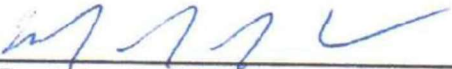
CDU: 630*38

**TOLERÂNCIA, TEMPERATURA LETAL E MEMÓRIA DE ACLIMATAÇÃO DE
Eucalyptus SUBMETIDOS À GEADA.**

ELAYNE KATIA DOS SANTOS GALVÃO

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de doutora em Ciências Florestais na Área de Concentração Ciências Florestais.

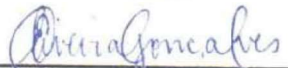
Aprovada em 27 de maio de 2024



Prof. Dr. José Eduardo Macedo
Pezzopane (Orientador)
Universidade Federal do Espírito Santo



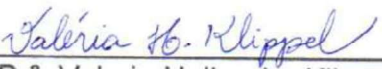
Prof. Dr. Manoel Teixeira de Castro
Neto
(Membro externo)
Universidade Federal do Recôncavo da
Bahia



Profª. Drª. Elzimar de Oliveira
Gonçalves
(Membro externo)
Universidade Federal do Espírito Santo



Profª. Drª. Daiani Bernardo Pirovani
(Membro externo)
Universidade Federal do Espírito Santo



Drª. Valeria Hollunder Klippel
(Membro externo)

*À Mainha, Glayde Suely, pelo amor
e apoio incondicional a todo tempo.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois a minha fé é a minha força e o meu sustento. “...Era a mão de Deus e vai ser sempre assim...”

À minha mãe por fazer dos meus sonhos os seus sonhos, por estar ao meu lado orientando e educando a todo tempo. A ela o meu incondicional amor e a minha infinita gratidão.

Aos meus pais Antônio e Adenilson, pelo apoio e incentivo.

Aos ausentes, a minha imensa e eterna saudade e gratidão.

Aos meus irmãos, irmãs e sobrinhos, por serem o meu combustível e torcida constante.

A Renata e Luís Henrique, Dona Arlene, Ana Luiza e Enrico vocês se tornaram minha família, não tenho palavras para agradecer por tudo!

As minhas avós Nereida e Nieta, pelas constantes orações.

Ao meu orientador José Eduardo Macedo Pezzopane por ter contribuído na minha formação intelectual, profissional e pessoal.

A Wiliana, ou melhor “Jessica”, obrigada pelo suporte com as avaliações da tese, te coorientar foi fonte de crescimento e desenvolvimento.

À João Vitor Toledo e Talita Miranda Teixeira Xavier, pela coorientação, amizade e parceria.

Às amigas que ganhei na minha trajetória acadêmica, de modo especial Elbya, Fran, Alice e Isabela, espero em Deus que a gente realmente fique milionárias e vá rir de tudo isso em Paris, vocês tornaram a jornada mais leve e divertida, muito obrigada!

A Marcela e Junior, Lilly e Daniel, Alecsandra e Marcos, obrigada por todo cuidado e principalmente por dividirem comigo o lar, as filhas e o filhos de vocês, Tia Lay ama!

À Jerônimo Monteiro, cidade que me acolheu e abraçou todos os projetos que me permitiram chegar até aqui.

A Vitoria, Zé Valerio, Nicola, Silvana, Marcos, Larissa, Edmar, Sabrina, Flavia, Nando, Marcio, Andrea, Leiza, João, Dona Carmen, Seu Sebastião, Ricardo e a toda Família Moreira, a acolhida de você foi essencial para chegar até aqui, com vocês aos longos dos últimos 7 anos vivi momentos incríveis.

Muito obrigada!

À Suzano, em nome da minha gestão direta, Leandro e Wilas, por toda compreensão e incentivo para cruzar a linha de chegada, gratidão!

A Thaysa, Nathalia e Livia pelo suporte emocional e apoio nessa reta final, vocês são maravilhosas!

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao Laboratório de Meteorologia e Ecofisiologia Vegetal (LMEF) a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos subsídios para desenvolvimento da pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*“A verdade é que existe um mistério aí dentro
Uma força que excede o entendimento
A razão pra ter chegado até aqui
Tem alguém que esteve do meu lado em toda a trajetória
Alguém que conhece até o fim da história...”*

RESUMO

GALVÃO, Elayne Kátia dos Santos 2024. **TOLERÂNCIA, TEMPERATURA LETAL E MEMÓRIA DE ACLIMATAÇÃO DE *Eucalyptus* SUBMETIDOS À GEADA.** Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro – ES. Orientador: Prof. D.Sc José Eduardo Macedo Pezzopane. Coorientadores: João Vitor Toledo e Talita Miranda Teixeira Xavier.

As mudanças climáticas têm intensificado a frequência de eventos extremos, afetando a silvicultura global, especialmente nas plantações de eucalipto. No Sul do Brasil, região proeminente na produção dessa espécie, eventos de geadas desafiam a produtividade de cultivos de eucalipto. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a tolerância à geada dos clones de eucalipto recomendados para a região (*Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, *E. saligna*, *E. dunnii* e *E. benthamii*), verificar se é possível induzir tolerância à geada no híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* através da aclimação ao frio, determinando também a duração da memória induzida. Em câmara climatizada foi realizado o estudo de tolerância à geada, mudas dos clones supracitados foram testadas quanto à sua tolerância em simulações de geada nas temperaturas de -1,5; -2,2; -2,9; -3,4; -4,4 e -6,2 °C. Após as geadas foram avaliados os parâmetros de trocas gasosas, índice de dano visual, o extravasamento de eletrólitos a temperatura letal (TL50) e realizadas análises bioquímicas quantificando os açúcares solúveis, flavonoides, fenóis e antocianinas. No estudo de aclimação, as mudas de *E. grandis* x *E. urophylla* foram divididas em dois grupos: um submetido a um período de aclimação ao frio (5°C a 15°C) e o outro, controle (sem aclimação), mantido em temperaturas de 12°C a 27°C, ambos por 21 dias com fotoperíodo de 10 horas. Posteriormente, foram testadas quanto à sua memória de aclimação no tempo de 15, 45 e 60 dias. O estudo da duração da memória de aclimação foi realizado sob a temperatura de -4,4°C, determinada em teste prévio realizado no tempo zero, utilizando temperaturas de -2,0; -3,0; -3,5, -4,4 e -5.0°C, onde a temperatura de -4,4°C foi selecionada por evidenciar as diferenças de tolerância entre plantas aclimatadas e não aclimatadas. No estudo de tolerância à geada, o *Eucalyptus benthamii* demonstrou ser o clone mais tolerante, enquanto o híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* mostrou-se o mais suscetível. O *E. benthamii* apresentou um maior controle estomático, preservou as taxas fotossintéticas e exibiu maiores teores de açúcares solúveis e antocianinas. No estudo de indução de tolerância à geada, foi possível realizar a indução de uma maior tolerância geada em *E. urophylla* x *E. grandis*, logo após a aclimação, entretanto concluindo que a memória da aclimação induzida não é persistente. Os conhecimentos aqui elucidados podem subsidiar planos de manejo em áreas com risco de geadas, bem como orientar geneticistas e melhoristas florestais

quanto aos melhores cruzamentos a serem realizados para resultar em híbridos mais tolerantes.

Palavras chave: temperatura baixa; frio; eucalipto; estresse térmico; sobrevivência; nível de dano.

ABSTRACT

GALVÃO, Elayne Kátia dos Santos 2024. TOLERANCE, LETHAL TEMPERATURE AND ACCLIMATIZATION MEMORY OF *Eucalyptus* SUBJECTED TO FROST. Thesis (Doctorate in Forest Sciences) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro – ES. Advisor: Prof. D.Sc. José Eduardo Macedo Pezzopane. Co-advisors: João Vitor Toledo and Talita Miranda Teixeira Xavier.

Climate change has increased the frequency of extreme events, affecting global forestry, especially in eucalyptus plantations. In southern Brazil, a prominent region in the production of this species, seasonal events challenge the productivity of eucalyptus crops. In this context, the objective of this research was to evaluate the tolerance to tolerance of eucalyptus clones recommended for the region (*Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, *E. saligna*, *E. dunnii* and *E. benthamii*), to verify if it is possible to induce tolerance to tolerance in the hybrid *E. urophylla* x *E. grandis* through cold acclimatization, also determining the duration of the memory induced. In a climate-controlled chamber, the tolerance to tolerance study was carried out, changes of the aforementioned clones were tested for their tolerance in tolerance simulations at temperatures of -1.5; -2.2; -2.9; -3.4; -4.4 and -6.2 °C. After the sessions, the gas exchange configurations, visual damage index, electrolyte extravasation at lethal temperature (TL50) were evaluated and biochemical analyses were performed quantifying soluble sugars, flavonoids, phenols and anthocyanins. In the acclimation study, *E. grandis* x *E. urophylla* seedlings were divided into two groups: one controlled to a period of cold acclimation (5°C to 15°C) and the other, control (without acclimation), maintained at temperatures of 12°C to 27°C, both for 21 days with a 10-hour photoperiod. Subsequently, they were tested for their acclimation memory at 15, 45 and 60 days. The study of the duration of acclimation memory was carried out at a temperature of -4.4°C, determined in a previous test carried out at time zero, using temperatures of -2.0; -3.0; -3.5, -4.4 and -5.0°C, where the temperature of -4.4°C was selected to highlight the differences in tolerance between acclimated and non-acclimated plants. In the patience tolerance study, *Eucalyptus benthamii* was the most tolerant clone, while the hybrid *E. urophylla* x *E. grandis* was the most susceptible. *E. benthamii* showed greater stomatal control, preserved photosynthetic rates and exhibited higher levels of soluble sugars and anthocyanins. In the patience tolerance induction study, it was possible to induce greater tolerance in *E. urophylla* x *E. grandis*, immediately after acclimatization, however concluding that the memory of the acclimatization caused is not persistent. The knowledge elucidated here can support management plans in areas at risk of complications, as well as guide geneticists and forestry professionals regarding the best crosses to be performed to result in more tolerant hybrids.

Key words: low temperature; cold; eucalyptus; heat stress; survival; level of damage.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. CARACTERIZAÇÃO DO FENÔMENO GEADA.....	14
2.2. ECOFISIOLOGIA DO CLONES AVALIADOS.....	21
2.3. MUDANÇAS CLIMÁTICAS E A OCORRÊNCIA DE GEADAS	23
2.4. ESTRESSE POR CONGELAMENTO (GEADAS).....	25
2.5. ESPÉCIES FLORESTAIS E O FENOMENO METEOROLÓGICO GEADA	26
2.6. INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA À GEADA E MEMÓRIA DE ACLIMATAÇÃO AO FRIO.....	29
3. METODOLOGIA	32
3.1. Local do estudo.....	32
3.2. Material vegetal e condições de cultivo.....	32
Estudo de tolerância à geada	Erro! Indicador não definido.
3.3. ENSAIOS EM CÂMARA CLIMATIZADA	33
3.4. ESTUDO DE ACLIMATAÇÃO E DURAÇÃO DA MEMORIA DE ACLIMATAÇÃO	36
3.5. Extravasamento de Eletrólitos.....	38
3.6. Trocas gasosas.....	39
3.7. Compostos fenólicos, antocianinas e flavonoides	39
3.8. Teores de açúcares solúveis totais	40
3.9. Avaliação do Índice de Dano.....	40
3.10. Delineamento experimental	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
4.1. ESTUDO DE TOLERÂNCIA À GEADA.....	45
5. CONCLUSÕES	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

A aceleração das mudanças climáticas tem sido observada em várias regiões do planeta com eventos extremos, sendo frequentemente identificados como uma das maiores ameaças à humanidade. Esses eventos têm impactos negativos em vários setores, incluindo aqueles vitais para a economia global (SHARIF, 2023). De modo paralelo, a demanda crescente por produtos derivados da madeira tem impulsionado o aumento significativo das áreas de plantios florestais em todo o mundo, uma tendência que deve se manter devido ao contínuo crescimento populacional (FAO, 2015; CHANG et al., 2019).

Ao redor do mundo, cerca de 131 milhões de hectares são empregados em cultivos florestais, sendo o gênero *Eucalyptus* mais plantado, onde diversas espécies desempenham um importante papel na satisfação das demandas globais por madeira. Essas espécies são amplamente utilizadas tanto na produção de celulose e papel como para outros fins industriais (FAO, 2020). A silvicultura tem se consolidado progressivamente como um pilar fundamental da bioeconomia em larga escala, contribuindo efetivamente nos avanços econômicos do Brasil (IBÁ, 2023).

Entre as regiões produtoras de eucalipto no Brasil, o Sul é particularmente notável, com três de seus estados (Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina) figurando entre os sete maiores produtores nacionais. Juntos, esses estados abrigam 18% do total de plantios de eucalipto em todo o território nacional (IBÁ, 2023). A ocorrência de geadas, em particular, tem sido um obstáculo para a silvicultura na região (HIGA et al., 1994; FLORIANI et al., 2011; FLORIANI et al., 2013; MORAES et al., 2014). Estas condições extremas de baixas temperaturas são fatores climáticos limitantes que comprometem a homogeneidade dos plantios, reduzem a produtividade e afetam a produção de madeira de *Eucalyptus* na região. Torna-se, portanto, preponderante identificar os limites fisiológicos de espécies e genótipos de eucalipto que sejam promissores para a tolerância à geada.

Após eventos de geada, as plantas experimentam uma série de alterações fisiológicas e metabólicas, incluindo inibição da fotossíntese, baixas taxas

respiratórias e aumento na produção de antocianinas (GILMOUR et al., 2000; CLOSE, 2004). Espécies do gênero *Eucalyptus* podem exibir diferentes níveis de tolerância à temperatura abaixo de zero (FLORIANI et al., 2011; FLORIANI et al., 2013; OBERSCHELP et al., 2020; OBERSCHELP et al., 2023). Todavia, apesar de algumas espécies apresentarem maior tolerância ao frio, os limites precisos de tolerância a geadas e as estratégias fisiológicas adotadas por cada espécie ainda não são totalmente compreendidos (HIGA et al., 2000; GONÇALVES et al., 2013).

Compreender a complexa rede de respostas ao estresse por geadas e conhecer os limites fisiológicos de cada uma das espécies é de suma importância para estabelecer plantios homogêneos em regiões sujeitas a eventos de geadas (HIGA et al., 2000; GONÇALVES et al., 2013). Entre as espécies mais plantadas na região Sul do Brasil temos os *E. urophylla*, *E. saligna*, *E. dunnii* e *E. benthamii*. O entendimento das estratégias ecofisiológicas adotadas por diferentes clones de *Eucalyptus* pode orientar significativamente tanto o melhoramento genético quanto o manejo florestal.

Através de cruzamentos genéticos direcionados, é possível desenvolver clones que apresentem maior tolerância a condições adversas, como frio extremo, otimizando a produtividade e a sustentabilidade das plantações florestais. Além disso, a avaliação ecofisiológica permite a alocação adequada de cada espécie ou clone em áreas que melhor atendam suas necessidades específicas, aumentando a eficiência do manejo e a resiliência das florestas plantadas (Gonçalves et al., 2013; Harder et al., 2020; Oberschelp et al., 2020).

O híbrido "urograndis", resultado do cruzamento entre *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*, é um dos mais cultivados no Brasil, especialmente valorizado na indústria de papel e celulose devido a suas características distintas. Porém, ainda hoje a adaptação do híbrido a regiões com frequentes ocorrências de geada continua sendo um desafio, visto que ele apresenta limitações sob condições climáticas extremas (FILHO, SANTOS, 2013). Essa vulnerabilidade reforça a importância de investimentos contínuos em pesquisa e desenvolvimento para aprimorar a resistência ao frio desse híbrido, com o objetivo de ampliar sua viabilidade em áreas suscetíveis a geadas.

Pesquisas recentes têm demonstrado que as plantas são capazes de responder a períodos curtos de temperaturas baixas, mas não congelantes, através de mecanismos de regulação que envolve processos fisiológicos, metabólicos (OBERSCHELP et al., 2020; OBERSCHELP et al., 2023) e transcricionais, que elevam a sua tolerância à geada (GAETE-LOYOLA, 2017). Este fenômeno, conhecido como aclimação ao frio, destaca a capacidade adaptativa das plantas e reforça a necessidade de explorar esses mecanismos (OBERSCHELP et al., 2020).

A aclimação é definida principalmente por mudanças no estado fisiológico das plantas, resultando em ajustes na composição lipídica das membranas celulares e nos níveis de pigmentos fotossintéticos, bem como na concentração de solutos osmóticos como açúcares solúveis, betaína e prolina (OBERSCHELP et al., 2020; OBERSCHELP et al., 2023). Essas transformações podem ser acompanhadas por uma variação nos níveis de antioxidantes e um rearranjo abrangente na expressão genética (GAETE-LOYOLA, 2017).

Buscar meios de compreender e mitigar os impactos de eventos extremos decorrentes das mudanças climáticas é avançar em direção a um futuro menos caótico. Portanto, este estudo foi conduzido com o objetivo de determinar os limites de tolerância a geadas em clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, *E. saligna*, *E. dunnii* e *E. benthamii*, e investigar as estratégias ecofisiológicas adotadas por cada uma dessas espécies. Além disso, através da aclimação ao frio induzir uma maior tolerância à geada em plantas do híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* e investigar a duração da memória de aclimação ao frio.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a tolerância à geada de espécies de eucalipto com potencial produtivo para a região Sul do Brasil (*Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, *E. saligna*, *E. dunnii* e *E. benthamii*) e determinar as temperaturas letais para cada espécie. Adicionalmente avaliar se é possível induzir resistência a geada em

mudas de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* através da aclimação ao frio, bem como o tempo de duração dessa resistência induzida, ou seja, determinar a duração da memória de aclimação induzida por exposição ao frio.

Objetivos específicos

- Avaliar a tolerância de espécies de eucalipto a geada.
- Determinar o dano à membrana celular por meio da quantificação do extravasamento de eletrólitos.
- Avaliar como a ocorrência de geada afeta o processo de trocas gasosas e como as concentrações foliares de açúcares solúveis totais, antocianinas, flavonoides e compostos fenólicos, estão associadas ao impacto dos danos.
- Quantificar os extravasamentos de eletrólitos nos tecidos foliares de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* e avaliar se a aclimação aumenta a tolerância a geada.
- Avaliar como as baixas temperaturas afetam as trocas gasosas de plantas aclimatadas e não aclimatadas *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* expostas a geadas.
- Determinar a duração da memória de aclimação induzida pelo frio em *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*.

HIPÓTESES

- As espécies possuem diferentes níveis de resistência a geada.
- A exposição prévia ao frio irá promover uma aclimação e tornará as mudas de *E. urophylla* x *E. grandis* mais tolerantes a geadas, apresentando tolerância a geada persistente no tempo (15, 45 e 60 dias)

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CARACTERIZAÇÃO DO FENÔMENO GEADA

A geada é um fenômeno meteorológico complexo cuja ocorrência está correlacionada a condições climáticas específicas (SONG et al., 2021). Para uma total compreensão da classificação e dos aspectos envolvidos no fenômeno meteorológico da geada, é essencial compreender os conceitos existentes sobre o tema. Neste sentido, a geada pode ser definida sob dois principais pontos de vistas, o meteorológico e o agrônômico (CAMARGO, 1972).

Sob o ponto de vista meteorológico a geada ocorre quando há a passagem da temperatura abaixo de 0° C, ocasionando a formação de cristais de gelo nas superfícies que estão expostas a perda de calor, solo e plantas (SONG et al., 2021). No ponto de vista agrônômico, as geadas são compreendidas como eventos de frio intenso com temperaturas do ar iguais ou abaixo de 0°C, que causam danos e possível morte dos tecidos vegetais, impactando diretamente na produtividade vegetal (CAMARGO, 1972).

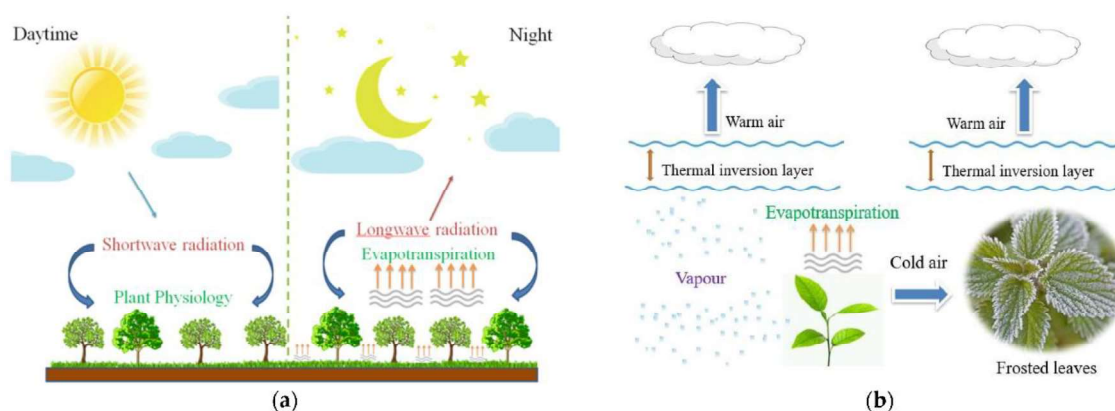
Em síntese, o estudo da geada envolve uma compreensão detalhada dos processos físicos envolvidos e seus impactos nos tecidos vegetais. As geadas podem ser classificadas de acordo com sua formação, como geadas advectivas ou geadas por radiação (SONG et al., 2021)

As geadas advectivas, também conhecidas como geadas de vento ou climáticas, ocorrem a partir da entrada de uma grande massa de ar frio no continente (CAMARGO, 1972; KALMA, et al, 1992), geralmente estando associadas ao deslocamento de frentes frias e anticiclones migratórios. Neste caso, as massas de ar polares atingem as regiões onde as plantações estão inseridas e o processo advectivo causa o rebaixamento da temperatura à valores negativos. As geadas advectivas são caracterizadas ainda pelas condições nubladas, ventos moderados a fortes, baixa umidade e sem inversão de temperatura (SNYDER; MELO-ABREU; MATULICH, 2005). Ocorrem com maior frequência nas áreas mais próximas aos polos, ou seja, locais de maiores

latitudes. São ainda mais severas em locais de maiores altitudes, topo de morro e montanhas, em baixadas e encostas com exposição voltada para a direção de origem do vento (CAMARGO, 1972).

