



ÁUREO APARECIDO ABREU JÚNIOR

**MUDANÇAS EVOLUTIVAS NAS CURVAS DE
NORMAS DE REAÇÃO TÉRMICA AVALIADAS
PELA DEPLEÇÃO DO AMIDO ARMAZENADO
NAS CÉLULAS DO PARÊNQUIMA RADIAL**

LAVRAS – MG

2016

ÁUREO APARECIDO ABREU JÚNIOR

**MUDANÇAS EVOLUTIVAS NAS CURVAS DE NORMAS DE REAÇÃO
TÉRMICA AVALIADAS PELA DEPLEÇÃO DO AMIDO
ARMAZENADO NAS CÉLULAS DO PARÊNQUIMA RADIAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Madeira, área de concentração a Madeira como Matéria-Prima, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Sebastião Carlos da Silva Rosado

Orientador

Prof. Dr. Fábio Akira Mori

Coorientador

LAVRAS – MG

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Abreu Júnior, Áureo Aparecido.

Mudanças evolutivas nas curvas de normas de reação térmica
avaliadas pela depleção do amido armazenado nas células do
parênquima radial / Áureo Aparecido Abreu Júnior. – Lavras :
UFLA, 2016.

58 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador(a): Sebastião Carlos da Silva Rosado.
Bibliografia.

1. Corante vermelho neutro. 2. Estresse térmico. 3. Embolismo.
4. Cavitação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

ÁUREO APARECIDO ABREU JÚNIOR

**MUDANÇAS EVOLUTIVAS NAS CURVAS DE NORMAS DE REAÇÃO
TÉRMICA AVALIADAS PELA DEPLEÇÃO DO AMIDO
ARMAZENADO NAS CÉLULAS DO PARÊNQUIMA RADIAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Madeira, área de concentração a Madeira como Matéria-Prima, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de março de 2016.

Prof. Dr. Sebastião Carlos da Silva Rosado UFLA

Profa. Dra. Vássia Carvalho Soares IFMG-BAMBUÍ

Prof. Dr. Paulo Fernando Trugilho UFLA

Prof. Dr. Sebastião Carlos da Silva Rosado
Orientador

Prof. Dr. Fábio Akira Mori
Coorientador

LAVRAS – MG

2016

*A Áureo, meu pai; a Nilva, minha mãe e à Simone,
minha irmã, por todo carinho e zelo familiar.*

*Aos meus amigos e parceiros da UFLA,
por toda confiança e companheirismo.*

*Em especial, a Yasmim,
minha grande e eterna companheira.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Madeira, pela oportunidade concedida na realização deste trabalho.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À empresa Bela Vista Florestal que forneceu as mudas de cedro australiano para a realização do experimento.

Aos Professores, Dr. Sebastião Carlos da Silva Rosado e Professor Dr. Fábio Akira Mori, por toda assessoria, durante os últimos semestres, orientação, amizade, profissionalismo, paciência, dedicação e por todo conhecimento compartilhado para realização deste trabalho e do meu crescimento profissional.

Aos professores Dr. Paulo Fernando Trugilho, Dra. Vássia Carvalho Soares e Dr. José Tarcísio Lima que se disponibilizaram a participar como membros da banca de defesa do mestrado, acrescentando valiosas informações.

Aos amigos da UFLA pela preciosa ajuda na condução do experimento e pelo companheirismo.

A Deus, que me deu forças para perseverar na continuação dos estudos acadêmicos.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

*“Nunca, jamais desanimeis embora venham ventos contrários.”
(Santa Paulina)*

RESUMO

Uma maneira de relacionar as respostas fisiológicas das plantas aos estresses térmicos é pela quantificação das células com amido remanescente, decorrente da sua despolimerização em açúcares simples que serão utilizados para reparar danos aos vasos embolizados do xilema. A compreensão da dinâmica dessa depleção poderá ser feita, por meio do uso de modelos estatísticos, que estabelecem curvas de performance térmica ou normas de reação térmica. O presente estudo objetivou quantificar as células do parênquima radial que possuíam reservas de amido remanescentes, para avaliar as mudanças nas curvas das normas de reação térmica (NRT), em resposta a aumentos de temperatura, induzidos no caule de mudas de *Toona ciliata*, sob diferentes escalas de tempo, além de avaliar as variações nas curvas da NRT de diferentes clones de *Toona ciliata*, bem como se essas variações são, predominantemente, genéticas e herdáveis. Foi utilizado um protocolo de indução de calor, no caule das mudas, cortes anatômicos e coloração com vermelho neutro, para o clone BV1120, que foi utilizado como modelo para ajustes polinomiais de terceiro grau das curvas de NRT. Após esses ajustes e validação dos modelos com lignotubers da espécie *Eucalyptus urophylla*, foi definido o tempo para depleção de 50% (td_{50}) dos estoques de amido por tratamento térmico pela derivada de cada modelo ajustado, podendo, assim, comparar o comportamento para os outros cinco clones, o BV1110, BV1121, BV1151, BV1210 e BV1321. Os ajustes tiveram valores de R^2 acima de 85% e os resultados indicaram que o clone BV1110 apresentou maior estoque remanescente de amido, em todos os tratamentos térmicos, enquanto o clone BV1210 apresentou o menor estoque. Essa variação nos conteúdos remanescentes de amido é altamente hereditária, acima de 97% e indica que os genes que controlam essa característica estão fixados na população e que seleções podem aumentar a tolerância às alterações da temperatura do ambiente.