As geadas de radiação, também conhecidas como geadas de irradiação noturna, são fenômenos locais que ocorrem em noites de céu claro. Nessas noites, a irradiação de calor pela superfície terrestre supera a radiação recebida da atmosfera. Como resultado, o calor é irradiado para a atmosfera, fazendo com que o ar frio desça, formando uma inversão de temperatura (Figura 1), característica desse fenômeno (SONG et al., 2021).

Essas condições são alcançadas quando há a permanência de altas pressões sobre a região, no âmbito de massas ar frio e seco (comumente vinculada a situações anticiclônica). A combinação de ausência nebulosidade e baixa umidade do ar favorecem a efetiva emissão de radiação de ondas longas pela superfície, provocando o alcance de temperaturas ainda mais baixas, chegando a valores críticos para as espécies (SONG et al., 2021). Geralmente, as baixas temperaturas das geadas de radiação estão acima de 0°C durante o dia, mas caem abaixo de 0°C durante a noite, estando ainda associada a presença de ventos calmos (SNYDER; MELO-ABREU; MATULICH, 2005).



Fonte: Song et al., 2021

Figura 1. Diagrama esquemático do congelamento da superfície da planta sob condições de radiação natural: (a) condições naturais de formação de gelo por radiação; (b) princípio da formação de geada na superfície da planta.

A umidade relativa é um fator importante na severidade da geada, pois é o critério que classifica a geada de radiação em dois tipos diferentes: a geada branca e a geada negra (SNYDER; MELO-ABREU; MATULICH, 2005; SAVAGE, 2012; MITTELMANN et al., 2013).

A **geada branca** é caracterizada pelo intenso resfriamento noturno que leva à condensação do orvalho e, posteriormente, a formação de cristais de gelo sobre as superfícies das folhas, o que lhes confere a coloração branca ao término do processo de congelamento (MITTELMANN, A. et al, 2013). Nesse caso, a liberação de calor latente durante a condensação do vapor de água e deposição do gelo ajuda a reduzir a queda de temperatura no interior do vegetal, tornando a geada branca menos severa do que a geada negra (SNYDER; MELO-ABREU; MATULICH, 2005).

A **geada negra**, ocorre quando a temperatura cai abaixo de 0°, mas não se forma gelo na superfície (SNYDER; MELO-ABREU; MATULICH, 2005), pois a umidade do ar está baixa e a perda radiativa é intensa, causando um forte resfriamento a ponto de chegar à temperatura letal da planta (MITTELMANN, et al, 2013). Neste caso, ocorre o congelamento da seiva celular e a ruptura das células, resultando no apodrecimento do tecido vegetal com a vegetação aparecendo preta (SAVAGE, 2012).

Alguns trabalhos na literatura assumem outros dois tipos de geada, a geada mista e a geada de canela, ambas derivadas das geadas advectivas e radiativas. A geada mista resulta da combinação dos referidos tipos de geadas (KALMA, et al, 1992) sucessiva ou concomitantemente. Em muitos casos, uma série de noites abaixo de zero começará como uma geada de advecção, reduzindo as temperaturas a um nível crítico. Mais tarde, quedas na velocidade do vento e a presença de céu limpo, características de geadas radiativas, resultam no aumento da perda de radiação pelas superfícies e severo congelamento (KALMA, et al, 1992; SNYDER; MELO-ABREU; MATULICH, 2005).

A “geada de canela”, por sua vez, é provocada pela advecção, com o vento que se desloca morro abaixo em noites de intenso resfriamento da superfície, promovendo o congelamento da seiva nos vasos condutores do caule próximo ao solo, região popularmente conhecida como “canela da planta”. Com o

congelamento dos vasos condutores da região, a parte aérea da planta é atingida por uma seca, pois, não há mais suprimento de seiva xilemática para a parte aérea da planta. Após a geada, a depender da sua intensidade e duração, os vasos condutores de seiva podem apresentar necrose, apresentando cor escura. Esse tipo de geada acomete geralmente plantas jovens (até 2 anos) e a sua ocorrência é muito relatada em cultivos agrícolas (ALGARVE; CAVALCANTI, 1994).

a. Fatores determinantes à ocorrência de geada

Considerando que a geada é um fenômeno diretamente relacionado ao resfriamento, os fatores que atuam sobre a temperatura do ar também influenciam a ocorrência de geada. Na escala macroclimática destacam-se a influência da latitude, altitude, continentalidade e maritimidade e movimentos de massas de ar (PEREIRA et al., 2007). Na escala topoclimática destacam-se a configuração e face de exposição do terreno (KALMA, et al, 1992; PEREIRA et al., 2007).

i. Latitude

O formato esférico, o movimento de translação e a inclinação do eixo de rotação da Terra em relação ao plano da eclíptica produzem uma variação espaço-temporal da incidência dos raios solares sobre o planeta. Por essa razão, a latitude exerce principal controle na insolação de um determinado lugar e, conseqüentemente, no balanço de energia, com tendência de redução da temperatura média indo-se das regiões equatoriais em direção aos polos (PEREIRA et al., 2007).

Analisando as condições agrometeorológicas no Hemisfério Sul, Camargo (1972) *apud* Pereira et al. (2007) explica que quanto maior a latitude maior a ocorrência de geada. O referido autor relata que “Ao nível do mar, as geadas ocorrem somente em latitudes maiores que 23°S; entre 23°S e 27°S, ocorrem geadas somente no inverno; em latitudes maiores que 27°S, ocorrem geadas precoces no outono, geadas normais no inverno, e geadas tardias na primavera.”

ii. Altitude

A altitude refere-se a distância vertical de um ponto ao nível médio do mar, sendo considerada positiva quando o ponto está acima do nível do mar (VAREJÃO-SILVA, 2006). Desde que outros fatores climáticos sejam mantidos invariáveis, aumentos em altitude resultam na diminuição da temperatura em virtude da rarefação do ar e da redução da pressão atmosférica. Assim, quanto maior a altitude, menor a temperatura, e maior probabilidade de ocorrência de geadas (PEREIRA et al., 2007).

Ao determinarem o número médio e a probabilidade mensal de ocorrência de geadas em Santa Catarina, Massignam e Dittrich (1998) concluíram que ambos se devem especialmente a altitude, sendo que ocorrem, em média, 4 geadas por mês em áreas com altitudes de 800 m e 2 geadas por mês em altitudes de 400 m.

Avaliando os danos à copa de faias europeias (*Fagus sylvatica* L.) por geadas primaveris nos Apeninos (Cordilheira na Itália), Allevato et al. (2019) verificaram que os maiores danos ocorreram entre 1.500 e 1.700 m de altitude, com uma tendência decrescente para altitudes mais baixas devido às temperaturas superiores.

iii. Continentalidade e maritimidade

A maritimidade e a continentalidade são conceitos geográficos que explicam como a proximidade ou a distância de grandes corpos hídricos influenciam o clima de uma região. Devido ao alto calor específico da água o oceano funciona como um atenuante as grandes oscilações de temperatura, visto que se aquece e resfria mais lentamente do que a superfície continental, onde ocorrem maiores amplitudes térmicas (PEREIRA et al., 2007).

Além disso, as correntes oceânicas interagem com as massas de ar, influenciando a formação de regiões secas e úmidas. Locais banhados por correntes frias induzem o resfriamento do ar, afetando a formação de nuvens e a ocorrência de chuvas, enquanto locais banhados por correntes quentes induzem o aquecimento do ar e, conseqüentemente, a formação de nuvens e

chuvas, tornando o ambiente mais úmido (MENDONÇA; DANNI-OLIVEIRA, 2007).

Analisando a distribuição espacial e temporal das ocorrências de geadas no estado de Santa Catarina no período de 1980 a 2003, Aguiar e Mendonça (2004) verificaram que a continentalidade associada a maiores altitudes favorece a ocorrência de geadas na porção oeste do estado, enquanto nas regiões costeiras as geadas são menos frequentes e intensas devido a ação termorreguladora do oceano.

iv. Massas de ar

Os eventos de geada, geralmente, estão relacionados ao avanço de massas de ar polares, sendo que na América do Sul tais massas são originárias dos mares subantárticos, cuja trajetória e velocidade influenciam na intensidade da geada (SELUCHI, 2009).

O formato de cone do continente sul-americano faz com que as massas polares que invadem a região sudeste, com ventos que transpõem os Andes, soprando de oeste e sudoeste, reduzam a temperatura repentinamente. Ao transpor os Andes, a baixa umidade inicial da massa de ar é retirada em forma de neve na cordilheira, resultando em uma massa de ar fria e seca. O ar frio e seco favorece a perda de energia por radiação e, conseqüentemente, a formação de geadas de radiação (PEREIRA et al., 2007).

De modo geral, as geadas mais intensas são associadas aos anticiclones migratórios frios, que se deslocam rapidamente, seguindo uma trajetória continental meridional. Em oposição, as massas polares marítimas, que se deslocam lentamente sobre o mar, adquirem gradativamente a temperatura e umidade da superfície oceânica, chegando ao continente muito modificadas em relação as suas características “polares”. Assim, sua temperatura e umidade relativamente mais altas, eventualmente, provocam geadas menos intensas do tipo “branca” (SELUCHI, 2009).

v. Fatores topoclimáticos: face de exposição e inclinação

Os fatores topoclimáticos referem-se a topografia do terreno, sendo que em regiões montanhosas características topográficas como grau de inclinação e face de exposição da encosta afetam potencialmente o impacto da geada (ALLEVATO et al., 2019). Vareja-Silva (2006) esclarece que no período noturno o ar em contato com o solo aquecido aumenta de densidade e escoar pelas encostas, acumulando-se nos vales, onde pode atingir a saturação e condensar-se, formando o orvalho. Caso a temperatura noturna seja negativa, provavelmente haverá formação de geada. Assim, áreas situadas nas regiões do terreno onde o ar frio fica estagnado, como terrenos planos e baixadas, estão sujeitas a maiores danos (PEREIRA et al., 2007).

Terrenos convexos que não sejam circundados por terrenos mais elevados apresentam menor frequência de geadas do que terrenos côncavos, cuja configuração em forma de bacia propicia o acúmulo de ar frio. A meia-encosta, por sua vez, favorece o escoamento do ar frio, podendo afetar o caule das plantas (geada de canela) dependendo da intensidade do resfriamento (PEREIRA et al., 2007). Corroborando com os pressupostos teóricos Matusick et al. (2014), ao avaliarem a influência da topografia na distribuição dos danos provocados pela geada em uma floresta de eucaliptos no sudoeste da Austrália, verificaram que danos na copa das árvores foram encontrados com maior frequência nas regiões de vale e posições inferiores à média da encosta.

Adicionalmente destaca-se que, considerando-se o hemisfério sul, terrenos com face de exposição voltados para o sul são naturalmente mais frios, visto que recebem menos radiação solar durante o inverno e estão mais sujeitos a ventos de sudeste (frios) (PEREIRA et al., 2007).

vi. Fatores microclimáticos

Fatores microclimáticos: O microclima está relacionado ao tipo de cobertura do terreno, pois, a depender das características da superfície, a velocidade e a intensidade da absorção e da perda de calor pode ser amplificada ou minimizada (PEREIRA et al., 2007). Em geral, solos cobertos com vegetação tendem a menor perda radiativa. Áreas florestadas, por exemplo, apresentam temperaturas inferiores à de áreas vizinhas com outro tipo de cobertura, como campos, pois a copa das árvores atua como uma barreira à radiação solar,

reduzindo a disponibilidade de energia para aquecer o ar (MENDONÇA DANNI-OLIVEIRA, 2007). Solos descobertos, por sua vez, atuam como um armazenador de calor durante o dia, pois absorvem radiação, e a noite, devido a emissão de radiação de ondas longas, atuam como fonte de calor, aquecendo a superfície (PEREIRA et al., 2007). Assim, os processos de troca de calor entre o solo e o ar são mais efetivos em solos marcados pela ausência de vegetação.

2.2. ECOFISIOLOGIA DO CLONES AVALIADOS

2.2.1. *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*

Originário da Indonésia, o *Eucalyptus urophylla* ocorre naturalmente na costa de Timor entre 500m e 3.000m de altitude, e em outras ilhas da Indonésia cobrindo uma faixa latitudinal de 6°S a 10°S. No Brasil, foi amplamente testado em quase todas as regiões, sendo considerada uma das espécies de maior potencial florestal devido a seu considerável crescimento em quase todo o país e a resistência a doenças fúngicas (MOURA, 2004).

O *Eucalyptus grandis*, por sua vez, é originário da Austrália, ocorrendo naturalmente na região compreendida entre 16°S e 32°S, nas altitudes de 400m a 1.250m de altitude, onde o clima de modo geral, é quente e úmido (ELDRIDGE et al., 1994 *apud* HIGA, 2010). Devido a seu rápido crescimento a espécie é amplamente utilizada para a produção de celulose em regiões subtropicais, porém em regiões tropicais a espécie é afetada por doenças fúngicas (WINGFIELD; CROUS; COUTINHO, 1996).

O *Eucalyptus urograndis* é o híbrido resultante do cruzamento entre *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. O híbrido combina o rápido crescimento e a propagação vegetativa bem-sucedida do *E. grandis* com a maior densidade de madeira, adaptabilidade ao clima e tolerância a doenças fúngicas do *E. urophylla*, o que resultou na produção de árvores vigorosas e com melhores rendimentos (KULLAN et al., 2012).

2.2.2. *Eucalyptus saligna*

O *Eucalyptus saligna* é nativo da costa leste da Austrália. Apresenta rápido crescimento e adapta-se em regiões de clima temperado à subtropical (MARCHIORI e SOBRAL, 1997; TONINI, 2003). É uma das espécies mais plantadas no estado do Rio Grande do Sul, devido à alta capacidade produtiva nessa região, a madeira pode ser utilizada para carvão vegetal, fins energéticos, madeira cerrada e celulose (BRITO *et al.*, 1983; SILVA *et al.*, 2015). Além disso, ocorre naturalmente em regiões com temperaturas subtropicais apresentando máximas médias entre 28 e 30 °C e mínimas médias entre 3 e 4 °C, suportando temperaturas negativas (-2 °C), com esporádicas geadas (LAMPRECHT, 1990).

2.2.3. *Eucalyptus dunnii*

E. dunnii ocorre naturalmente em duas áreas distanciadas aproximadamente de 140 km entre o Sudeste de Queensland (QLD) e o Noroeste de New South Wales (NSW), na Austrália. *E. dunnii* tem se mostrado promissor no estado de Santa Catarina, onde tem sido utilizado nas indústrias da região para fabricação de serrados (IWAKIRI *et al.*, 2007). Além disso, a madeira de *Eucalyptus dunnii* é indicada para lenha, carvão, celulose, moirões e postes (HIGA, 1998).

No Brasil, *Eucalyptus dunnii* destaca-se pelo rápido crescimento, uniformidade, forma das árvores e resistência à geada não muito severa (HIGA *et al.*, 2000). Entretanto, sob geadas fortes fora da época usual, a mortalidade pode atingir 50% em plantios comerciais (PALUDZYSZYN, 2005). Entretanto existem estudos que relatam que *E. dunnii* é capaz de tolerar temperaturas de até -8 °C com o devido processo de aclimação, o que demonstra seu alto potencial para tolerância a geada (HARDER *et al.*, 2020).

2.2.4. *Eucalyptus benthamii*

O *E. benthamii* é encontrado em áreas restritas da Austrália, no litoral de New South Wales, a sudoeste da cidade de Sydney, nas planícies ao longo do Rio Nepean e seus afluentes (PRYOR; JOHNSON, 1971; BUTCHER *et al.*, 2005). Originalmente, a espécie ocorria nos solos férteis das partes planas de deposição de rios, em uma área de 100 km de comprimento por 40 km de largura, com latitude aproximada de 34° S e altitudes inferiores a 100 m, onde a temperatura média máxima é 26° C e a temperatura média mínima é 4° C e ocorrência de geadas leves (HIGA; PEREIRA, 2003). Na África do Sul a espécie é considerada potencial para plantios em regiões com ocorrência de geadas e foi incluída no programa de melhoramento do ICFR (Institute for Commercial Forestry Research) a partir de 1994 (SWAIN, 1997). No Sul do Brasil, *E. benthamii* tem apresentado bom crescimento e resistência a geadas em plantios experimentais com 2 e 3 anos no estado de Santa Catarina (HIGA; PEREIRA, 2003). Dessa forma, se trata de uma espécie promissora para plantios em regiões de ocorrência de geada. (EMBRAPA, 2020).

2.3. MUDANÇAS CLIMÁTICAS E A OCORRÊNCIA DE GEADAS

As alterações nos padrões climáticos globais estão se tornando cada vez mais evidentes. Entre os principais eventos e indicadores que corroboram essa realidade destacam-se: o aumento na ocorrência de tempestades fora de época acompanhadas de chuvas volumosas intensas, a ocorrência de períodos de seca inesperados (veranicos), mudanças na distribuição da precipitação anual, ondas de calor onde a temperatura média horária do ar excede os 35°C, episódios de frio extremo com maior frequência e proximidade temporal, aumento na concentração atmosférica de CO₂, e a elevação na frequência de eventos climáticos extremos em geral (IPCC, 2014).

Esses eventos provocam o desvio das condições ótimas para o desenvolvimento de plantas, o que é definido como estresse abiótico. O estresse abiótico desencadeia uma série de respostas de defesa metabólica e fisiológica através das quais as plantas buscam escapar, aclimatar, tolerar e/ou resistir às condições adversas que lhes são impostas (LACHER, 2006).

Embora o aquecimento global seja um aspecto central das mudanças climáticas, as baixas temperaturas extremas, especialmente aquelas abaixo de 0°C (geadas), juntamente com a variabilidade climática aumentada, apresentam desafios significativos as plantas, e precisam ser abordados de maneira abrangente e eficaz. O aumento da variabilidade climática associada às mudanças climáticas pode fazer com que eventos extremos de temperatura, como geadas severas, se tornem mais comuns em épocas do ano em que normalmente não seriam esperadas (IPCC, 2014). Este fenômeno é um reflexo das perturbações nos padrões climáticos globais, muitas vezes exacerbadas pelo derretimento das calotas polares e pelas mudanças nas correntes oceânicas e atmosféricas (COHEN et al., 2018; OVERLAND et al., 2015).

No sul do Brasil, vários fatores climáticos específicos contribuem para a maior formação de geadas e períodos de frio. A La Niña, caracterizada pelo resfriamento das águas superficiais do Oceano Pacífico Equatorial, pode influenciar significativamente a formação de geadas na região, aumentando a frequência e intensidade das massas de ar frio das regiões polares (GRIMM et al., 2000). Além disso, La Niña está associada a padrões de circulação atmosférica que promovem tempo seco e noites sem nuvens favorecendo que ocorra o resfriamento noturno intenso (LOPES, 2022), condições favoráveis para a formação de geadas de radiação.

Existem ainda outros fatores que incluem as oscilações atmosféricas, como a Oscilação Sul, que alteram os padrões climáticos regionais e podem favorecer a formação de geadas durante fases específicas (CAI et al., 2020). Mudanças nas correntes oceânicas, particularmente no Atlântico Sul, também influenciam a distribuição de calor e umidade, trazendo ar mais frio para a região (WANG et al., 2019). A intensificação das correntes de jato polares pode levar a incursões mais frequentes de ar frio das regiões polares para latitudes mais baixas, resultando em períodos de frio intenso e geadas mais frequentes (COHEN et al., 2018; OVERLAND et al., 2015). Assim, compreender e mitigar os efeitos das baixas temperaturas extremas é crucial para a resiliência das plantações da região Sul do Brasil.

2.4. ESTRESSE POR CONGELAMENTO (GEADAS)

O estresse térmico causado por geadas é um desafio abiótico significativo para as plantações de eucalipto globalmente, afetando profundamente todas as funções celulares das plantas (PEARCE, 2001). Dependendo da intensidade da geada e da tolerância das plantas, os danos podem variar de queimaduras nos ponteiros até a morte completa da parte aérea, com o congelamento do líquido nos espaços intracelulares formando cristais de gelo que rompem as membranas celulares e causam extravasamento irreversível do citoplasma (SELLE; VUADEN, 2008; KASUGA et al., 2007; FLORIANI et al., 2013).

A exposição a temperaturas negativas pode causar danos significativos às estruturas celulares das plantas, afetando a permeabilidade e integridade da membrana celular, o que, em muitos casos, leva à morte celular e tecidual (DING et al., 2019; GILMOUR et al., 2000). Um dos principais impactos do estresse abiótico no tecido vegetal é o comprometimento da integridade da membrana celular. O método de condutividade elétrica é amplamente utilizado para quantificar o dano à membrana celular em plantas expostas a estresses ambientais, incluindo o congelamento. Este método proporciona uma medida precisa da extensão dos danos causados por perturbações como geadas, pois a perda de eletrólitos indica ruptura das membranas celulares. (BACIC; HARRIS; STONE, 2008; BLUM; EBERCON, 1981).

Vários estudos investigam o extravasamento de eletrólitos como indicador de dano as membranas celulares, entre eles Rezaei e Rohani (2023), consideraram que os danos causados pela geada em oliveiras podem ser avaliados de modo eficaz através da análise do extravasamento de eletrólitos (EE). Esse método avalia os tecidos danificados após o congelamento, contribuindo para a seleção de genótipos resistentes. No estudo os autores analisaram 18 modelos matemáticos para estimar a TL50 para oliveiras, os resultados encontrados destacaram o modelo logístico de 2 parâmetros (2P-logistic) como o mais eficiente para determinar a TL50 dos tecidos (LT50) em condições de congelamento. O modelo foi selecionado após considerar a

significância dos coeficientes, a simplicidade de aplicação e a generalização para todas as variedades e etapas de avaliação.

Os efeitos do congelamento nas células podem ser devastadores, levando à desnaturação proteica e impedindo as funções biológicas essenciais das plantas (CHARRIER et al., 2015). Após a exposição a temperaturas negativas, as espécies florestais apresentam uma série de respostas adaptativas, incluindo inibição da fotossíntese, redução das taxas respiratórias, translocação mais lenta de carboidratos, inibição da síntese de proteínas, aumento na produção de antocianinas, alterações nos níveis de pigmentos e ativação do sistema antioxidante, demonstrando a complexidade das adaptações ao estresse por geada (CLOSE, BEADLE, BATTAGLIA, 2004; FLORIANI, 2011; FLORIANI, 2013; OBERSCHELP et al., 2020).

A resistência ao congelamento em plantas envolve mecanismos como a tolerância à formação de gelo extracelular, seja por desidratação celular intensa ou por prevenção do congelamento através do super resfriamento. Proteções adicionais incluem o acúmulo de osmoprotetores como açúcares e aminoácidos, que ajudam a regular o potencial osmótico e a retenção de água celular (PRAMSOHLER; NEUNER, 2013). As plantas também desenvolvem sistemas antioxidantes eficientes, que incluem componentes enzimáticos como superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase e catalase (CAT), e antioxidantes não enzimáticos como ácido ascórbico, glutathione reduzida, carotenóides, flavonóides e fenólicos (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014).

2.5. ESPÉCIES FLORESTAIS E O FENOMENO METEOROLÓGICO GEADA

A sobrevivência e distribuição das plantas são frequentemente condicionadas pela resistência e ou tolerância ao evento de geada (CHARRIER, 2015). A resposta ecofisiológica a geadas é um fator crucial que delimita a distribuição geográfica de espécies florestais e na composição dos ecossistemas (DALE et al., 2001; CHEN et al., 2014). Enquanto algumas espécies possuem resistência natural ao frio, outras são altamente suscetíveis, uma variabilidade

que pode ser condicionada por uma combinação de condições climáticas, fatores genéticos e por mecanismos fisiológicos específicos adotados pelas espécies durante e após eventos de geada (RAMMIG, 2013; LIU et al., 2014; KASUGA et al., 2007; OBERSCHELP et al., 2020).

As plantas de regiões temperadas mostram mudanças em sua resistência à temperatura de congelamento conforme a sazonalidade. O conhecimento das temperaturas letais para as diferentes espécies arbóreas possibilita um zoneamento adequado, minimiza os riscos aos prejuízos e otimiza a produtividade (CHARRIER, 2015). Os trabalhos que investigam a resistência a geadas em campo, no geral, apresentam baixa descrição dos dados climáticos, muitas vezes há imprecisão acerca da temperatura mínima alcançada nas variações microclimáticas encontradas em campo. Devido as dificuldades logísticas e de custos, esses estudos avaliam apenas a taxa de sobrevivência e ou nível de dano as plantas, e a partir dessas informações julgam como resistentes e ou tolerantes as que conseguem sobreviver ao evento com pouco ou nenhum dano aparente.

Higa (2000) aplicou uma metodologia de avaliação de nível de dano visual em progênies de *E. dunnii* em condições de campo e determinou a partir de uma nota que variava de 0 (100% do fuste danificado) a 10 (sem nenhum dano visual), neste estudo o autor concluiu que a geada não afetou a sobrevivência das progênies de *E. dunnii*, mas prejudicou o crescimento em altura da maioria das plantas e causou níveis variados de danos, em todas as plantas do experimento. Estudo com 20 espécies de eucalipto avaliara a porcentagem de sobrevivência e verificaram que as espécies mais resistentes foram; *E. macarthurii* (94.95 %), *E. camaldulensis* (87.38 %), *E. daenei* (85.63%) *E. nova-anglica* (85.23 %) e *E. viminalis* (78.33 %) e *E. dunnii* (70.0 %) (HIGA, 1997).

Um estudo acerca da resistência de espécies arbóreas submetidas a extremos climáticos de geada em diferentes sistemas agroflorestais, concluiu que *Inga uruguensis* e *Inga sessilis* apresentaram tolerância à geada. A espécie tucaneira (*Citharexylum myrianthum*) apresentou pouca tolerância à geada, porém mostrou alta taxa de rebrota. As espécies corticeiras (*Erythrina falcata*), olandi (*Calophyllum brasilienses*) e licurana (*Hieronyma alchorneoides*)

apresentaram alta mortalidade em razão da geada, não se mostrando indicadas para compor SAF em regiões sujeitas a geadas (VIEIRA, 2003).

Em pesquisa desenvolvida com o objetivo de avaliar a sobrevivência e os níveis de danos de espécies florestais após ocorrências de geadas, pesquisadores consideraram a espécie *Mimosa scabrella* como resistente e as espécies *Eucalyptus grandis* e *Ateleia glazioviana*, demonstraram-se tolerantes. A *Acacia mearnsii* apresenta ser de moderadamente tolerante a tolerante (CARON, 2011).

Em uma outra perspectiva, tem crescido o número de pesquisas em laboratório, com rigoroso controle das variáveis climáticas, que se destinam a determinar as temperaturas letais (limite inferior) em espécies florestais. Entre as avaliações mais comuns para determinação do limite inferior temos a avaliação da temperatura letal em que ocorre 50% da mortalidade celular (FLORIANI, 2011; FLORIANI, 2013), outros correlacionam o aumento da temperatura letal com os mecanismos ecofisiológicos adotados (EL KAYAL et al., 2006; OBERSCHELP et al., 2020). De modo geral, esses trabalhos apresentaram valores de tolerância do eucalipto a geada a temperaturas entre -2 e -5.

Há espécies do gênero *Eucalyptus* adaptadas em toda a extensão territorial do Brasil, como *Eucalyptus grandis*, *E. saligna* e *E. urophylla*, porém estão sujeitas aos danos causados pela geada (GOLFARI et al., 1978). De acordo com Higa et al. (1997), muitas espécies do gênero *Eucalyptus* crescem naturalmente em regiões de geadas intensas. No entanto, poucas espécies deste gênero são indicadas para plantios em regiões susceptíveis às geadas no Brasil. Esse comportamento deve-se ao fato de a temperatura nas áreas de ocorrência natural das espécies diminuir gradativamente no frio, permitindo a sua adequação fisiológica a condição de estresse térmico, em contraste ao observado em áreas de altitude das Regiões Sul e Sudeste do Brasil, onde as temperaturas caem abruptamente, não havendo tempo para aclimação das plantas às geadas.

Assim, para estabelecer plantios de eucalipto em região subtropical altamente produtiva, a escolha da espécie aclimatada a essas regiões é um

dos principais itens a serem analisados (HIGA *et al.*, 2000; GONÇALVES *et al.*, 2013), e, o entendimento dos fatores que influenciam as respostas ecofisiológicas dos plantios de eucalipto pode, dessa forma, ajudar no planejamento e localização dos plantios e na seleção de genótipos mais tolerantes.

2.6. INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA À GEADA E MEMÓRIA DE ACLIMATAÇÃO AO FRIO

Em regiões que possuem uma sazonalidade marcante, normalmente as árvores vivenciam no outono uma exposição prévia a temperaturas frias (não congelantes), essa exposição gera a hibernação dos tecidos, o processo favorece a resistência a temperaturas negativas (geadas) que ocorrem no inverno subsequente (PEARCE, 2001). Deste modo, a tolerância a geada pode ser considerada uma característica induzida dada a aclimatação ao resfriamento prévio das plantas (WARREN *et al.*, 2009). Essa aclimatação é realizada a partir da ativação de uma complexa rede de mecanismos que culminam na maior resistência das plantas ao congelamento (WELLING; PALVA, 2006). Nem todas as espécies são capazes de exibir aumento de tolerância ao frio em resposta à aclimatação (MORAGA *et al.*, 2006).

Pesquisas recentes, de cunho molecular e genômico sugerem que espécies herbáceas anuais e lenhosas perenes, possuem mecanismos semelhantes de aclimatação ao frio, os estudos revelam que a diminuição gradual da temperatura leva à ativação de processos de sinalização semelhantes e à expressão de genes-alvo ortólogos em herbáceas e lenhosas (PEARCE, 2001). Todavia, o número de estudos que elucidam a regulação molecular da aclimatação ao frio de plantas lenhosas ainda é minúsculo em comparação com o de plantas herbáceas, o fato se dá principalmente o longo ciclo de desenvolvimento dessas espécies (WANG, 2024).

Baseando-se no fatos anteriormente descritos, nos últimos anos tem crescido o número de trabalhos que investigam como as plantas expostas a um curto período de temperaturas baixas, mas não congelantes (frio), realizam as

regulações fisiológicas, metabólicas e moleculares para aumentar a sua tolerância ao congelamento (geada), esse processo é chamado de aclimação ao frio, através dele pesquisadores tem buscado induzir em espécies florestais uma maior tolerância ao congelamento (EL KAYAL et al., 2006; FLORIANI, 2011; FLORIANI, 2013; DING et al, 2019; OBERSCHELP et al., 2020).

Em estudo com *E. dunnii*, Paludzyszyn Filho e Santos (2005) observaram que, sob condições de aclimação prévia, essa espécie pode ser utilizada para plantios em regiões com temperaturas mínimas absolutas de até -5°C. Outro estudo com *Eucalyptus dunnii*, verificou que a espécie apresentou aumento na sua tolerância ao congelamento, após 28 dias de exposição a temperatura de 5 -1 °C Dia/Noite. A maior tolerância a temperaturas congelantes foi fortemente relacionada à maior concentração foliar de carboidratos solúveis totais enquanto o teor foliar de prolina não contribui para o aumento da tolerância as temperaturas negativas (geadas) (FLORIANI, 2011).

Em estudo similar ao anterior FLORIANI (2013) também relatou efeito positivo da prévia exposição de quatro espécies de eucalipto ao resfriamento, a concentração foliar de carboidratos solúveis totais apresentou-se como um bom indicador de tolerância a temperaturas negativas, em contrapartida a concentração foliar de prolina apresentou correlação com a maior tolerância.

Oberschelp et al. (2020) destacaram o papel fundamental dos estímulos ambientais antes dos eventos de geada (exposição ao resfriamento), já que ensaios de laboratório, a exposição prolongada a temperaturas inferiores a 10°C melhorou a tolerância à geada em todas as espécies avaliadas (*Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus benthamii*). O estudo apontou que estratégia de tolerância à geada induzida pelo resfriamento prévio pode ser parcialmente baseada em produção de fotoprotetores e antioxidantes, em combinação com o acúmulo de vários metabólitos osmoticamente ativos. Os estudos de laboratório ainda são escassos, porém já apresentam resultados promissores para avançarmos na construção de uma metodologia que possibilite induzir maior tolerância a geada através da aclimação previa ao frio.

Estudos realizados para analisar a expressão gênica de clones de eucalipto, após uma curta exposição a diferentes condições ambientais ou ao a

um programa de aclimação ao frio de duas etapas (curta ou longa exposição), notaram que durante a fase de aclimação, o fotoperíodo curto afetou positivamente a tolerância ao congelamento (EL KAYAL et al., 2006).

A memória de aclimação ao frio em *Eucalyptus* refere-se à capacidade das plantas de se adaptarem e reagirem de forma mais eficaz a eventos de estresse térmico após exposição prévia a condições de frio (FLORIANI, 2011; FLORIANI, 2013; OBERSCHELP et al., 2020). A memória de aclimação pode persistir e influenciar significativamente as respostas fisiológicas das plantas. Por exemplo, uma pesquisa mostrou que o *Eucalyptus nitens* exibe melhorias na tolerância ao frio após aclimação inicial, com alterações na expressão gênica e na atividade de enzimas antioxidantes, que são mantidas por um período considerável após o estresse inicial (WARREN et al., 2009). Os estudos supracitados elucidam a importância da memória de aclimação ao frio em *Eucalyptus* e suas implicações nas respostas fisiológicas das plantas a eventos futuros de geadas.

Sob uma outra perspectiva, alguns poucos estudos sugerem a existência de uma memória ecológica de estresse por geada, desde que as plantas experimentem o primeiro evento de geada, e não apenas uma aclimação prévia ao frio (TAHKOKORPI et al., 2007; KNIGHT et al., 1996). Emerge-se a necessidade de investigar como estresse prévios podem induzir uma maior tolerância as plantas e serem determinante na sobrevivência ao estresse por geada subsequente, ainda conhecer por quanto tempo pode perdurar a memória adquirida .

3. METODOLOGIA

3.1. Local do estudo

Foram conduzido dois estudos ambos no Laboratório de Meteorologia e Ecofisiologia Florestal (LMEF) do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, localizada no município de Jerônimo Monteiro – ES (latitude 20°47'25" S e longitude 41°23'48" W, altitude média de 120 m).

3.2. Material vegetal e condições de cultivo

Mudas clonais de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, *E. saligna*, *E. dunnii* e *E. benthamii* com idade aproximada de 90 dias, procedentes do viveiro da empresa “Klabin”, localizado no Paraná, foram adquiridas em tubetes (55 cm³) e posteriormente transferidas para vasos de 12 litros, com furos circulares na parte inferior para permitir a aeração das raízes e drenagem do excesso de água. Foi utilizado substrato comercial (VIVATO) fertilizado com 100 gramas de Osmocot® (19-06-10, fertilizante com tempo de liberação em torno de quatro a seis meses) para cada 25 kg do substrato.

As mudas permaneceram durante 70 dias em casa de vegetação (60 m²) com sombrite 50% para protegê-las da radiação direta e ambiente controlado. A temperatura máxima diurna na casa de vegetação foi de 27°C e a temperatura mínima noturna foi de 12°C. A fim de alcançar as temperaturas mais baixas, o sistema de refrigeração das casas de vegetação foi acionado a partir das 18:00 horas e desligado às sete horas da manhã. No período diurno, a temperatura foi controlada pela exaustão do ar quente. Assim, os ambientes alcançaram as temperaturas mais altas durante o dia e mais baixas durante a noite, na tentativa de reproduzir o curso diário da temperatura de ambientes do Sul do Brasil, no período de produção de mudas para plantios antes do inverno. As temperaturas foram determinadas a partir de estudo prévio dos dados climáticos, utilizando a

média dos três meses mais frios do Sul do país, dados do Instituto nacional de meteorologia, para Irati no Paraná (INMET).

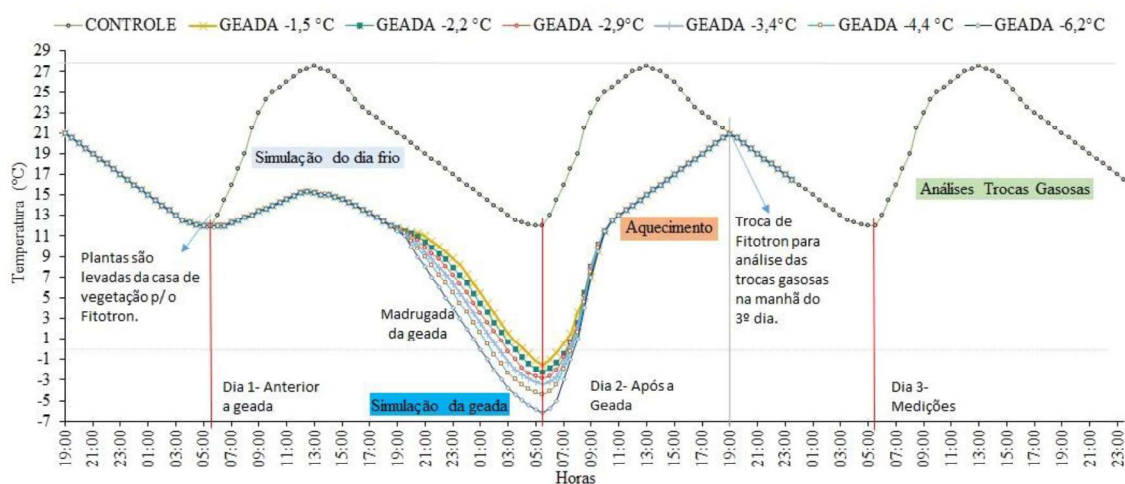
A caracterização microclimática das casas de vegetação foi realizada a partir da instalação de uma estação meteorológica automática, com sensores de temperatura e umidade relativa do ar (Vaisala, modelo CS500). Os dados da estação foram coletados com leituras de dados a cada dez segundos e armazenamento dos valores médios a cada cinco minutos em datalogger (Campbell Scientific Inc, CR-10x).

O manejo de irrigação foi realizado diariamente, ao final do dia, mantendo o substrato com a umidade próxima a capacidade de campo.

3.3. ENSAIOS EM CÂMARA CLIMATIZADA

Para simulação de geadas foram utilizadas câmaras climatizadas tipo “Fitotron” (Modelo EI 011, Marca Eletrolab), com área individual de 6m², com controle de fotoperíodo, regime de radiação, temperatura, umidade relativa e CO₂ atmosférico. As condições meteorológicas dentro das câmaras climatizadas foram monitoradas por sensores integrados ao sistema de controle do Fitotron. A intensidade luminosa foi regulada para criar uma curva similar a variação diurna da radiação. O fotoperíodo estabelecido foi de 10 horas, com a umidade relativa mantida entre 60 e 70%, e a concentração de CO₂ ajustada para aproximadamente 450 ppm.

A imposição dos tratamentos e a avaliação imediata dos seus efeitos foram dividida em três etapas/dias: dia frio, simulação de geada e dia após geada (Figura 2). O tratamento foi iniciado simulando a entrada de massa ar frio por volta das 19 horas. Essas primeiras 24 horas foram intituladas dia “pré-geada” (dia frio), com temperatura variando entre 21°C e 12°C dia/noite. Às 19 horas do dia seguinte, foi iniciada a queda de temperatura. As temperaturas mínimas eram alcançadas entre 5:00 e 6:00 da manhã. Para a descrição de cada tratamento foi utilizada a média da hora mais fria, ocorrida no dia da simulação as geadas: -1,5, -2,2, -2,9, -3,4, -4,4 e -6,2 °C.



Fonte: A autora.

Figura 2 - Gráfico da curva de temperatura aplicada em cada um dos tratamentos no ensaio realizado em câmara fria do tipo fitotron no Departamento de Ciências Florestais e da Madeira em Jerônimo Monteiro- ES.

Por volta das 5:30h da manhã do dia da simulação da geada, foram realizadas as coletas de folhas para análise de condutividade elétrica a fim de quantificar o extravasamento de eletrólitos. Posteriormente, foi iniciado o aquecimento, voltando ao curso diário normal (12°C – 21°C). Na figura 3, é apresentado o esquema metodológico do estudo.

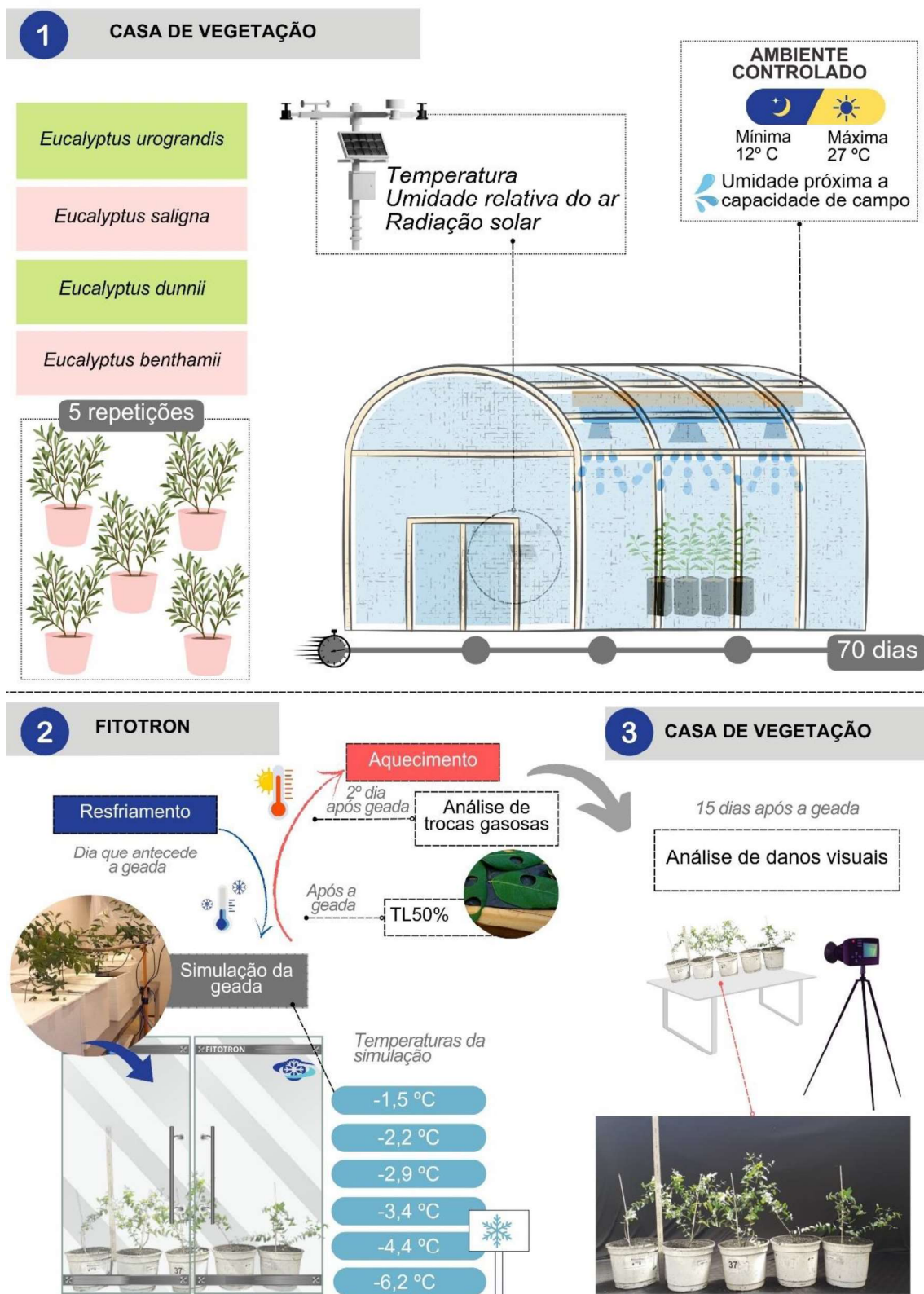


Figura 3: Esquema metodológico do estudo I com plantas de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, *E. saligna*, *E. dunnii* e *E. benthamii* sob geada no ensaio realizado no Departamento de Ciências Florestais e da Madeira em Jerônimo Monteiro- ES.