Palavras-chave: Corante vermelho neutro. Estresse térmico. Embolismo. Cavitação.

ABSTRACT

A simple method to conduct a relationship between physiological responses of plants and thermal stresses is by quantifying the number of parenchyma cells with remaining starch, which are depolymerized and transformed in simple sugars and move towards embolized vessels in order to refill them. The knowledge from the dynamic of this depletion can be achieved by using statistical models such as thermal performance curves (TPC). The aim of this study was to quantify radial parenchyma cells with residual starch storages in order to evaluate changes in TPC in response to increases in temperature in seedlings of *Toona ciliata*, in different treatments of combining time and temperature, therefore to evaluate variations in the TPC and to understand whether these changes are over genetic and inherit control. We used a protocol of heat induced in the stems of the seedlings, anatomical cuts and staining with neutral red for the clone BV1120, which was used as model to fit polynomial curves of TPC. After these mathematical fits and validation of these models with lignotubers from the specie *Eucalyptus urophylla*, we defined a depletion time of 50% (td_{50}) from the starch storage for each thermal treatment, so we could compare the performance for the others five clones: BV1110, BV1121, BV1151, BV1210 and BV1321. The R^2 values were all above 85%. Results indicated that clone BV1110 had the biggest starch storage in all thermal treatments, in contrast to the clone BV1210 that had the lowest values for starch storage. The variation of the starch content is highly heritable and it shows that genes, which have the control of this feature, are already fixed in the population. Thus, selections can improve the tolerance of these clones to temperature alterations on the environment.

Keywords: Neutral red stain. Thermal stress. Embolism. Cavitation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - A) corte anatômico (8 μ m) da seção transversal apresentando a conexão entre a estrutura do caule e o lignotuber (Lig); B) corte anatômico (8 μ m) da seção transversal do lignotuber evidenciando as gemas (setas) e a natureza contorcida dos elementos anatômicos. Barra: 10 μ m.....19
- Figura 2 - Reservas de amido nas células do parênquima radial coradas em vermelho pelo corante vermelho neutro (setas). A e B) Cortes transversais (8 μ m) do lignotuber e detecção de grande quantidade de depósitos de amido nas células do parênquima radial; C a F) detecção de amido nas células do parênquima radial (células coradas em vermelho) do clone BV1120 com aplicação dos tratamentos térmicos variáveis em intensidade e exposição: 47,5°C/150min (C), 50°C/120min (D), 52,5°C/72min (E), 55°C/30min (F).....36
- Figura 3 - Curvas de depleção de amido nas células do parênquima radial da região do floema, ajustadas para o clone BV1120, utilizado como modelo para avaliação dos tempos de exposição que causam 50% de depleção do amido (td₅₀). Os td₅₀ para as temperaturas de 47,5; 50,0; 52,5 e 55,0°C foram, respectivamente, de 150; 120, 72 e 30 minutos. O td₅₀ para o estoque de amido nas células do parênquima radial de lignotubers de *Eucalyptus urophylla* não foi alcançado no tempo de estudo.39
- Figura 4 – Comportamento das células do parênquima radial com amido remanescente e da glicose nos lignotubers de *E. urophylla* para o tratamento térmico de 55°C.41

Figura 5 - Curvas das normas de reação térmica para células do parênquima radial após depleção dos estoques de amido para o clone BV1120 (modelo) de *Toona ciliata* quando submetidas às temperaturas de 47,5° C (A), 50,0° C (B), 52,5° C (C) e 55° C (D). A depleção de amido nos seis clones de *T. ciliata* quando submetidos aos td_{50} nas temperaturas estudadas estão destacadas nos gráficos. Em D nota-se a curva de depleção de amido no lignotuber de *Eucalyptus urophylla* (estrutura e espécie para validação dos modelos).....46