3.4. ESTUDO DE ACLIMATAÇÃO E DURAÇÃO DA MEMÓRIA DE ACLIMATAÇÃO

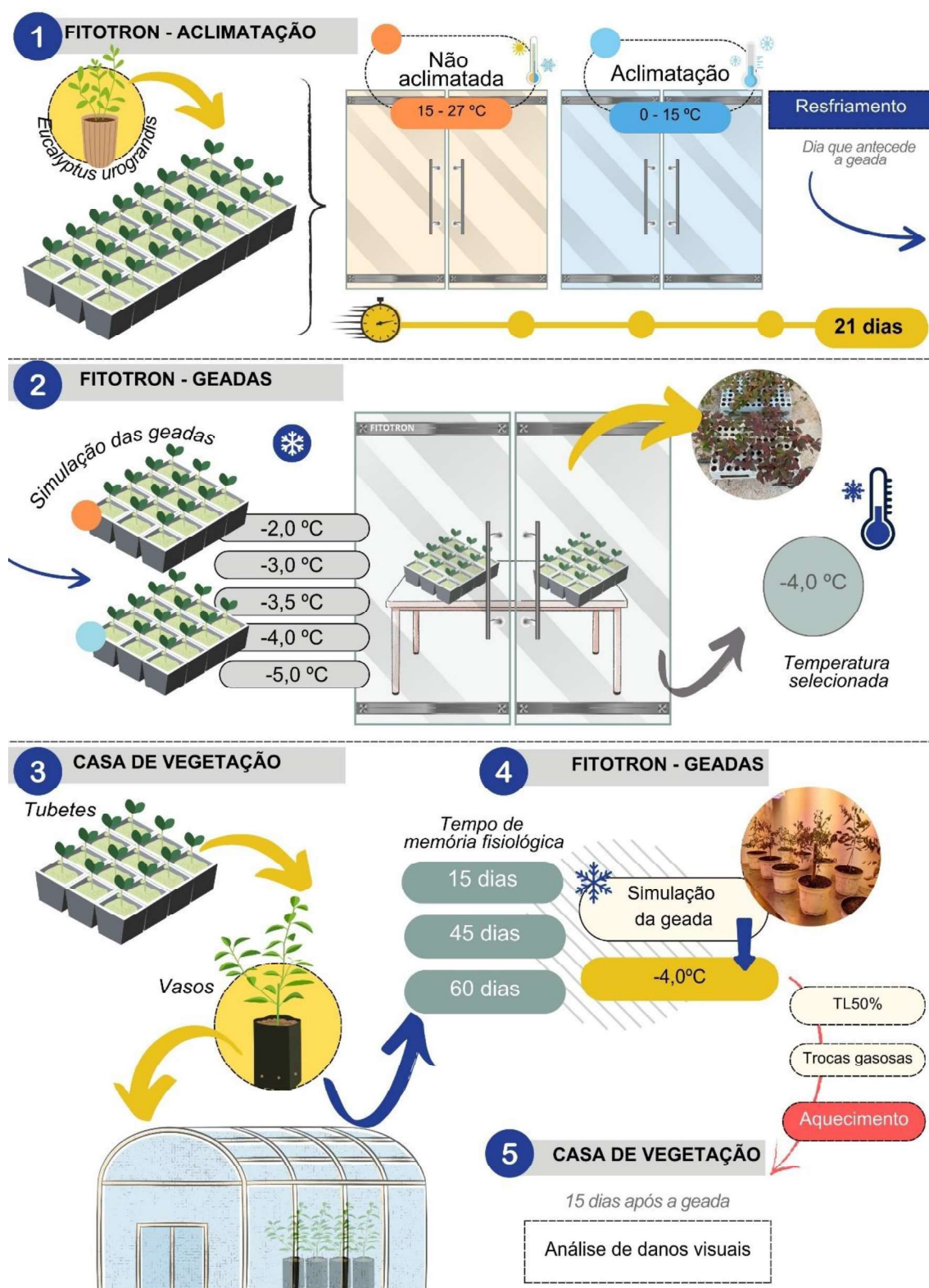
Mudas clonais do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, com idade aproximada de 90 dias, foram adquiridas em tubetes (55 cm³). Dois tratamentos foram aplicados por 21 dias em câmara climatizada tipo “Fitotron”. O primeiro lote de mudas foi submetido a baixas temperaturas (entre 5°C e 15°C), a fim de promover a aclimação ao frio. Um outro lote controle (sem aclimação ao frio) foi submetido a temperaturas entre 15°C e 25°C, foto período de 10 horas, radiação PAR max no interior da câmara de aproximadamente 800 µmol.m⁻².

Após a aclimação no fitotron, as mudas foram transferidas para vasos de 12 litros, com furos circulares na parte inferior para permitir a aeração das raízes e lixiviação do excesso de água. O substrato comercial utilizado foi fertilizado com Osmocot ® (19-06-10, fertilizante com tempo de liberação de seis meses), sendo 100g para cada 25 kg do substrato. As mudas foram divididas em três lotes de plantas, que permaneceram na casa de vegetação por períodos de 15, 45 e 60 dias respectivamente, para posterior simulação de geada. A irrigação foi realizada diariamente, mantendo o substrato com a umidade próxima a capacidade de campo.

Na casa de vegetação a temperatura máxima diurna foi de 27°C e temperatura mínima noturna de 12°C. A caracterização microclimática do período foi realizada com aquisição de dados a partir de uma estação meteorológica, com sensores de temperatura e umidade relativa do ar (Vaisala, modelo CS500). Os dados da estação foram coletados a partir de um datalogger (Campbell Scientific Inc, CR-10x), com leituras de dados a cada dez segundos e armazenamento dos valores médios a cada cinco minutos.

Para identificar a eficiência do período de aclimação sob capacidade de tolerância do híbrido, mudas dos dois grupos de aclimação, ainda no tubete, foram submetidas a geadas com temperaturas de -2,0; -3,0; -3,4; -4,0 e -5,0°C. A partir dos resultados desse primeiro ensaio, a geada de -4,0°C foi selecionada para ser aplicada após período de tempo (15, 45 e 60 dias), enquanto aguardavam o período as plantas permaneceram na casa de vegetação. A temperatura -4,0 °C foi selecionada por evidenciar as diferenças de tolerância

entre plantas aclimatadas e não aclimatadas, conforme esquema metodológico ilustrado na Figura 4.



Fonte: A autora.

Figura 4: Esquema metodológico do estudo II com plantas de *Eucalyptus urophylla*, ensaio realizado com objetivo de determinar a duração da memória de aclimação na espécie no Departamento de Ciências Florestais e da Madeira em Jerônimo Monteiro-ES.

Após os períodos (15, 45 e 60 dias) na casa de vegetação, as mudas de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* eram transferidas para o Fitotron. A intensidade luminosa nas câmaras foi ajustada formando uma curva de densidade de fluxo de fótons, afim de simular a variação diária de inverno no Sul do país, com radiação par flutuando de 0 a 700 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ aproximadamente. O fotoperíodo no interior da câmara foi de 10 horas, a umidade relativa do ar variando entre 60 e 70% e os níveis de CO_2 foi de aproximadamente 450 ppm.

Durante 24 horas, as mudas permaneceram nas mesmas condições de temperatura da casa de vegetação com máxima diária de 25°C e mínima de 10°C (dia anterior a geada), após esse período foi aplicada a geada com a queda de temperatura iniciando as 19:00 horas, ao qual a temperatura mínima foi alcançada por volta das 4:30 horas da manhã seguinte. Logo após a hora de temperatura mais baixa, foram obtidas as imagens térmicas com câmara termográfica e realizada a coleta de folhas para análise de extravasamento de eletrólitos. No segundo dia, após a geada foram realizadas análises de trocas gasosas. A metodologia utilizada nas análises supracitadas, em ambos os experimentos, foi realizada seguindo as metodologias descrita a seguir.

3.5. Extravasamento de Eletrólitos

Seguindo a proposta de Lima et al. (2002), a medida de condutividade elétrica foi realizada em cada tratamento nas espécies estudadas. Foram utilizadas três folhas totalmente expandidas coletadas no terço superior da planta, para essa determinação foram retirados seis discos com 01 cm de diâmetro em cada folha sem atingir a nervura principal. A coleta da folha foi realizada logo após a geada, na hora mais fria de cada tratamento. Posteriormente, os discos foram colocados em frascos de vidro com 8 mL de água destilada e deixado em repouso por 6h, em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a leitura da condutividade elétrica (CE inicial) com

condutivímetro (LAB 1000). Após essa leitura, as amostras foram levadas a estufa a uma temperatura de 90°C por 2 h. Depois da amostra alcançar a temperatura ambiente foi realizada a nova leitura da condutividade elétrica (CE final). Através dos valores de CE inicial e CE final, foi calculado o extravasamento de eletrólitos (EE) através da fórmula

$$EE = (CE \text{ inicial} / CE \text{ final}) \times 100 \quad (1)$$

A TL₅₀ (temperatura letal, onde ocorre 50% da condutividade elétrica máxima).

3.6. Trocas gasosas

As análises de trocas gasosas foram realizadas utilizando um analisador de gases a infravermelho (modelo LI-6400XT LI-COR, Inc., NE, USA), com a fonte de luz acoplada à câmara de medida e injeção de CO₂. A concentração de CO₂ no interior da câmara foi fixada em 400 ppm, a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo foi de 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e o fluxo de ar de 500 mL.min⁻¹. As medições de trocas gasosas foram realizadas em folhas totalmente expandidas do terço apical superior da planta, aproximadamente 28 horas após a simulação da geada, ou seja, as 9:00 da manhã do dia seguinte a geada. As variáveis medidas foram: assimilação líquida de CO₂ (A), condutância estomática (gs), transpiração (E) e concentração intercelular de CO₂ (Ci). A leitura foi realizada em uma folha totalmente expandida no terço médio superior da planta, em cinco plantas de cada tratamento.

3.7. Compostos fenólicos, antocianinas e flavonoides

Os extratos para as determinações dos compostos fenólicos, antocianinas, flavonoides, clorofilas e carotenoides totais foram obtidos a partir de 0,04 g de massa fresca foliar em homogeneização com etanol 95% (LICHTENTHALER E BUSCHMANN, 2001), e foram amostradas 5 plantas por tratamento. A determinação de compostos fenólicos foi feita usando reagente de Folin-Ciocalteu, segundo metodologia proposta por Singleton e Rossi (1965), com modificações. Foram utilizados 30 μL de extrato etanólico com 750 μL de água

destilada e 120 µL de reagente Folin-Ciocalteu. As amostras foram agitadas por 4 minutos. Em seguida foi adicionado 600 µL de Na₂CO₃ 15%, a mistura foi incubada a 25 °C, por 2 horas com posterior absorvência medida em espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Fisher Scientific, Finland) a 760 nm.

Os teores de antocianinas das folhas foram determinados de acordo com o método de Beggs e Wellmann (1994), com modificações. A reação no escuro foi realizada durante 24 horas, a 4 °C, com 1500 µL de extrato etanólico em 15,15 µL de HCl PA. A determinação da absorvência foi lida em 546 nm e o teor de antocianina foi expresso por grama de massa seca utilizada.

O teor de flavonoides foi estimado pelo método de Flint et al. (1985), com modificações. A reação colorimétrica foi realizada a partir da mistura de 150 µL de extrato etanólico, 30 µL cloreto de alumínio, 30 µL de acetato de potássio 1M e 1290 µL de água destilada. O volume final foi homogeneizado em 25 °C por 30 min e a leitura em 428 nm. O conteúdo de flavonoides totais foi expresso em absorvência por grama de massa seca.

3.8. Teores de açúcares solúveis totais

A quantificação de açúcares solúveis totais foliares foi realizada seguindo o método fenol-sulfúrico conforme Dubois et al. (1956). Para isso, foram utilizadas alíquota de 25 µL de extrato etanólico 95%, com 250 µL de água desionizada, 250 µL fenol 5% e 1250 µL de ácido sulfúrico PA. As leituras de absorvência foram realizadas em espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Fisher Scientific, Finland), a 490 nm.

3.9. Avaliação do Índice de Dano

Após o evento de geada as plantas permaneceram por 15 dias em casa de vegetação até a avaliação do índice de dano (ID), as condições climáticas neste período foram iguais a da fase inicial desenvolvimento. A avaliação de índice de dano foi realizada, com o uso de escala visual de 5 pontos para danos por

geadas nas folhas (escurecimento, secagem, morte do tecido vegetal), conforme Tabela 1. Esta análise foi realizada por 5 avaliadores e a nota que prevaleceu por tratamento foi a moda, ou seja, a nota que mais se repetiu.

Tabela 1 – Nota de Índice de Dano e respectiva porcentagem afetada. Onde: 1= nenhum dano; 2= 1-25% de área foliar danificada, 3= 25-50% de área foliar danificada, 4=50-75% de área foliar danificada e 5= 75-100% de área foliar danificada

Índice de dano	Porcentagem afetada
1	0
2	1-25%
3	26-50%
4	51-75%
5	76-100%

Fonte: A autora.

3.10. Delineamento experimental

3.10.1. Estudo de tolerância à geada

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. A variável nível de danos para cada tratamento foi calculada a moda das notas atribuídas pelos avaliadores. A moda é a nota que aparece com mais frequência, representando o valor mais comum das observações. Foi ajustada uma curva de regressão Modelo Logístico de 2 parâmetros (2P) para cada clone (*Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, *E. saligna*, *E. dunnii* e *E. benthamii*) e a Temperatura Letal (TL50%) foi estimada de acordo com cada modelo.

Cada equação representa uma curva sigmóide onde **y** é a taxa de mortalidade (%) e **x** é a temperatura em graus Celsius. Estes modelos são

utilizados para estimar a temperatura letal média (TL50), que é a temperatura onde 50% da população estudada é afetada, ou seja; morta pela geada. Os parâmetros **a** e **c** ajustam a inclinação e o deslocamento horizontal da curva, respectivamente, permitindo que o modelo se adeque aos dados experimentais de tolerância e resistência à geada de cada espécie. A equação geral do modelo é

$$y = \frac{100}{1 + a + \exp(-b * t)}$$

Onde:

- y é a taxa de mortalidade (%).
- t é a temperatura em graus Celsius.
- a e b são os parâmetros do modelo.
- 100 é o limite superior, indicando que a taxa de mortalidade varia de 0 a 100%.

As variáveis de trocas gasosas assimilação de CO₂ (A), condutância estomática (g_s), transpiração (e), concentração interna de CO₂ (C_i) e o extravasamento de eletrólitos, foram analisadas estatisticamente para determinar diferenças entre os tratamentos aplicados. Para cada variável, calculou-se a média dos valores obtidos em cada tratamento, acompanhada do respectivo desvio padrão.

Visando entender como a fisiologia e a bioquímica dessas plantas se comportaram após a geadas, gerou-se uma matriz de correlação com variáveis fisiológicas para espécies de *Eucalyptus* expostas a diferentes condições de temperatura de geada. Essa análise permite identificar quais variáveis estão mais relacionadas à tolerância ou suscetibilidade ao frio. A matriz de correlação foi gerada com objetivo de mensurar o impacto das temperaturas de geadas no nível de dano, nas trocas gasosas, e compreender se os conteúdos basais de pigmentos e açúcares se correlacionaram com uma maior tolerância em algum dos clones, a matriz ofereceu uma visão abrangente das respostas fisiológicas e de tolerância das plantas, elucidando quais estratégias que potencializam a resiliência dos clones as geadas.

A matriz de correlação é uma ferramenta estatística que demonstra as correlações entre diferentes variáveis, representadas tanto nas linhas quanto nas colunas da matriz. As variáveis temperatura, nível de dano, temperatura letal a 50% (tl50), fluorescência, assimilação de CO₂ (A), condutância estomática (gs), transpiração (e), concentração interna de CO₂ (Ci), açúcares solúveis totais (AST), antocianinas, flavonoides e fenóis foram correlacionadas e analisadas.

Esta metodologia permite analisar as interações entre as variáveis fisiológicas e metabólicas, facilitando a compreensão das estratégias dos clones ao estresse causado pelas geadas. Cada célula da matriz exibe o coeficiente de correlação, que pode variar de -1 a 1, indicando correlações negativas ou positivas, respectivamente. Correlações próximas a -1 ou 1 são fortes e significativas, enquanto valores próximos a zero indicam uma correlação fraca ou inexistente. As significâncias estatísticas das correlações são denotadas por asteriscos: * indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.01$, e *** indica $p < 0.001$, sugerindo a significância dos vínculos estatísticos entre as variáveis.

3.10.2. *Estudo de aclimação e duração da memória de aclimação*

O delineamento experimental adotado foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com dois grupos de plantas (aclimatadas e não aclimatadas) submetidos inicialmente a temperaturas de -2, -3, -3,5, -4 e -5°C para avaliar a tolerância térmica. Posteriormente, a memória de aclimação foi testada após 15, 45 e 60 dias, expondo as plantas a uma geada de -4°C, com 5 repetições por tratamento, uma planta por unidade experimental.

A variável "nível de dano" para cada tratamento foi calculada usando estatística clássica, especificamente a moda das notas atribuídas pelos avaliadores. A moda é a nota que aparece com mais frequência em um conjunto de dados, representando o valor mais comum das observações. Isso significa que, para cada tratamento, a nota que ocorreu com maior frequência entre as avaliações foi considerada o nível de danos predominante.

Os extravasamentos de eletrólitos, foram analisadas estatisticamente para

determinar diferenças entre os tratamentos aplicados. Para cada variável, calculou-se a média dos valores obtidos em cada tratamento, acompanhada do respectivo erro padrão.

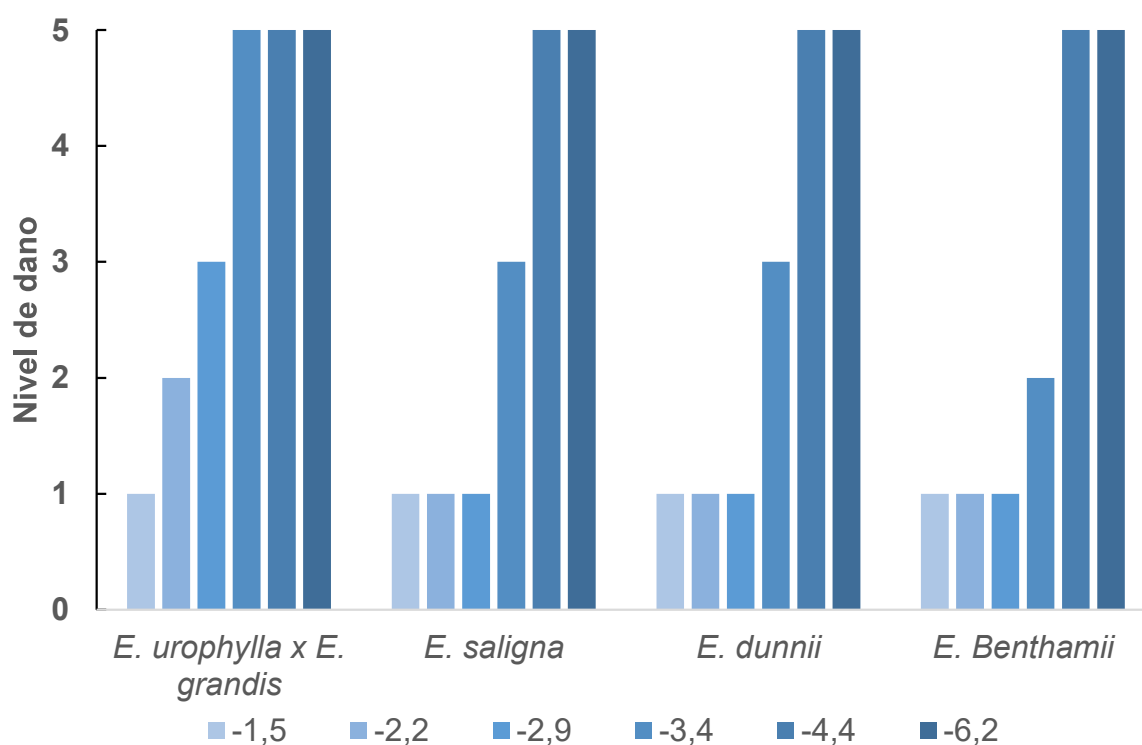
Para avaliar o impacto da aclimação nas trocas gasosas, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para cada um dos parâmetros fisiológicos medidos. A ANOVA permitiu determinar se havia diferenças significativas entre as plantas aclimatadas e não aclimatadas nas diferentes temperaturas de geada (-2°C , -3°C , $-3,5^{\circ}\text{C}$, -4°C e -5°C). Os resultados das ANOVAs foram seguidos por testes de comparação de médias com a aplicação de asteriscos para indicar a significância estatística: ***: $p < 0.001$ (Altamente significativo); **: $p < 0.01$ (Muito significativo); *: $p < 0.05$ (Significativo); ns: $p \geq 0.05$ (Não significativo).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. ESTUDO DE TOLERÂNCIA À GEADA

As geadas aplicadas induziram diferentes níveis de danos em *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, *E. saligna*, *E. dunnii* e *E. benthamii*, conforme evidenciado pelos resultados ilustrados na Figura 5. No gráfico são destacadas as diferenças na tolerância ao frio entre os clones, sendo especialmente útil para entender quais espécies apresentam maior resiliência e potencial para uso em regiões com risco de geada.