Figura 6 - Representação gráfica conjunta do comportamento de clones de *Toona ciliata* sob o efeito de indução de aquecimento para um td_{50} avaliado para o clone modelo BV1120, nos respectivos tratamentos térmicos: 47,5° C/ td_{50} =150min, 50,0° C/ td_{50} =120min, 52,5° C/ td_{50} =72min e 55,0° C/ td_{50} =30min.47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resumo da análise de variância para regressão polinomial de terceiro grau em diferentes tratamentos térmicos (T) aplicados ao clone BV1120 e Lignotuber (Ligno.).....	39
Tabela 2 -	Resumo das análises de variância conjunta para os clones 1 ao 6 e estimativas dos parâmetros genéticos e fenotípicos para os tratamentos térmicos: 47,5°C/150min (T1), 50°C/120min (T2), 52,5°C/72min (A3), 55°C/30min (T4).....	43
Tabela 3 -	Resumo do teste de médias para os seis clones nos ambientes: 47,5°C/150min (T1), 50°C/120min (T2), 52,5°C/72min (T3), 55°C/30min (T4).....	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	<i>Toona ciliata</i>	17
2.2	Lignotuber	17
2.3	Estresse térmico e fisiologia do estresse	20
2.4	Escaldadura solar	24
2.5	Vermelho neutro	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Primeira Etapa – Estimativa do tempo para 50% de depleção dos estoques de amido (td_{50})	28
3.2	Segunda etapa – Teste com glicosímetro	31
3.3	Terceira etapa – Avaliação do comportamento dos clones em suas respectivas td_{50}	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
4.1	Estimativa do tempo para 50% de depleção dos estoques de amido (td_{50})	37
4.2	Teste com glicosímetro	40
4.3	Avaliação do comportamento dos clones em suas respectivas td_{50}	42
5	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

O recente relatório sobre mudanças climáticas globais, publicado pelo Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC, 2014), apresenta informações científicas suficientes para indicar que a temperatura da superfície terrestre poderá aumentar, significativamente, durante o século 21.

Nesse relatório, há relatos de cientistas responsáveis por simulações de aquecimento global, em diferentes cenários de emissões de poluentes atmosféricos e projeta-se um aumento da temperatura superficial terrestre entre 0,3 e 0,7°C, para o período compreendido entre 2016 e 2035, que, de certa forma, influenciará, fortemente, a frequência e a duração das ondas de calor, com importantes reflexos nos regimes de precipitação hídrica em diferentes regiões do planeta.

Previsões são de que essas mudanças climáticas afetarão, diretamente, a dinâmica dos ecossistemas terrestres, aumentando os riscos para a segurança alimentar, geração de produtos florestais e para a manutenção dos serviços ambientais. Os principais estudos revisados por Allen et al. (2010) enfatizam os efeitos dessas mudanças, causando estresses fisiológicos, que podem desencadear uma série de eventos que elevam a mortalidade de árvores.

Os aumentos contínuos na temperatura, acima do grau ótimo, poderão colocar as plantas sob condições de estresses térmicos que alteram a homeostase celular normal, constituindo-se numa significativa ameaça para a produtividade primária nos ecossistemas. As plantas sob essas condições de estresse poderão ter alterações nos seus metabolismos, modificando, principalmente, as atividades enzimáticas envolvidas na síntese de carbono e acumulação de amido (MATHUR; AGRAWAL; JAJOO, 2014).

Uma maneira de relacionar as respostas fisiológicas das plantas aos estresses térmicos é pela quantificação das células do parênquima radial com amido remanescente, na qual a depleção do amido é resultante de sua

despolimerização em açúcares simples que serão utilizadas para reparar danos aos vasos embolizados do xilema. A compreensão da dinâmica dessa depleção pode ser realizada por meio do uso de modelos estatísticos que estabelecem curvas de performance térmica.

Essas curvas, também, denominadas de normas de reação térmica (NRT) são ajustadas para descrever os efeitos da temperatura sobre um determinado processo biológico que se deseja quantificar. O conhecimento das NRT está sendo amplamente utilizado para prever as respostas dos organismos às recentes mudanças climáticas.

Os estudos que geram esse conhecimento, normalmente, são conduzidos em condições de laboratório, onde as temperaturas são aumentadas em diferentes níveis (KNIES et al., 2006). Schulte, Healy e Fangue (2011) sugerem que, nos estudos das NRT, mesmo que em condições laboratoriais, também, sejam consideradas as escalas de tempo de exposição ao calor induzido e, assim, simular as condições de mudanças climáticas mais próximas às que ocorrem na natureza.

Complementarmente, esses autores, ainda, afirmam que os atuais processos envolvidos nos mecanismos de respostas dos organismos às mudanças de temperatura não são completamente compreendidos, principalmente, pelas complexas relações entre a temperatura e a outros fatores bióticos e abióticos associados.

Sears e Angilletta Junior (2011) sugerem que as pesquisas científicas, relacionadas às mudanças climáticas, devem identificar as características peculiares dos indivíduos que estão sobre seleção, além de documentar as variações genéticas e da plasticidade fenotípica e, ainda, considerar como essas características influenciam desde os processos dentro de suas populações até ao nível de ecossistemas.