Fonte: A autora.



Fonte: A autora.

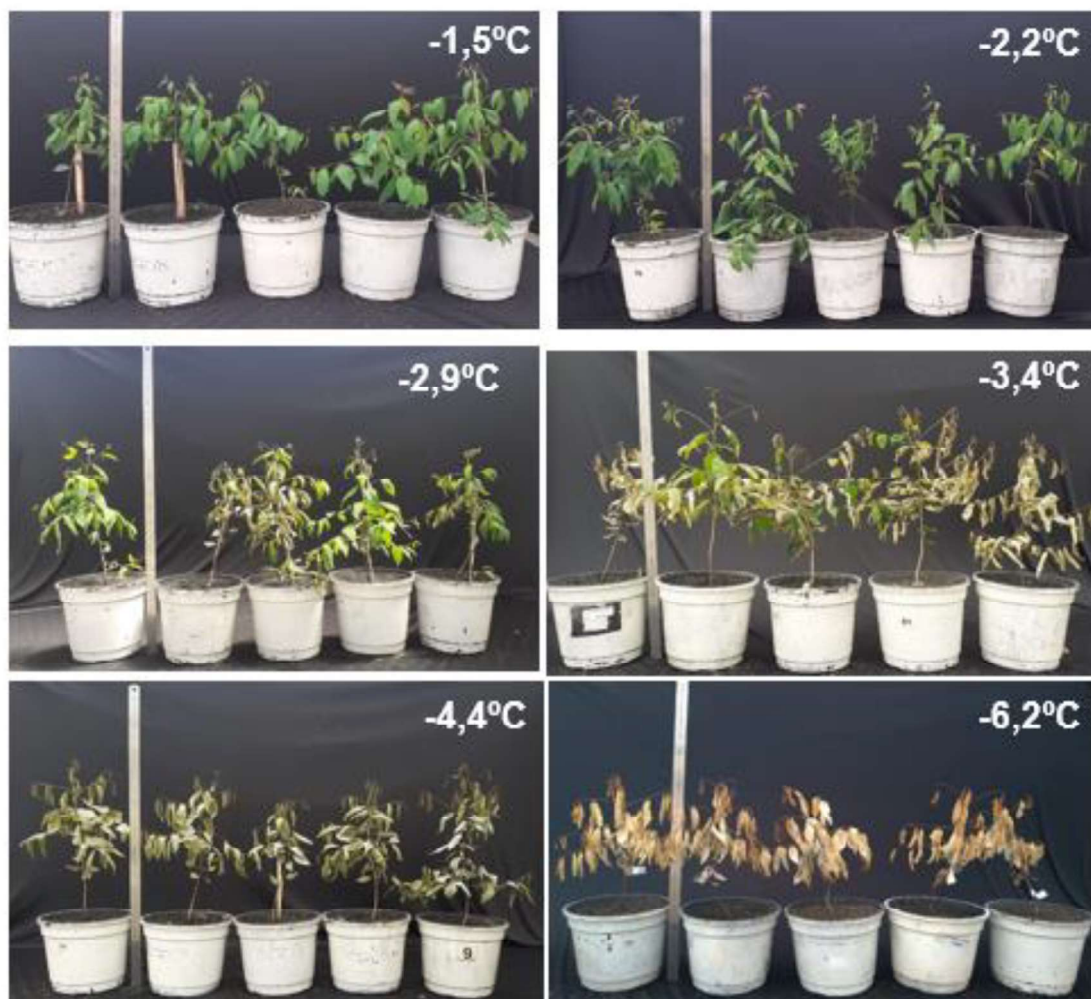
Figura 5: Nível de dano visual em *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, *E. saligna*, *E. dunnii* e *E. benthamii* avaliado 15 dias após a aplicação de tratamentos de geada nas temperaturas de -1,5, -2,2, -2,9, -3,4, -4,4 e -6,2 °C. Os níveis de dano são determinados pela moda das notas de cinco avaliadores. As notas variam em uma escala de 1 a 5, correspondendo ao percentual de dano visível na planta: 1 indica 0% de dano (sem dano

visível), 2 indica 1-25% de dano, 3 indica 26-50% de dano, 4 indica 51-75% de dano, e 5 indica 76-100% de dano.

O híbrido *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* mostrou-se particularmente vulnerável a geada. Os primeiros sinais visíveis de danos ocorreram quando exposto a uma temperatura de -2,2°C, alcançando nível de dano 2. O nível de dano aumentou rapidamente, com cerca de 50% do tecido vegetal afetado logo em -2,9°C. Por outro lado, os resultados indicam que o clone *E. benthamii* demonstrou o menor nível de dano nas geadas, sugerindo uma maior tolerância à geada quando comparado aos outros clones. Os clones de *E. saligna* e *E. dunnii* exibiram padrões de dano similares entre si, com uma tolerância intermediária entre *E. benthamii* e *E. urophylla* x *E. grandis*.

As influências que determinam o grau de dano causado por geadas em *Eucalyptus* são complexas e relacionadas a uma série de fatores. Entre esses fatores, destaca-se, principalmente, aqueles intrínsecos à espécie, como a rusticidade da planta e a capacidade bioquímica de evitar a nucleação do gelo no espaço intracelular (HIGA, 2000; LESLIE; MENCUCCINI; PERKS, 2014; DA ROS et al., 2018).

Observando as imagens fotográficas registradas das plantas dos clones estudados, é possível visualizar as evidências apontadas no gráfico de nível de dano ocorrido, para cada temperatura de geada avaliada. Os resultados apresentados na Figura 6 destacam a rápida progressão do dano na parte aérea do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, ilustrando sua baixa tolerância intrínseca às condições de geada.



Fonte: A autora.

Figura 6: Aspecto visual das plantas do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* 15 dias após a exposição a diferentes temperaturas de geada: -1,5°C, -2,2°C, -2,9°C, -3,4°C, -4,4°C, e -6,2°C. As imagens ilustram a progressão do dano visual nas plantas à medida que a intensidade da geada aumenta.

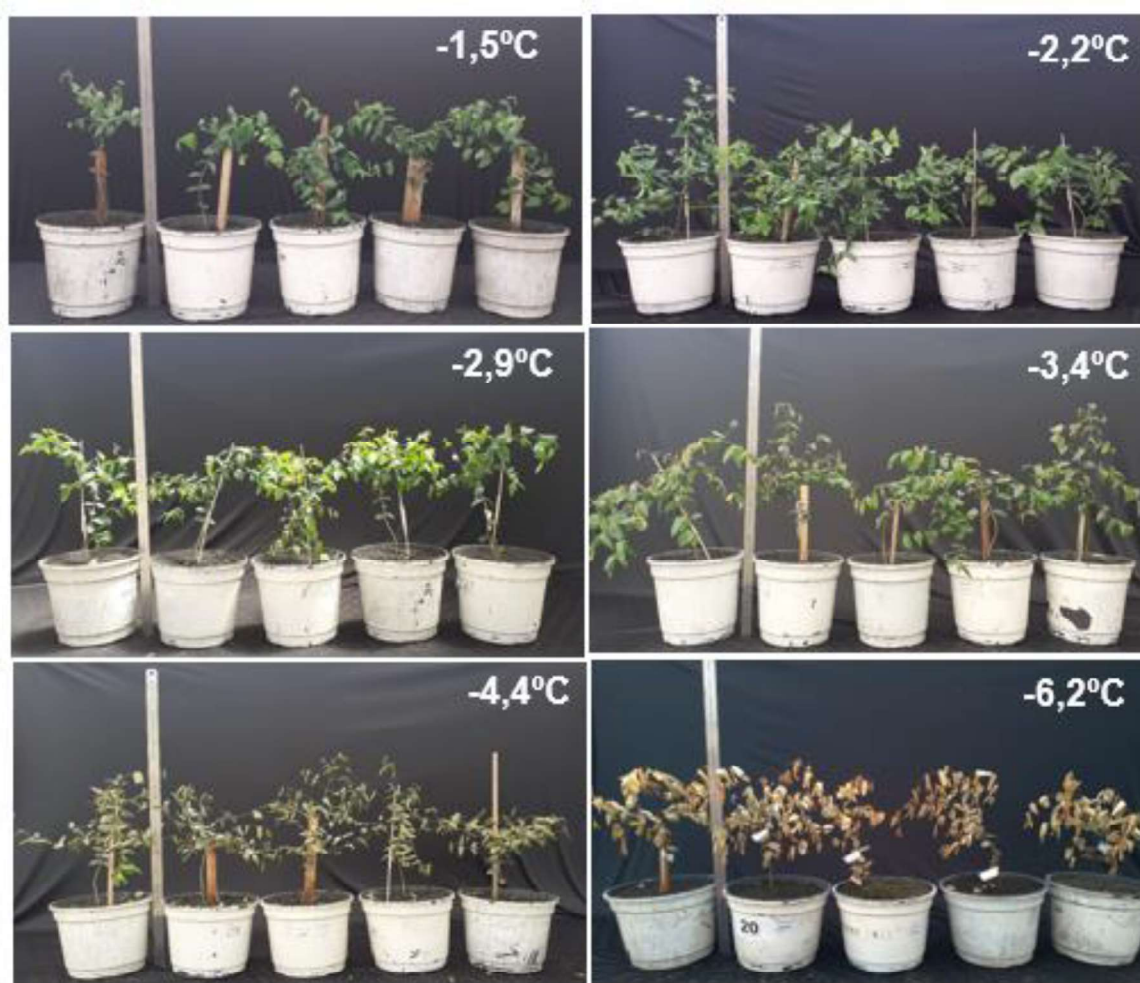
O *Eucalyptus Saligna* apresentou resposta intermediária de tolerância a geada, com tolerância moderada e danos aparente nas geadas de -3,6; -4,4 e -6,2°C (Figura 7). Esses resultados estão de acordo com o trabalho desenvolvido por Higa (1997), que detectou baixo potencial produtivo para a espécie em regiões de ocorrência de geadas severas. Sugere-se que o *Eucalyptus saligna* possui um limite moderado de tolerância ao frio, além do qual ocorre uma falha na proteção contra o congelamento.



Fonte: A autora.

Figura 7: Aspecto visual das plantas de *Eucalyptus Saligna* 15 dias após a exposição a diferentes temperaturas de geada: $-1,5^{\circ}\text{C}$, $-2,2^{\circ}\text{C}$, $-2,9^{\circ}\text{C}$, $-3,4^{\circ}\text{C}$, $-4,4^{\circ}\text{C}$, e $-6,2^{\circ}\text{C}$. As imagens ilustram a progressão do dano visual nas plantas à medida que a intensidade da geada aumenta.

De maneira semelhante ao clone *Eucalyptus saligna*, o *Eucalyptus dunnii* também mostrou tolerância moderada; no entanto, a $-3,4^{\circ}\text{C}$, os danos em *E. dunnii* foram ligeiramente menores do que os observados em *E. saligna* (Figura 8). Um estudo recente de Dai et al. (2023) investigou as respostas genéticas à sazonalidade do *Eucalyptus dunnii* e constatou que, ao contrário das árvores de zonas temperadas, esta espécie não desenvolveu mecanismos de resistência ao frio como a dormência para combater as geadas. No entanto, o *Eucalyptus dunnii* é considerado uma fonte genética promissora para o desenvolvimento de populações sintéticas ou genótipos modificados que sejam tolerantes à geada, de crescimento rápido e com alta qualidade de madeira (ASSIS; RESENDE, 2011; REZENDE et al., 2014)



Fonte: A autora.

Figura 8: Aspecto visual das plantas de *Eucalyptus Dunni* 15 dias após a exposição a diferentes temperaturas de geada: -1,5°C, -2,2°C, -2,9°C, -3,4°C, -4,4°C, e -6,2°C. As imagens ilustram a progressão do dano visual nas plantas à medida que a intensidade da geada aumenta.

Os clones de *Eucalyptus benthamii* mostraram a maior tolerância à geada entre as espécies estudadas, os níveis de dano que aumentaram gradualmente conforme a severidade da geada avança, os danos foram letais apenas em -6,2°C (Figura 9).



Fonte: A autora.

Figura 9: Aspecto visual das plantas de *Eucalyptus benthamii* 15 dias após a exposição a diferentes temperaturas de geada: -1,5°C, -2,2°C, -2,9°C, -3,4°C, -4,4°C, e -6,2°C. As imagens ilustram a progressão do dano visual nas plantas à medida que a intensidade da geada aumenta.

Os níveis de danos observados posicionam *Eucalyptus benthamii* como uma espécie promissora em regiões onde as temperaturas mínimas variam de -3,0 entre -6,0 °C, reforçando o potencial já apontado em outros estudos com a espécie (ARNOLD et al., 2015 ; BUTNOR et al., 2019 ; OBERSCHELP et al., 2020). Trabalhos desenvolvido em regiões de clima temperado chegam a relatar que árvores de *Eucalyptus benthamii*, cultivadas em condições de campo, podem tolerar geadas com temperaturas que variam -7 a -8°C sem danos permanentes (YU e GALLAGHER, 2015; HART et al., 2016). Essa maior tolerância do que encontrada no presente estudo pode ser atribuída principalmente à marcante sazonalidade dessas regiões, onde o resfriamento

progressivo durante o outono promove uma aclimação eficaz das plantas, preparando-as para enfrentar as condições mais severas de geada no inverno (WHITTLE et al., 2009).

Com base no trabalho desenvolvido por Rezaei e Rohan, 2023, aplicou-se o modelo Logístico de 2 parâmetros para modelar a TL50 em várias espécies de *Eucalyptus*: *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, *E. saligna*, *E. dunnii* e *E. benthamii*. Este modelo estimou a TL50, que representa a temperatura na qual ocorre 50% de mortalidade dos tecidos devido ao frio considerada uma temperatura letal as plantas, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 –Ajuste das regressões com Modelo Logístico de 2 parâmetros (2P) para cada espécie (*Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, *E. saligna*, *E. dunnii* e *E. benthamii*) e a Temperatura Letal (TL50%) estimada para cada um dos clones.

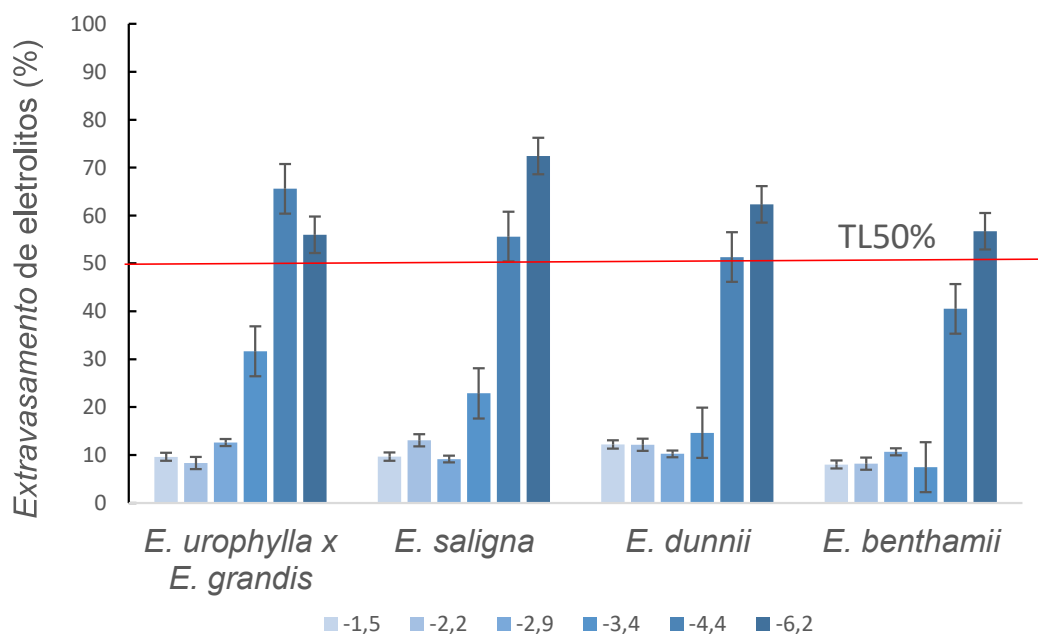
Espécie	Modelo logístico de 2P	Temperatura estimada para TL50% (°C)	RMSE
<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	$y = \frac{100}{1 + (-1,3422) \times e^{(-0,20567 \times t)}}$	-5,4	13,803
<i>Eucalyptus saligna</i>	$y = \frac{100}{1 + (-1,27203) \times e^{(-0,174588 \times t)}}$	-5,9	11,134
<i>Eucalyptus dunnii</i>	$y = \frac{100}{1 + (-1,27262) \times e^{(-0,171088 \times t)}}$	-6,1	10,786
<i>Eucalyptus benthamii</i>	$y = \frac{100}{1 + (-1,37641) \times e^{(-0,184494 \times t)}}$	-6,5	13,124

O modelo logístico empregado foi eficiente ao descrever as variações de tolerância ao frio entre as espécies estudadas, identificando o híbrido *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* como o mais susceptível e o *E. benthamii* como o mais tolerante. O modelo foi eficaz ao diferenciar as tolerâncias de cada um dos clones, particularmente entre o *Eucalyptus saligna* e o *Eucalyptus dunnii*. Este

último apresentou maior tolerância ao frio, com uma TL50 de $-6,0^{\circ}\text{C}$, um pouco maior do que identificado nos nossos testes.

Observa-se também uma tendência do modelo em superestimar a TL50 em todos os materiais genéticos avaliados, a superestimação da TL50 pelos modelos empregados é visualmente comprovada no gráfico apresentado na Figura 10, que exhibe o extravasamento de eletrólitos nos quatro clones de *Eucalyptus* submetidos a diferentes temperaturas de geada. Apesar da TL50 estimada ser abaixo de $-5,0^{\circ}\text{C}$ para todos os clones, na Figura 10, foi destacada a TL50, a temperatura na qual 50% dos tecidos das plantas são comprometidos, revelando que *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, *E. saligna* e *Eucalyptus dunnii* alcançam a TL50 por volta do tratamento de $-4,4^{\circ}\text{C}$.

Os dados apresentados confirmam a maior tolerância do *Eucalyptus benthamii* a geadas, com a menor temperatura estimada de TL50, esse resultado reafirma seu potencial de adaptação a condições de geada de moderadas a severas. Outros estudos evidenciam a robustez do *E. benthamii* em condições de baixa temperatura, destacando sua significativa tolerância ao frio e capacidade de aclimação (ARNOLD et al., 2015; BUTNOR et al., 2019; OBERSCHELP et al., 2020; OBERSCHELP et al., 2023).



Fonte: A autora.

Figura 10: Extravasamento de eletrólitos (%) em quatro clones de *Eucalyptus* submetidos a diferentes temperaturas de geada (-1,5 °C, -2,2 °C, -2,9 °C, -3,4 °C, -4,4 °C, e -6,2 °C). A linha vermelha indica a temperatura letal 50% (TL50), na qual 50% dos tecidos das plantas são danificados. As barras representam a média dos valores com seus respectivos desvios padrão das amostras representados pelas barras.

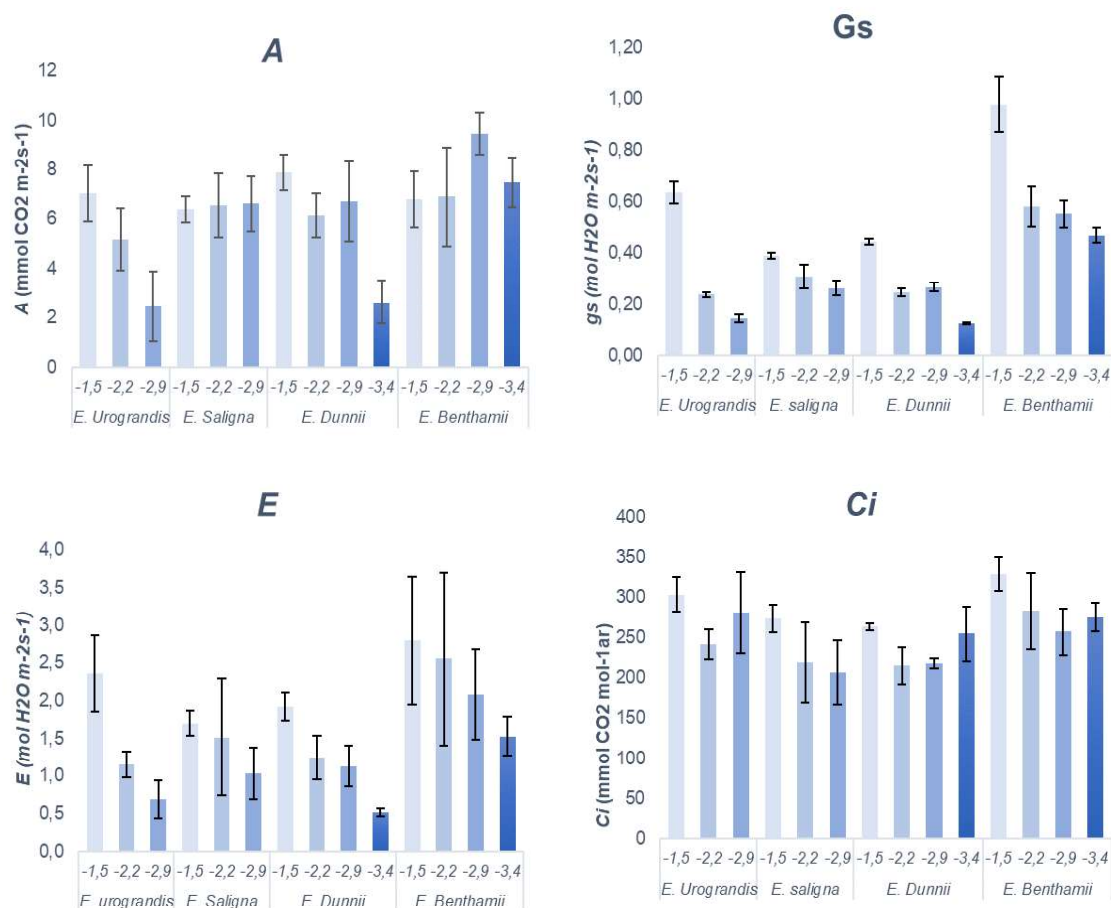
A maior tolerância basal de *E. benthamii* sugere uma predisposição intrínseca da espécie para suportar baixas temperaturas, o que de acordo com Oberschelp et al., 2023 é reforçado pela sua capacidade de responder positivamente ao frio através de processos de aclimação. Essa capacidade de aclimação pode ser atribuída a uma sensibilidade aprimorada ao frio que desencadeia respostas fisiológicas e bioquímicas robustas, como o acúmulo de solutos protetores e ajustes na membrana celular.

Tais respostas não apenas conferem a *E. benthamii* uma vantagem em sobreviver a eventos extremos de geada, mas também posicionam essa espécie como um candidato ideal para o cultivo em regiões com temperaturas mínimas temperatura de até -6,0 °C (ARNOLD et al., 2015; BUTNOR et al., 2019; OBERSCHELP et al., 2020; OBERSCHELP et al., 2023).

Para aprofundar nossa compreensão sobre o impacto das geadas nas variáveis fisiológicas das plantas, foram realizadas análises das trocas gasosas, que são variáveis particularmente sensíveis as condições climáticas adversas. A Figura 11 ilustra os resultados obtidos para os clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, *E. saligna*, *E. dunnii* e *E. benthamii*, com a média dos dados de assimilação de CO₂ (A), a condutância estomática (gs), a transpiração (E) e a concentração interna de CO₂ (Ci).

No presente estudo, *Eucalyptus benthamii* se destacou por sustentar taxas fotossintéticas mais elevadas mesmo posteriormente ao evento de geada, quando outros clones não mais apresentavam valores positivos de fotossíntese líquida. Este clone mostrou uma boa tolerância à geada, mantendo a fotossíntese ativa até -4,4°C. Tal capacidade é significativa, considerando que a maioria das espécies de eucalipto sofre uma redução drástica na fotossíntese quando expostas a temperaturas abaixo do ponto de congelamento, conforme relatado por Boorse et al. (1998). O impacto direto da temperatura sobre a fotossíntese tem sido bem discutido ao longo dos anos, onde a inibição do

metabolismo enzimático, especialmente das enzimas envolvidas no ciclo de Calvin, desempenha um papel crítico (BERRY & BJORKMAN, 1980).



Fonte: A autora.

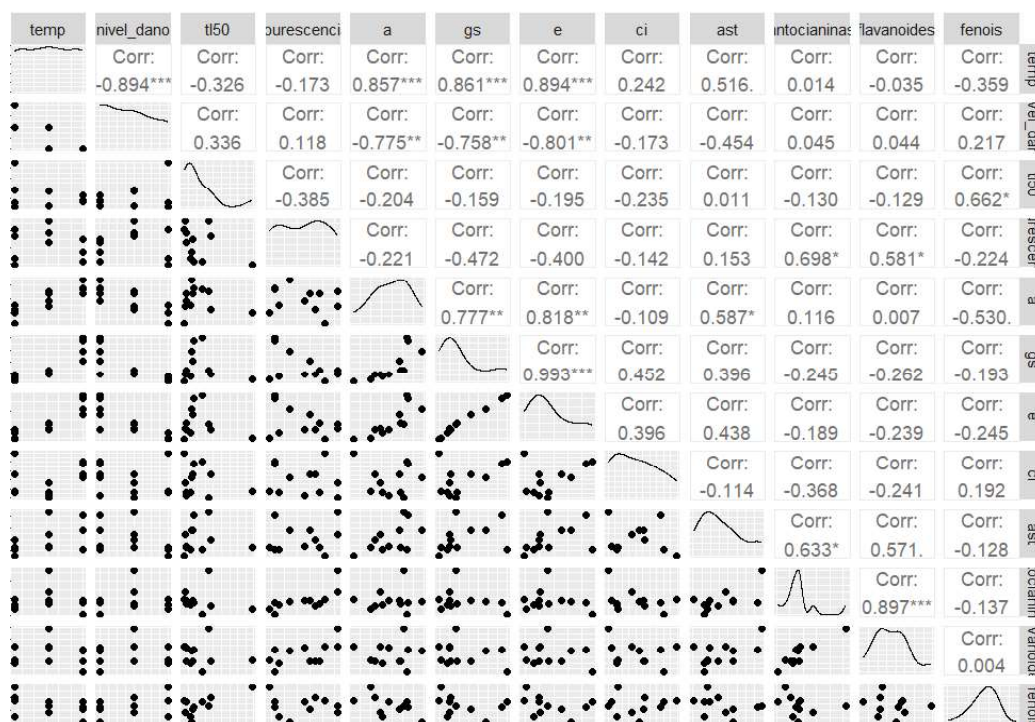
Figura 11: Respostas trocas gasosas de Espécies de Eucalypto a Diferentes Temperaturas de geada, onde *A* é assimilação de CO₂ em $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a *g_s* é a condutância estomática em $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a *E* é a transpiração em $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e a *Ci* é a concentração interna de CO₂ em $\mu\text{mol mol}^{-1}$, para os clones, *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, *E. saligna*, *E. dunnii* e *E. benthamii*, demonstrando como as trocas gasosas variam em função da intensidade da geada.

A condutância estomática, que se mostrou altamente variável entre as espécies estudadas, é determinante na capacidade de uma planta de manter trocas gasosas sob condições de estresse. *Eucalyptus benthamii* exibiu um controle estomático superior, ajustando-se para manter as trocas gasosas mesmo com a queda nas temperaturas. Esta resposta está alinhada com estudos que demonstram como o controle estomático eficiente pode mitigar os efeitos adversos da exposição ao frio, mantendo a fotossíntese e limitando o

dano ao aparelho fotossintético (FLEXAS et al., 2004). Por outro lado, o híbrido *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* mostrou uma diminuição significativa na g_s a $-2,2^{\circ}\text{C}$, comprometendo suas capacidades fotossintéticas e indicando uma susceptibilidade maior ao estresse por frio.

A capacidade de *Eucalyptus benthamii* em manter níveis relativamente estáveis de fotossíntese e transpiração em temperaturas baixas evidencia uma aclimação eficaz às condições de estresse térmico. Este comportamento é corroborado por estudos com espécies florestais de savana, como os realizados por De Antonio, Hoffmann e Rossatto (2021), que demonstram que espécies mais tolerantes à geada mantêm taxas fotossintéticas mesmo após eventos de geadas com temperaturas abaixo de 0°C . Além disso, essas espécies desenvolvem mecanismos bioquímicos que protegem as folhas contra o frio extremo e garantem um alto grau de proteção às gemas, reforçando a resistência ao congelamento.

A análise da matriz de correlação *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* revelou uma forte correlação negativa entre a temperatura e o nível de dano (Figura 12). Esta observação indica que temperaturas mais baixas estão associadas a danos mais acentuados, evidenciando mais uma vez a alta susceptibilidade deste material genético às condições de geada. Os resultados apontam para a suscetibilidade do híbrido, evidenciadas por correlações fortemente negativas entre a temperatura e os níveis de dano, além de uma diminuição significativa na fotossíntese e condutância estomática mesmo quando submetidos as geadas mais amenas, demonstrando a sua resposta fisiológica limitada a baixas temperaturas. A limitada tolerância ao frio observada pode ser atribuída à deficiência de mecanismos defensivos, particularmente pela inadequada concentração basal de carboidratos solúveis totais, essenciais para a resistência ao frio (WHITTLE et al., 2009).



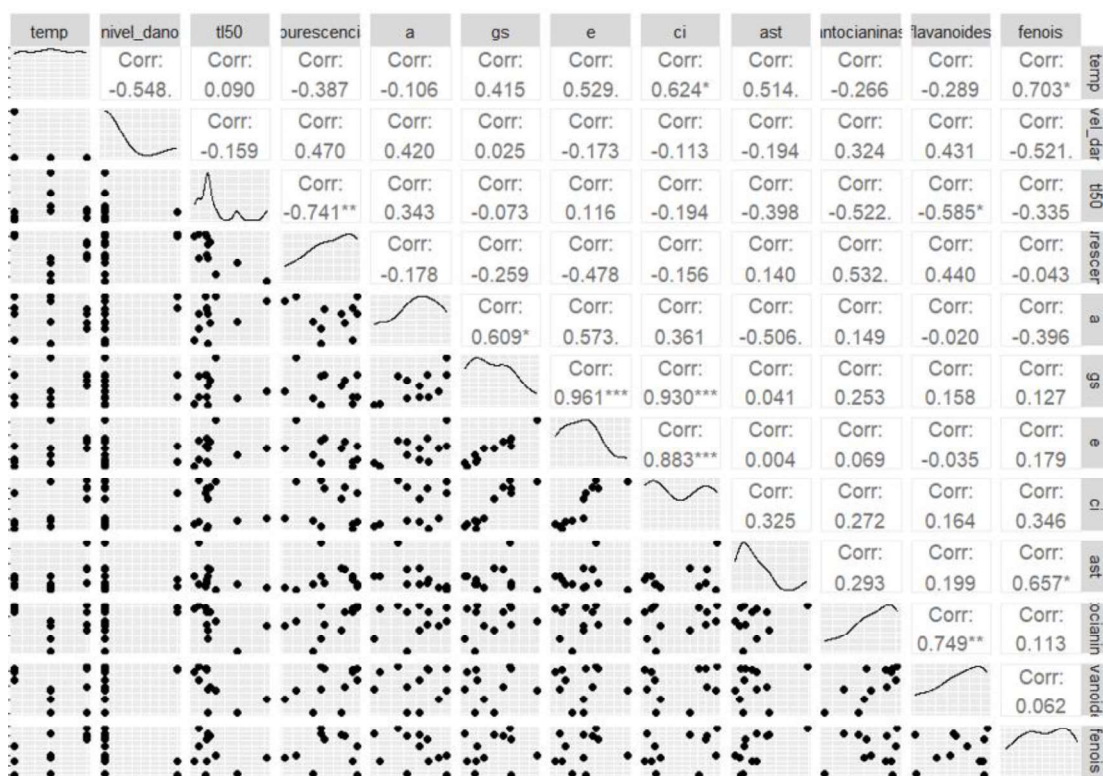
Fonte: A autora.

Figura 12: Matriz de correlação das variáveis fisiológicas em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* sob diferentes condições de temperatura. As variáveis incluem temperatura (temp), nível de dano (nivel_dano), temperatura letal a 50% (TL50), fluorescência, assimilação de CO₂ (A), condutância estomática (gs), transpiração (E), concentração interna de CO₂ (CI), açúcares solúveis totais (AST), antocianinas, flavonoides e fenóis. A matriz apresenta as correlações entre essas variáveis para avaliar o impacto das geadas no comportamento fisiológico do híbrido. As significâncias estatísticas das correlações são denotadas por asteriscos: * indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.01$, e *** indica $p < 0.001$.

Para o *Eucalyptus saligna*, observa-se correlação positiva apenas entre a temperatura e a concentração interna de CO₂ e a concentração de fenóis (Figura 13). O acúmulo de substrato no espaço intracelular em *E. saligna*, provavelmente se deu devido à redução na assimilação de CO₂ (A). Por sua vez, maiores concentrações nos níveis de fenóis pode ser uma de resposta protetora, uma vez que os compostos fenólicos estão frequentemente envolvidos na defesa contra estresses térmicos, agindo como antioxidantes que protegem as células contra os danos causados pelo aumento da temperatura. Estudos mostram que fenóis têm um papel crucial na mitigação do estresse

oxidativo em plantas, ao neutralizar radicais livres e estabilizar membranas celulares durante condições adversas (AGATI et. al. 2012; SHARMA, 2019).

Eucalyptus saligna exibiu uma tolerância moderada às condições de frio. A espécie sofreu com a redução de temperatura, mas não de forma tão severa quanto *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus* (Figura 13). No entanto, a relação entre os açúcares solúveis, antocianinas e a temperatura mostrou-se apenas moderada. Isso sugere que, embora haja um ajuste metabólico em resposta ao frio, a eficácia desse ajuste pode não ser tão robusta quanto em espécies com maior tolerância.

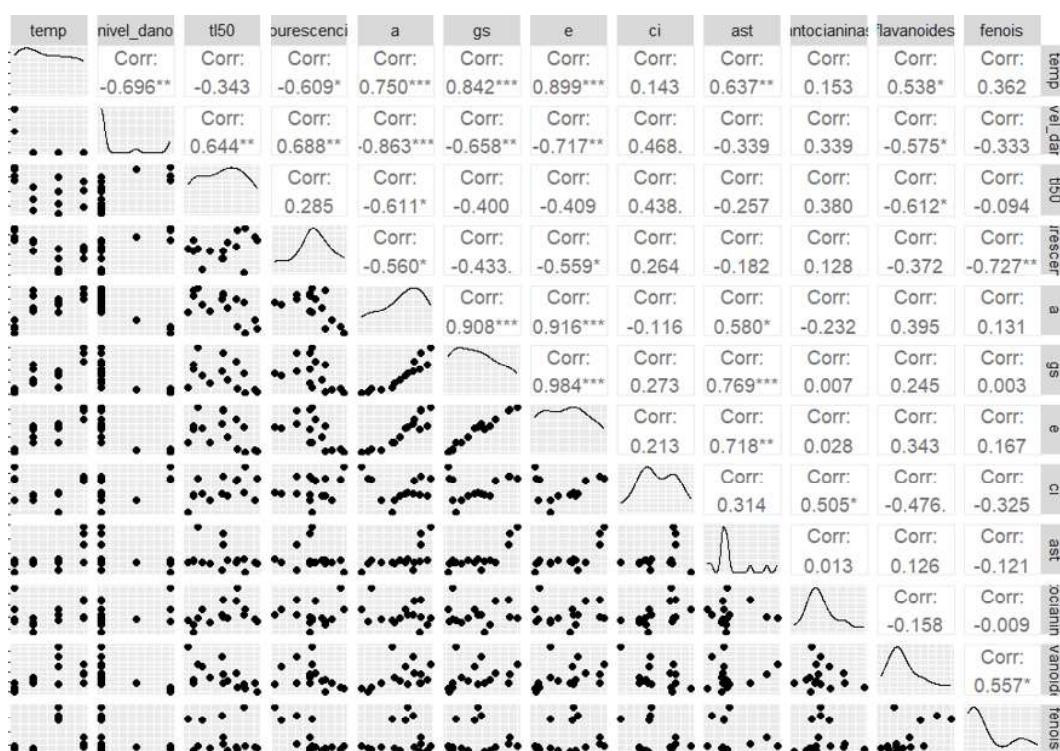


Fonte: A autora.

Figura 13: Matriz de correlação das variáveis fisiológicas em *Eucalyptus saligna* sob diferentes condições de temperatura. As variáveis incluem temperatura (temp), nível de dano (nivel_dano), temperatura letal a 50% (TL50), fluorescência, assimilação de CO₂ (A), condutância estomática (gs), transpiração (E), concentração interna de CO₂ (CI), açúcares solúveis totais (AST), antocianinas, flavonoides e fenóis. A matriz apresenta as correlações entre essas variáveis para avaliar o impacto das geadas no comportamento fisiológico do híbrido. As significâncias estatísticas das correlações são denotadas por asteriscos: * indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.01$, e *** indica $p < 0$.

Para *Eucalyptus dunnii* observa-se uma correlação marcante entre a diminuição das temperaturas e o aumento do nível de dano, indicando sua vulnerabilidade a condições de geadas mais severas (Figura 14). Este resultado é consistente com o entendimento de que geadas causam danos celulares significativos devido à formação de cristais de gelo intracelulares, resultando em ruptura de membranas celulares (KASUGA et al., 2007; FLORIANI et al., 2013).

A existência de uma correlação negativa da fluorescência (FV/FM) de *Eucalyptus dunnii* e as temperaturas de geadas aplicadas indica que altos níveis de danos causados pelo frio estão associados a uma diminuição na fluorescência. A fluorescência da clorofila é um indicador da eficiência fotossintética, e uma redução nessa fluorescência sugere que o sistema fotossintético II está sendo inibido pelo estresse de geada (CHARRIER et al., 2015). A alta correlação da temperatura com AST, indica uma resposta de *E. dunnii* buscando um ajuste bioquímico para atuar na proteção.

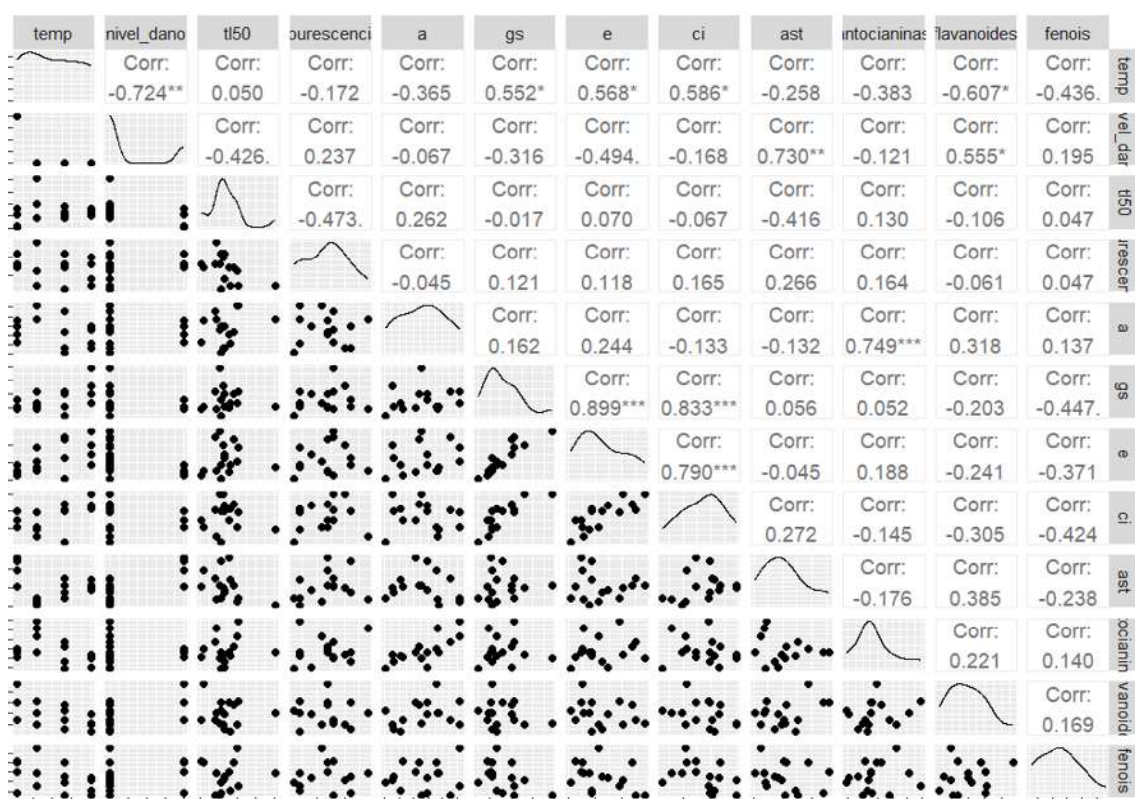


Fonte: A autora.

Figura 14: Matriz de correlação das variáveis fisiológicas *Eucalyptus Dunnii* em sob diferentes condições de temperatura. As variáveis incluem temperatura (temp), nível de dano (nivel_dano), temperatura letal a 50% (TL50), fluorescência, assimilação de CO₂

(A), condutância estomática (gs), transpiração (E), concentração interna de CO₂ (Ci), açúcares solúveis totais (AST), antocianinas, flavonoides e fenóis. A matriz apresenta as correlações entre essas variáveis para avaliar o impacto das geadas no comportamento fisiológico do híbrido. As significâncias estatísticas das correlações são denotadas por asteriscos: * indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.01$, e *** indica $p < 0.001$.

Eucalyptus benthamii apresentou correlação negativa significativa entre temperatura e dano (Figura 15). As trocas gasosas de modo geral, apresentaram correlações positivas com as temperaturas aplicadas. Adicionalmente, foi observado uma correlação entre as geadas aplicadas (temp) e os açúcares solúveis totais (AST) e flavonoides, sugerindo que estes compostos atuam como mecanismos de proteção contra o estresse térmico e danos oxidativos em condições de frio. A maior concentração basal de açúcares solúveis e antocianinas observada em *E. dunnii* e *E. benthamii* pode refletir uma regulação bioquímica intrínseca desses clones que são eficazes contra o estresse por baixas temperaturas, contribuindo para a redução do dano celular e fornecendo proteção contra os efeitos do congelamento e do estresse oxidativo em ambientes adversos.



Fonte: A autora.

Figura 15: Matriz de correlação das variáveis fisiológicas *Eucalyptus benthamii* sob diferentes condições de temperatura de geada. As variáveis incluem temperatura (temp), nível de dano (nivel_dano), temperatura letal a 50% (TL50), fluorescência, assimilação de CO₂ (A), condutância estomática (gs), transpiração (E), concentração interna de CO₂ (CI), açúcares solúveis totais (AST), antocianinas, flavonoides e fenóis. A matriz apresenta as correlações entre essas variáveis para avaliar o impacto das geadas no comportamento fisiológico do híbrido. As significâncias estatísticas das correlações são denotadas por asteriscos: * indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.01$, e *** indica $p < 0.001$.

A observação dos resultados gerais do presente estudo mostram que as plantas podem possuir mecanismos antioxidantes eficientes para mitigar o estresse oxidativo associado ao congelamento. Além das estratégias elucidadas no presente estudo, enzimas como superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase e catalase (CAT), junto com antioxidantes não enzimáticos, como ácido ascórbico, glutathione reduzida, carotenoides, flavonoides e fenólicos, são cruciais para proteger as células contra danos (DAS & ROYCHOUDHURY, 2014).

Estudos como os de Close et al. (2004) e Floriani et al. (2013) destacam como esses compostos desempenham papéis cruciais na defesa das plantas contra o frio, atuando como osmoprotetores e antioxidantes, o que pode explicar a capacidade de *E. dunnii* e *E. benthamii* em tolerar melhor as geadas moderadas.

Os estudos de Odehrech (2020) revelaram que a maior tolerância observada em *E. benthamii* pode depender, em parte, de sua capacidade de detectar rapidamente a queda de temperatura e ajustar vários parâmetros morfofisiológicos, destacou-se uma fase inicial de acúmulo de açúcares, seguida por um aumento de diferentes osmorreguladores e antioxidantes. Estudos como os de Close et al. (2004) e Floriani et al. (2011) apontam que os açúcares solúveis podem atuar como crioprotetores, melhorando a resistência ao frio ao reduzir o ponto de congelamento intracelular e estabilizando as membranas celulares. Essa adaptação é crucial para a sobrevivência em temperaturas baixas.

Em sentido complementar, a pesquisa realizada por Oberschelp et al. (2020) mostra que a baixa capacidade de resposta ao frio de *E. grandis* pode

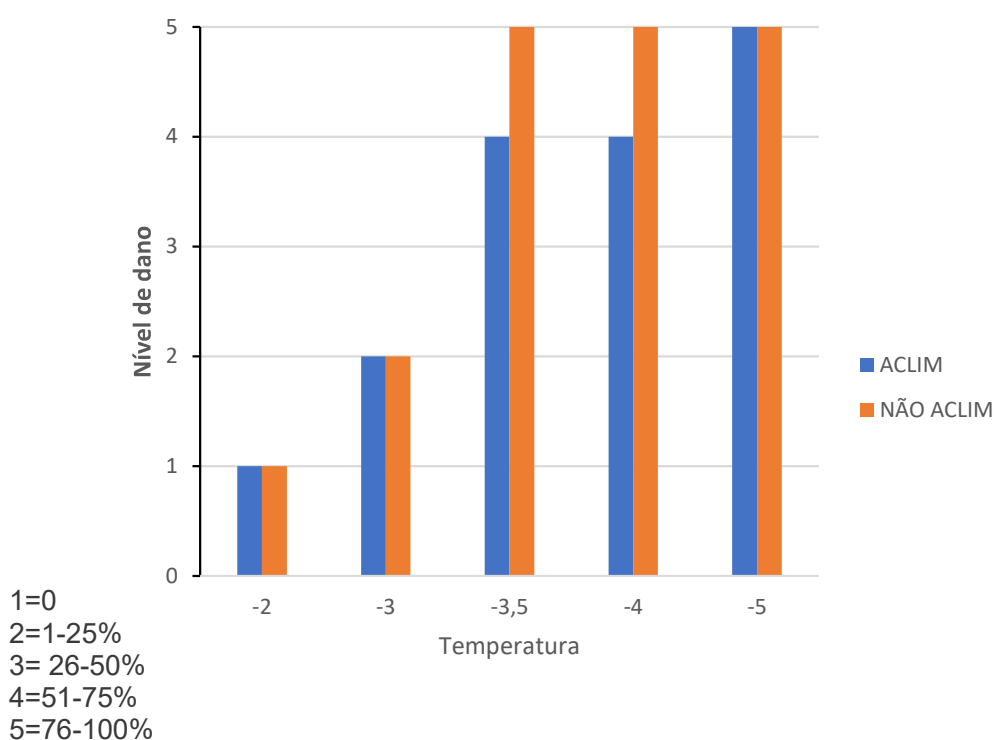
ser atribuída à ausência de mecanismos fisiológicas e bioquímicas eficazes, essenciais para a sobrevivência em condições de geada. Assim a baixa capacidade intrínseca do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em produzir açúcares protetores e outros compostos bioquímicos cruciais para a tolerância ao frio, sugere que ele não possui mecanismos fisiológicos adequados para tolerar temperaturas de geada, o que pode comprometer seu desempenho em ambientes sujeitos a essas condições. Essa suscetibilidade sugere que, para melhorar a tolerância ao frio, seria necessário investir em programas de melhoramento genético que incorporem genes associados à resistência ao frio.

Já *Eucalyptus benthamii* e o *Eucalyptus dunnii*, devido à sua demonstrada capacidade em ajustar seu metabolismo para proteção contra o estresse oxidativo, devem ser considerados como fontes potenciais para o melhoramento genético de plantas visando maior tolerância a geada. Utilizar essas espécies como base genética pode ampliar significativamente a capacidade das plantas de eucalipto de resistir a baixas temperaturas, contribuindo para o desenvolvimento de genótipos que sejam mais robustos em enfrentar geadas e frios extremos.

A evidência de maior tolerância ao frio em *Eucalyptus benthamii* reforça que a espécie, entre as quatro estudadas, é a mais adequada para áreas propensas a geadas frequentes ou a flutuações bruscas de temperatura. Seu mecanismo eficiente de ajuste metabólico permite que ela mantenha homeostases fisiologia sob condições adversas, baixas temperaturas, e minimiza danos celulares. Em contraste, a suscetibilidade do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* requer considerações de manejo específicas, como a escolha de locais de plantio com microclimas mais amenos, ou mesmo o desenvolvimento de novas linhagens híbridas que incorporem genes de tolerância ao frio.

4.1.1. ESTUDO DE ACLIMATAÇÃO E DURAÇÃO DA MEMÓRIA DE ACLIMATAÇÃO EM *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.

Os efeitos da aclimação ao frio sobre os níveis de dano visual em plantas expostas a diferentes temperaturas de geada, logo após o período de aclimação (tempo 0), são apresentados na Figura 16.



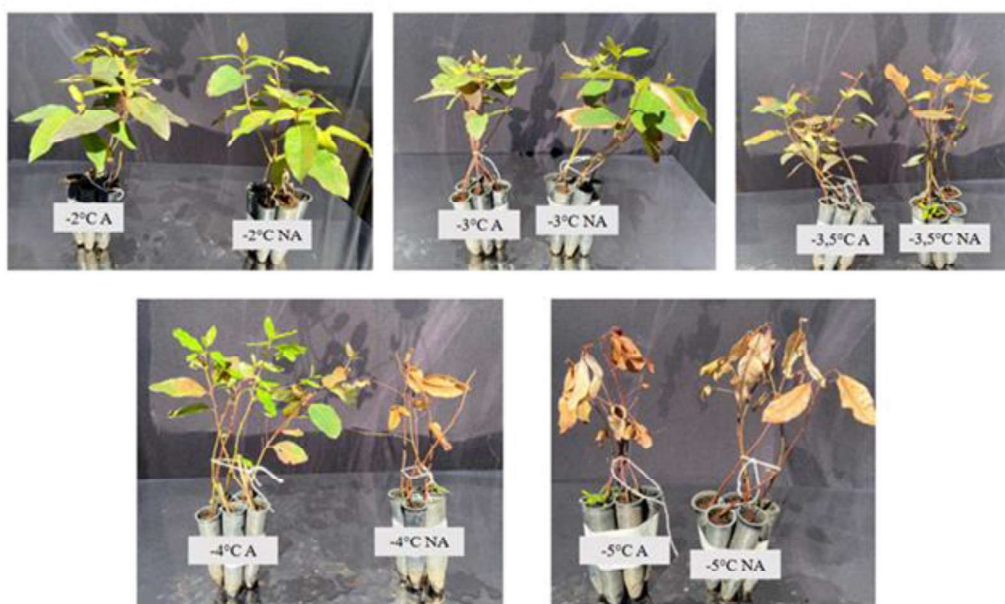
Fonte: A autora.

Figura 16: Níveis de dano visual em plantas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, com e sem aclimação, submetidas a diferentes temperaturas de geada. As temperaturas testadas foram -2,0; -3,0; -3,5; -4,0 e -5,0 °C. Os níveis de dano são determinados pela moda das notas de cinco avaliadores. As notas variam em uma escala de 1 a 5, correspondendo ao percentual de dano visível na planta: 1 indica 0% de dano (sem dano visível), 2 indica 1-25% de dano, 3 indica 26-50% de dano, 4 indica 51-75% de dano, e 5 indica 76-100% de dano.

Observando o gráfico dos níveis de dano visuais em plantas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* aclimatadas e não aclimatadas submetidas a temperaturas de geada variando de -2,0 a -5,0 °C, é notório que as plantas aclimatadas apresentaram menores níveis de danos em -3,5 °C e de

modo ainda mais evidente em $-4,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supõe-se então, que a aclimação ao frio favoreceu o aumento da tolerância das plantas as geadas moderadas. As plantas aclimatadas aparentemente desenvolveram mecanismos fisiológicos e bioquímicos que ajudam a mitigar os danos causados pelas geadas.

Na geada com temperatura de $-5,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, não houve diferença nos danos entre as plantas aclimatadas e não aclimatadas, sugerindo que a aclimação tem um limite térmico de eficácia e pode não ser suficiente para proteger contra geadas extremas. Na figura 17, onde estão ilustrados os aspectos visuais *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* 15 dias após a geada, nota-se que apesar de em $-5,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ambos os tratamentos apresentarem 100% da sua área foliar comprometida, há uma tentativa de rebrota em plantas aclimatadas, que não ocorreu em plantas não aclimatadas, comprovando a eficácia da aclimação no aumento da tolerância de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.



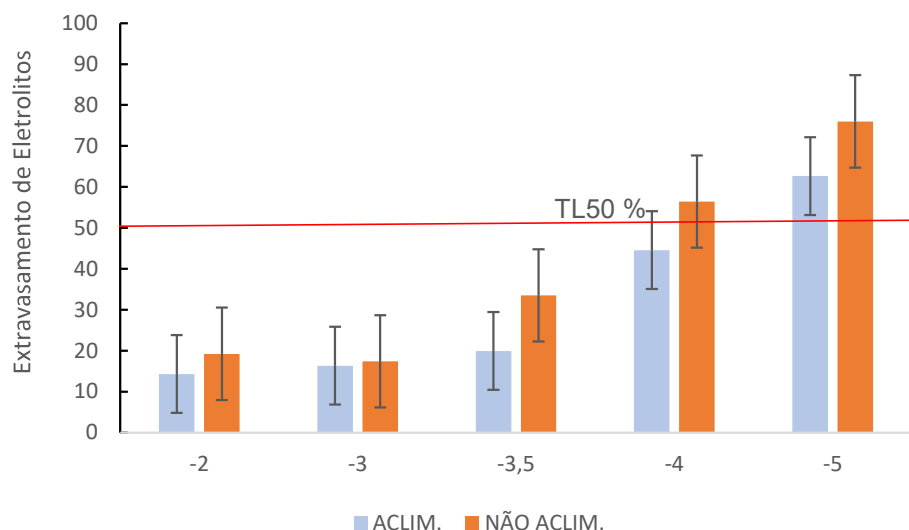
Fonte: A autora.

Figura 17: Aspecto visual das plantas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* 15 dias após exposição a diferentes temperaturas de geada ($-2,0^{\circ}\text{C}$, $-3,0^{\circ}\text{C}$, $-3,5^{\circ}\text{C}$, $-4,0^{\circ}\text{C}$ e $-5,0^{\circ}\text{C}$). As imagens demonstram a resposta da planta às várias intensidades de geada testadas.

Na temperatura de $-4,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a diferença entre as plantas aclimatadas e não aclimatadas são mais acentuadas, com as plantas não aclimatadas

mostrando maiores níveis de danos e praticamente 100% do tecido vegetal da parte aérea danificado.

Observando os dados de extravasamento de eletrólitos (Figura 18), é possível verificar que para plantas aclimatadas a TL50 é alcançada apenas em $-5,0^{\circ}\text{C}$ enquanto que plantas não aclimatadas ultrapassam este limiar em $-4,0^{\circ}\text{C}$. A aclimação parece conferir alguma proteção contra os danos causados pelo frio, permitindo que as plantas mantenham uma integridade fisiológica melhor em comparação com as que não foram aclimatadas.



Fonte: A autora.

Figura 18: O gráfico apresenta os dados de extravasamento de eletrólitos das plantas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, expressos como TL50% para diferentes temperaturas ($-2,0^{\circ}\text{C}$, $-3,0^{\circ}\text{C}$, $-3,5^{\circ}\text{C}$, $-4,0^{\circ}\text{C}$, e $-5,0^{\circ}\text{C}$), comparando plantas aclimatadas e não aclimatadas.

Os dados ilustram a eficácia da aclimação ao frio em aumentar a tolerância das plantas a geadas. Conforme demonstrado pela maior sobrevivência das plantas aclimatadas em praticamente todas as temperaturas de geada testadas. Em $-4,0^{\circ}\text{C}$, a diferença de sobrevivência entre plantas aclimatadas e não aclimatadas é ainda mais acentuada, indicando que a aclimação permite às plantas tolerar melhor o estresse térmico.

A aclimação confere uma vantagem significativa, permitindo que as plantas mantenham funções fisiológicas vitais em condições que seriam inviável para plantas não aclimatadas (Tabela 3).

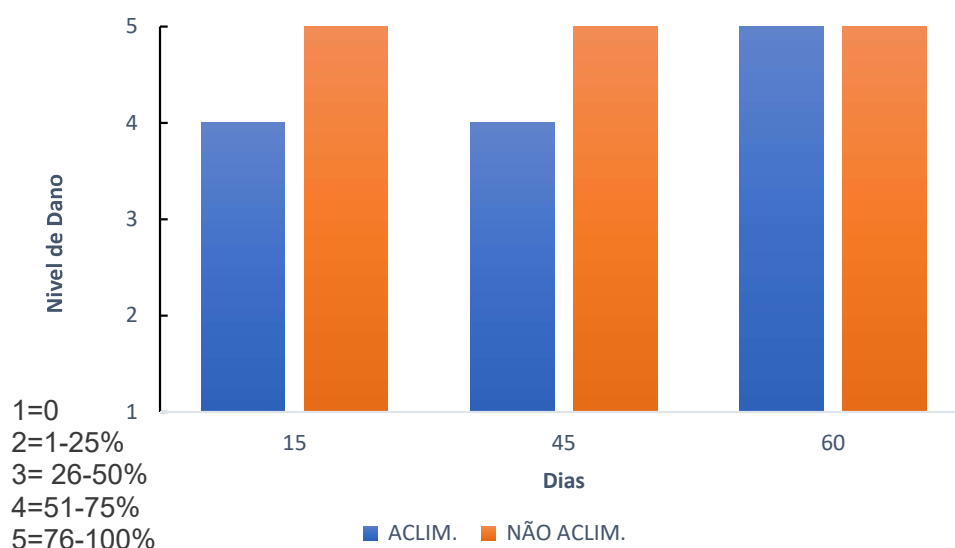
Tabela 3; Resumo das médias para os parâmetros fisiológicos (*A*, *gs*, *Ci* e *E*) em *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, comparando plantas aclimatadas (A) e não aclimatadas (NA) em cada uma das temperaturas de geadas, (-2, -3, -3,5, -4 e -5 °C), logo após o período de aclimação, com a significância estatística indicada por asteriscos. Onde, ***: $p < 0.001$ (Altamente significativo); **: $p < 0.01$ (Muito significativo); *: $p < 0.05$ (Significativo); ns: $p \geq 0.05$ (Não significativo).

Temp (°C)	Trat.	<i>A</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	<i>gs</i> ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	<i>Ci</i> ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	<i>E</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
-2	NA	1.40 *	0.03 **	329.15 ns	0.41 *
-2	A	3.84 *	0.07 **	286.97 ns	0.70 *
-3	NA	0.00 **	0.00 ***	0.00 ***	0.00 ***
-3	A	2.72 **	0.04 ***	297.65 ***	0.92 ***
-3.5	NA	0.00 ***	0.00 ***	0.00 ***	0.00 ***
-3.5	A	1.75 ***	0.03 ***	294.18 ***	0.48 ***
-4	NA	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns
-4	A	0.12 ns	0.01 ns	185.96 ns	0.35 ns
-5	NA	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns
-5	A	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns	0.00 ns

A análise estatística mostrou que, para as variáveis fotossíntese (A), condutância estomática (g_s), concentração interna de CO_2 (C_i) e transpiração (E), detectou diferenças significativas entre plantas aclimatadas e não aclimatadas nas temperaturas de $-2^\circ C$, $-3^\circ C$ e $-3,5^\circ C$. Nas temperaturas de $-4^\circ C$ e $-5^\circ C$, a diferença não foi significativa, o que pode indicar que, sob condições de geada mais severas, a aclimação ao frio não é suficiente para prevenir o dano fisiológico. As plantas aclimatadas apresentaram maior eficiência fisiológica em geadas menos extremas, como demonstrado pelos valores mais altos de fotossíntese e transpiração, sugerindo que a aclimação prepara as plantas para resistirem melhor a estresses moderados de frio. No entanto, a perda de eficiência em temperaturas mais baixas ($-4^\circ C$ e $-5^\circ C$) sugere um limite para os benefícios da aclimação.

Os parâmetros de trocas gasosas indicam que práticas de aclimação podem ser benéficas para aumentar a resiliência das plantas a condições de geada, potencialmente melhorando a produtividade em regiões sujeitas a geadas. Sugerem que mecanismos como o aumento de solutos protetores, mudanças na composição de membranas e ativação de vias antioxidantes devem ter sido ativados plantas aclimatadas, o que ajuda a mitigar os efeitos da geada.

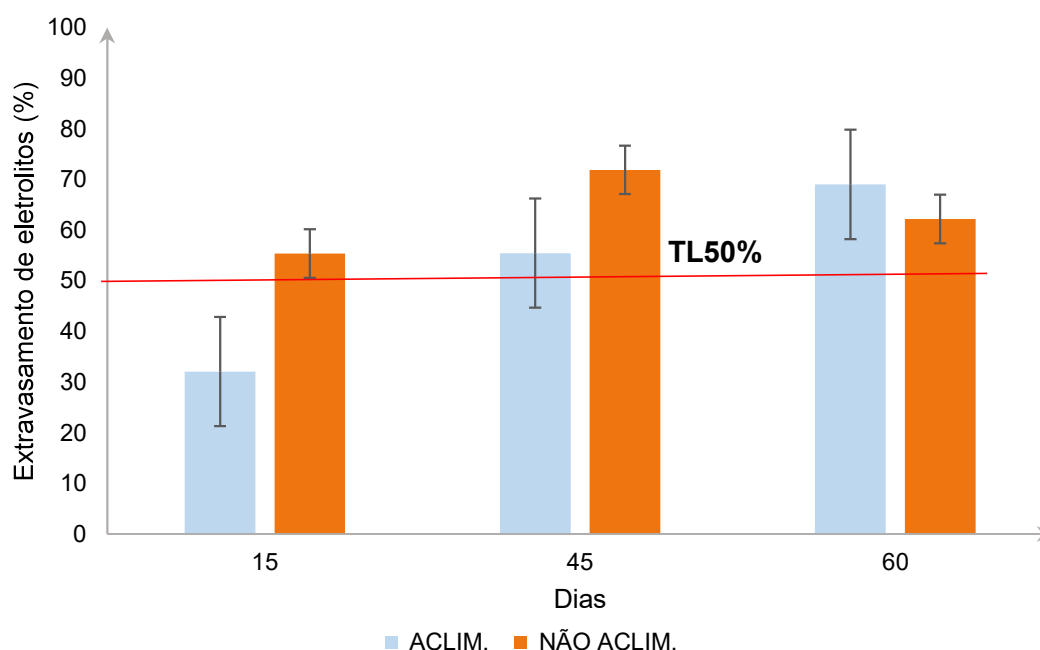
Os efeitos da aclimação ao frio sobre os níveis de danos em plantas expostas a geadas de $-4^\circ C$ em diferentes intervalos de tempo (15, 45 e 60 dias) são apresentados na Figura 19. Os dados demonstram uma maior tolerância a geada as 15 e aos 45 dias, como níveis de danos se igualando as em plantas aclimatadas e não aclimatadas aos 60 dias.



Fonte: A autora.

Figura 19: Nível de danos medidos após geadas nos intervalos de 15, 45 e 60 dias após o período de aclimação. Níveis de dano em resposta a temperaturas de geada de -4°C em dois tratamentos: plantas aclimatadas (barras azuis) e plantas não aclimatadas (barras laranja). Os níveis de dano são determinados pela moda das notas de cinco avaliadores. As notas variam em uma escala de 1 a 5, correspondendo ao percentual de dano visível na planta: 1 indica 0% de dano (sem dano visível), 2 indica 1-25% de dano, 3 indica 26-50% de dano, 4 indica 51-75% de dano, e 5 indica 76-100% de dano.

Os níveis de extravasamento de eletrólitos em plantas aclimatadas e não aclimatadas após exposição a geadas de -4°C , medidos em diferentes intervalos de tempo (15, 45 e 60 dias), são apresentados na Figura 20. Sendo possível verificar que aos 15 dias, o grupo aclimatado apresentou um extravasamento significativamente menor ($\sim 25\%$) em comparação com o grupo não aclimatado ($\sim 50\%$). Este resultado indica que a aclimação ao frio é eficaz em reduzir o dano celular inicial causado pela exposição a temperaturas de -4°C , possivelmente devido ao desenvolvimento de mecanismos fisiológicos e bioquímicos que protegem as células contra danos de membrana (THOMASHOW, 1999; WISNIEWSKI et al., 2004)



Fonte: A autora.

Figura 22; Extravasamento de eletrólitos medido em diferentes períodos (15, 45 e 60 dias) após o período de aclimação, em resposta a temperaturas de geada (-4°C) em duas condições: plantas aclimatadas (A) barras azuis e não aclimatadas (NA, barras laranja).

Aos 45 dias, ambos os grupos mostram um aumento no extravasamento de eletrólitos, com o grupo não aclimatado atingindo cerca de 75% e o grupo aclimatado cerca de 50%. Este aumento pode ser atribuído à persistência dos efeitos da aclimação induzida pelo frio, que eventualmente compromete as defesas celulares das plantas, mesmo nas aclimatadas. No entanto, o fato de o grupo aclimatado ainda apresentar menor extravasamento de eletrólitos em comparação com o grupo não aclimatado sugere que a aclimação continua a conferir alguma proteção adicional, retardando o impacto total do estresse térmico (Floriani et al., 2011).

Aos 60 dias, as porcentagens de extravasamento de eletrólitos de ambos os grupos se igualam, cada um em torno de 60-65%. Esta convergência pode indicar que a memória de aclimação ao frio tem um efeito protetor que diminui com o tempo, e que a exposição prolongada a geada após algum tempo pode

eventualmente superar os mecanismos de defesa adquiridos durante o período de aclimação

As plantas aclimatadas melhoraram a sua capacidade de tolerar a geada ainda que depois de um certo tempo; entretanto a aclimação não evitou danos drásticos como ocorreu logo após o período de aclimação, no tempo 0. Até onde se sabe, este é o primeiro estudo sobre a duração da memória de aclimação ao frio com teste de tolerância à geada. Ainda que as diferenças ao longo do tempo sejam sutis, é um indício de que plantas de *Eucalyptus* podem desenvolver uma memória de aclimação prolongada se forem previamente submetidas a uma aclimação.

Floriani et al. (2013) testaram diferentes tempos de aclimação e relataram divergências nas respostas de aclimação ao frio entre diversas espécies de *Eucalyptus*. Esses resultados destacam a importância de investigar como o material genético e a duração do tempo de aclimação influenciam a memória de aclimação. Portanto, existe a necessidade em investigar se variações nos processos de aclimação resultam em diferentes durações de memória de aclimação.

Neste mesmo sentido, Oberschelp et. al (2023) constataram que eucaliptos que possuem maiores concentrações basais de pigmentos e enzimas antioxidantes, como *Eucalyptus benthamii*, podem se aclimatar mais rapidamente e com tolerância ainda mais marcante do que espécies que não possuem essas características, como é o caso de *Eucalyptus grandis*. Assim, presume-se uma alta chance de sucesso aplicar a presente metodologia em clones com maior tolerância basal a geadas para investigar o tempo de duração da memória de aclimação induzida, como exemplificado pelos dois clones elucidativos no nesse estudo de tolerância a geadas, o *Eucalyptus benthamii* e o *Eucalyptus dunnii*.

Walter (2013) argumenta que a aclimação ao frio em plantas não é apenas uma resposta de curto prazo ao estresse ambiental, mas sim uma adaptação evolutiva para lidar com as baixas temperaturas de forma mais eficaz. Além disso, o autor menciona que experiências de estresse causadas por ciclos de congelamento-degelo ou por geadas tardias podem influenciar a

resposta das plantas a futuros períodos de frio, mesmo na ausência de aclimação prévia. Deste modo, sabe-se que as plantas podem desenvolver respostas adaptativas duradouras a estresses ambientais, o que pode melhorar sua capacidade de sobreviver e prosperar em condições de geadas futuras. Em suma, é de extrema importância o estudo da aclimação e da plasticidade das plantas em resposta ao frio e superação do estresse relacionado à geada.

Por fim os resultados elucidados indicam que as plantas de *Eucalyptus* podem desenvolver uma melhor capacidade de tolerar geadas ao longo do tempo se forem submetidas previamente a um período de aclimação. A aclimação ao frio pode induzir a expressão de proteínas relacionadas ao estresse e a acumulação de solutos compatíveis, que ajudam a estabilizar as membranas celulares e a proteger as estruturas celulares contra danos causados pelo frio (BECK et al., 2004).

Em suma, a aclimação ao frio apresenta-se como uma prática valiosa para aumentar a resiliência das plantações de *Eucalyptus* em regiões sujeitas a baixas temperaturas. A compreensão detalhada das respostas de aclimação das plantas ao frio é crucial para o desenvolvimento de práticas de manejo florestal e programas de melhoramento florestal mais eficazes, garantindo a sobrevivência e a produtividade das plantações sob risco de ocorrência de geadas.

Este é o primeiro estudo conhecido de um teste aclimação ao frio para *E. urophylla* x *E. grandis* visando elucidar a duração a memória adquirida e sua eficiência em tolerância a geadas. Para estudos futuros, há uma oportunidade de explorar novas metodologias de aclimação e investigar se as variações nos processos de aclimação resultam em diferentes durações de memória de aclimação.

A metodologia aqui proposta pode e deve ser replicada para outras espécies de eucalipto que possuam boa tolerância basal a geadas. Novos estudos devem fornecer uma compreensão mais completa e refinada desses processos, contribuindo significativamente para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de manejo florestal e melhoramento genético, visando

aumentar a resiliência das plantações de eucalipto em face a ocorrência de geadas.

Pesquisas futuras que desvendem a indução de tolerância ao frio, as rotas metabólicas e os genes envolvidos nas respostas de aclimação são essenciais pois, podem levar ao desenvolvimento de estratégias de melhoramento que aumentem a resiliência das plantações de eucalipto às mudanças climáticas, e induzam uma maior tolerância a geadas. Integrar conhecimentos sobre os processos fisiológicos das espécies de *Eucalyptus* com mecanismos epigenéticos pode ainda oferecer novos caminhos para aprimorar o manejo e a seleção de clones aptos a tolerar geadas.

5. CONCLUSÕES

A pesquisa realizada evidenciou as variações significativas na tolerância ao frio entre *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, *E. saligna*, *E. dunnii* e *E. benthamii*. A análise da temperatura letal 50% (TL50) forneceu informações sobre a resistência de cada clone às baixas temperaturas, com *Eucalyptus benthamii* se destacando como o mais tolerante e o híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* como o mais suscetível.

O *Eucalyptus benthamii* demonstrou maior capacidade de manter suas atividades fisiológicas após eventos de geada. Os clones mais vulneráveis à geada tendem a apresentar uma redução significativa nas taxas de fotossíntese mesmo em geadas menos severas e não possuem mecanismo de acúmulo significativo de açúcares solúveis e flavonoides.

O híbrido *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* apresentou memória de aclimação ao frio, com tolerância às geadas imediatamente após o período de aclimação (tempo 0). Quanto a duração da aclimação induzida, foram observados também sinais leves de tolerância aos 15 e 45 dias, mas aos 60 dias, a memória de aclimação adquirida havia se perdido completamente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67-76, 2012.

AGUAYO, P. et al. An overview of cold stress responses in *Eucalyptus globulus*. **Trees**, v. 37, n. 2, p. 211-222, 2023.

ARNOLD, Roger et al. Selection of cold-tolerant *Eucalyptus* species and provenances for inland frost-susceptible, humid subtropical regions of southern China. **Australian Forestry**, v. 78, n. 3, p. 180-193, 2015.

ASSIS, T. F. et al. Production and use of *Eucalyptus* hybrids for industrial purposes. In: **HYBRID BREEDING AND GENETICS OF FOREST TREES**, 2000, Noosa. Proceedings. Brisbane: Department of Primary Industries, 2000. p. 63-74.

ASSIS, T. F.; RESENDE, M. D. V. de. Genetic improvement of forest tree species. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 11, p. 44-49, 2011.

CLOSE, D. C.; BEADLE, C. L.; BATTAGLIA, M. Foliar anthocyanin accumulation may be a useful indicator of hardiness in eucalypt seedlings. **Forest ecology and management**, v. 198, n. 1-3, p. 169-181, 2004.

BACIC, A.; HARRIS, P. J.; STONE, B. A. Structure and function of plant cell walls. In: **The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise**. New York: Academic Press, 2008. p. 297-371.

BEGGS C. J.; WELLMANN E. (1994) Photocontrol of flavonoid biosynthesis, in: Kendrick RE, Kronenberg GHM. (Eds.), **Photomorphogenesis in Plants**, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 733–751

BERRY, J.; BJORKMAN, O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. **Annual Review of plant physiology**, v. 31, n. 1, p. 491-543, 1980.

BLUM, A.; EBERCON, A. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. **Crop Science**, Madison, v. 21, n. 1, p. 43-47, 1981.

BOKHORST, S.F. et al. Winter warming events damage sub-Arctic vegetation: consistent evidence from an experimental manipulation and a natural event. **Journal of Ecology**, v. 97, n. 6, p. 1408-1415, 2009.

CAI, Wenju et al. Changing El Niño–Southern oscillation in a warming climate. **Nature Reviews Earth & Environment**, v. 2, n. 9, p. 628-644, 2021

CHARRIER, G. et al, T. Frost hardiness in walnut trees (*Juglans* spp.): How to link physiology and modelling? **Tree Physiology**, 35(7), 830-842, (2015).

CHEN, Hao et al. Long Non-Coding RNA and Its Regulatory Network Response to Cold Stress in *Eucalyptus urophylla* ST Blake. **Forests**, v. 12, n. 7, p. 836, 2021.

COHEN, Judah et al. Recent Arctic amplification and extreme mid-latitude weather. **Nature geoscience**, v. 7, n. 9, p. 627-637, 2014.

COSTA E SILVA, F. et al. Acclimation to short-term low temperatures in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought resistance. **Tree Physiology**, v. 29, n. 1, p. 77-86, 2009.

DAI, X. et al. Natural annual transcriptome dynamics of *Eucalyptus* reveal seasonal adaptation of tropical/sub-tropical trees. **Tree Physiology**, v. 43, n. 4, p. 658-674, 2023.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in environmental science**, v. 2, p. 53, 2014.,,

DE ANTONIO, A.C.; HOFFMANN, W. A.; ROSSATTO, D.R. The role of morpho-physiological traits in frost tolerance of neotropical savanna trees. **Trees**, v. 35, n. 5, p. 1687-1696, 2021.

DING, Y; SHI, Y.; YANG, S., Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants. **New Phytologist**, v. 222, n. 4, p. 1690-1704, 2019.

DOS SANTOS, P. E. T. et al. Melhoramento genético e lançamento de cultivares. **Embrapa Florestas-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2021.

DUBOIS M. et al. (1956) Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. *Anal Chem* 28(3):350-356

EL KAYAL, W. et al. Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from *Eucalyptus* in response to cold. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 10, p. 2455-2469, 2006.

FAO. Global Forest Resources Assessment 2015. Rome: FAO, 2015.

Disponível em:

<https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/5100a18e-1432-42b1-945e-398daac0176e/content>

FILHO, E. P., SANTOS, P. E. T. **Escolha de cultivares de eucaliptos em função do ambiente e do uso**. Comunicado Técnico 316. Colombo PR. p.3, 2013.

FLEXAS, J. et al. Understanding down-regulation of photosynthesis under water stress: future prospects and searching for physiological tools for irrigation management. **Annals of applied Biology**, v. 144, n. 3, p. 273-283, 2004.

- FLINT SD, Jordan PW, Caldwell MM (1985) Plant protective response to enhanced UV-B radiation under field condition. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 41:95–106
- FLORIANI, M. M. P. et al. Rustificação de plantas de *Eucalyptus dunnii* Maiden e a relação entre as concentrações de carboidratos solúveis totais e de prolina foliar e a tolerância ao frio. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.35, n.1, p.21-29, 2011.
- FLORIANI, M. M. P. et al. Relação entre concentrações foliares de carboidratos solúveis totais e tolerância ao frio em diferentes espécies de *Eucalyptus* spp. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 1, 2013.
- GAETE-LOYOLA, J. et al. Transcriptome profiling of *Eucalyptus nitens* reveals deeper insight into the molecular mechanism of cold acclimation and deacclimation process. **Tree genetics & genomes**, v. 13, p. 1-18, 2017.
- GILMOUR S. J. et al. Overexpression of the Arabidopsis *CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. **Plant Physiology** 124: 1854–1865.
- GRIMM, Alice M.; BARROS, Vicente R.; DOYLE, Moira E. Variabilidade climática no sul da América do Sul associada aos eventos El Niño e La Niña. **Journal of climate** , v. 13, n. 1, p. 35-58, 2000.
- GONÇALVES, J. L. M et al. Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. **For Ecol Manag** 301:6–27, 2013.
- GUY, C. L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. **Annual review of plant biology**, v. 41, n. 1, p. 187-223, 1990
- HIGA, A. R.; HIGA, R. C. V. Indicação de espécies para reflorestamento. In: GALVÃO, A. P. M. (Ed.). **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais: um guia para ações municipais e regionais**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, Embrapa Florestas. p. 101-124, 2000.
- HIGA, A. R.; GARCIA, C. H.; SANTOS, E. T. **Geadas, prejuízos à atividade florestal**. Silvicultura, v.15, n. 58, p.40-43, 1994.
- HIGA, A.R.; GARCIA, C.H.; SANTOS, E.T. **Geadas, prejuízos à atividade florestal**. Silvicultura, v.15, n. 58, p.40-43, 1994.
- HORTON, D. E. et al. (2015). Contribution of changes in atmospheric circulation patterns to extreme temperature trends. **Nature**, 522(7557), 465-469.
- IBÁ, INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Relatório Anual IBÁ 2020**. São Paulo: Café Art, 2020. Disponível em: <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorioiba-2020.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2020.

IBÁ, INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Relatório Anual IBÁ 2023**. São Paulo: Café Art, 2023.

Intergovernmental Panel on Climate Change - IPCC. Climate Change 2014. **Synthesis Report.**” In **Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**, ed. L.A Pachauri, R.K., Meyer., 151 p.

LARCHER, W. **Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups**. Springer Science & Business Media, 2003.

LARCHER, W. (2006). **Ecofisiologia Vegetal**. 3ª ed. São Carlos, SP: RiMa.

LESLIE, A; MENCUCCINI, Maurizio; PERKS, Mike P. Frost damage to eucalypts in a short-rotation forestry trial in Cumbria (England). **iForest: Biogeosciences and Forestry**, v. 7, p. 156-161, 2014.

LEVITT, J. et al. **Responses of Plants to Environmental Stress, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses**. Academic Press., 1980.

LEUENDORF, J. E. et al. Acclimation, priming and memory in the response of *Arabidopsis thaliana* seedlings to cold stress. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

LICHTENTHALER H. K; BUSCHMANN C., (2001) 'Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy', in **'Current protocols in food analytical chemistry'** pp. F4.3.1-F4.3.8. Wiley, New York.

LIMA, A. L. S. (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, Gothenburg, v. 47, n. 3, p. 239-247.

LOPES, A. B. et al. Multiyear La Niña effects on the precipitation in South America. **International Journal of Climatology**, v. 42, n. 16, p. 9567-9582, 2022.

MARENGO, J. A. et al. Future climate change in South America at the end of the 21st century: intercomparison of scenarios from three regional climate models. **Climate Dynamics** , v. 35, n. 6, pág. 1073-1097, 2010.

MORAES, C. B. et al. Estimates of genetic parameters for early selection of Eucalyptus clones for region with frost occurrence. **Scientia Forestalis**, v.42, n.12, p.219-227, 2014.

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

MOURA, M. M. et al. Relation of El Niño and La Niña phenomena to precipitation, evapotranspiration and temperature in the Amazon basin. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 1639-1651, 2019.

Mc CREADY, R. M. et al. (1950) Determination of starch and amylose in vegetables, application to peas. **Analytical Chemistry**, v. 22, p. 1156-1158.

NEALE, D.B. et al. Novel insights into tree biology and genome evolution as revealed through genomics. **Annual Review of Plant Biology**, v. 68, p. 457-483, 2017.

OBERSCHHELP, G.P.J et al. Cold acclimation and freezing tolerance in three *Eucalyptus* species: A metabolomic and proteomic approach. **Plant Physiol. Biochem.** **2020**, *154*, 316–327.

OBERSCHHELP, Gustavo Pedro Javier et al. Harder, better, faster, stronger: Frost tolerance of *Eucalyptus benthamii* under cold acclimation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 186, p. 64-75, 2022.

OVERLAND, James et al. The melting Arctic and midlatitude weather patterns: Are they connected?. **Journal of Climate**, v. 28, n. 20, p. 7917-7932, 2015.

POLLE, A.; KRÖNIGER, W.; RENNENBE PINKARD, E. A. et al. Photosynthetic responses of *Eucalyptus nitens* (Deane and Maiden) Maiden to green pruning. **Trees**, v. 12, p. 119-129, 1998.

RG, H. Seasonal fluctuations of ascorbate-related enzymes: acute and delayed effects of late frost in spring on antioxidative systems in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). **Plant and cell physiology**, v. 37, n. 6, p. 717-725, 1996.

REZAEI, Mehdi; ROHANI, Abbas. Estimating Freezing Injury on Olive Trees: A Comparative Study of Computing Models Based on Electrolyte Leakage and Tetrazolium Tests. **Agriculture**, v. 13, n. 6, p. 1137, 2023.

REZENDE, Gabriel Dehon SP; DE RESENDE, Marcos Deon V.; DE ASSIS, Teotônio F. *Eucalyptus* breeding for clonal forestry. In: **Challenges and Opportunities for the World's Forests in the 21st Century**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. p. 393-424.

RIAZI A. et al., (1985) Water-stress induced changes in concentrations of proline and other solutes in growing regions of young barley leaves. **J Exp Botany** 36(11):1716-1725.

SAKAI, Akira; LARCHER, Walter. **Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress**. Springer Science & Business Media, 2012.

SHARIF, Mohammed. Simulation of Extreme Precipitation Events Using an Improved K-Nearest Neighbor Model. In: **World Environmental and Water Resources Congress 2023**. p. 381-389.

SHARMA, A.; SHAHZAD, B.; REHMAN, A.; BHARDWAJ, R.; LANDI, M.; ZHENG, B. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 2452, 2019. DOI: 10.3390/molecules24132452.

- SINGLETON V. L., ROSSI J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 16:144-158.
- SONG, Huan et al. A review of methods and techniques for detecting frost on plant surfaces. **Agriculture**, v. 11, n. 11, p. 1142, 2021.
- SUNG, S.; AMASIO R. M. Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. **Current opinion in plant biology**, v. 7, n. 1, p. 4-10, 2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 819 p.
- THOMASHOW, M. F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. **Annual review of plant biology**, v. 50, n. 1, p. 571-599, 1999.
- TOLBERT, N. Edward (Ed.). *The plant cell: a comprehensive treatise*. 2013.
- WALTER, J. et al. Ecological stress memory and cross stress tolerance in plants in the face of climate extremes. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 3-8, 2013.
- WANG, C. et al. El Niño and southern oscillation (ENSO): a review. **Coral reefs of the eastern tropical Pacific: Persistence and loss in a dynamic environment**, p. 85-106, 2017.
- WANG, Y. et al. Research progress on the physiological response and molecular mechanism of cold response in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, p. 1334913, 2024.
- YU, Z. C. et al. Overexpression of the V-ATPase c subunit gene from Antarctic notothenioid fishes enhances freezing tolerance in transgenic Arabidopsis plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 160, p. 365-376, 2021.
- ZILLI, M. et al. The impact of climate change on Brazil's agriculture. **Science of the Total Environment**, v. 740, p. 139384, 2020.