Em uma visão mais holística das NRT, quando se considera o fenômeno da cavitação/embolismo dos vasos do xilema, pode-se conjecturar que o amido armazenado nas células do parênquima radial é o precursor dos reparos dos vasos colapsados e que a depleção de suas reservas nesse tecido pode tornar as mudanças nas NRT mais compreensíveis.

O presente estudo objetivou, portanto quantificar, em termos percentuais, as células do parênquima radial com reservas de amido remanescentes, para avaliar as mudanças nas curvas das NRT, em resposta a aumentos de temperatura, induzidos no caule de mudas de *Toona ciliata*, sob diferentes escalas de tempo. Esse estudo, também, objetivou avaliar as variações nas curvas da NRT de diferentes clones de *Toona ciliata*, bem como se essas variações são, predominantemente, genéticas e herdáveis.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Toona ciliata*

A espécie *Toona ciliata* (M. ROEMER) var. *australis*, popularmente conhecida como cedro australiano, pertence à família *Meliaceae*, uma angiosperma natural da região sudeste asiática, sendo a variedade *australis* encontrada na Austrália, em uma região de clima tropical que é distribuída de norte ao sul de toda a extensão da costa leste do país (LAMPRECHT, 1990).

Por possuir um rápido crescimento e incremento de biomassa, além de apresentar um fuste retilíneo, a destinação principal dessa madeira é para fins nobres como o uso para madeira serrada. É uma árvore decídua e pode atingir altura de 40 m e, aproximadamente, 1,5 m de DAP (SOUZA; BARROSO; CARNEIRO, 2010).

Ela foi introduzida, no Brasil, pela sua fácil adaptação edafoclimática, como uma espécie potencial para substituir o mogno (*Swietenia macrophylla*) e os cedros brasileiros (*Cedrela fissilis* e *Cedrela odorata*), já que esses são suscetíveis ao ataque da praga *Hypsipyla grandella* Zeller, popularmente conhecida como praga dos ponteiros, que prejudica a produção no território nacional (MANGIALAVORI et al., 2003).

A espécie necessita de uma precipitação média anual superior a 1000 mm, pois precisa de grande disponibilidade de água devido ao seu rápido crescimento. As temperaturas ideais de crescimento estão em torno de 20 a 26°C, tolerando baixas temperaturas. O plantio em solos ácidos requer correção do pH e boa disponibilidade de cálcio, além de outros nutrientes essenciais para o desenvolvimento da espécie (SOUZA; BARROSO; CARNEIRO, 2010).

2.2 Lignotuber

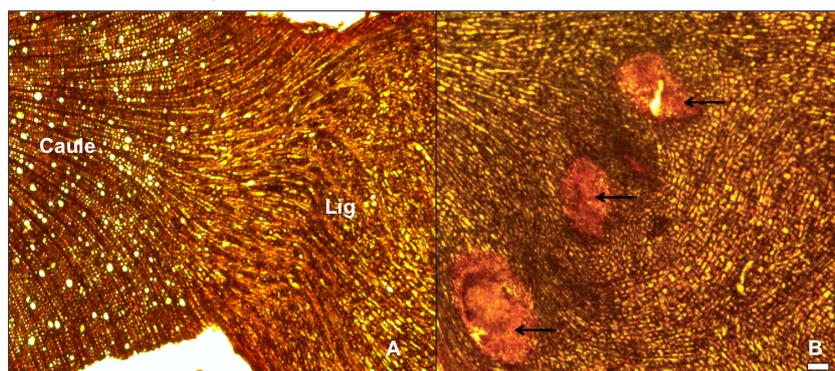
Kerr (1925) foi o primeiro autor que procedeu a um estudo mais detalhado a respeito dos lignotubers em espécies do gênero *Eucalyptus*. A

maioria das espécies deste gênero apresenta tal estrutura, a qual confere uma elevada importância, para suas espécies, por servir como um órgão de reserva de nutrientes e de alta capacidade regenerativa após certos tipos de distúrbios ambientais, que ocorrem, principalmente, nos estágios iniciais de desenvolvimento das plantas (KERR, 1925; MIBUS; SEDGLEY, 2000).

Morfológicamente, os lignotubers se assemelham a pequenas estruturas lenhosas laterais ao caule das mudas, apresentando-se de forma arredondada, logo acima da região do coleto. O termo lignotuber provém da sua característica morfológica e estrutural; o prefixo “ligno” é por sua estrutura lignocelulósica, ou seja, por sua natureza lenhosa e o sufixo “tuber” é característico da sua semelhança com pequenos tubos (KERR, 1925).

Anatomicamente, o tecido do lignotuber é constituído de células muito semelhantes com as encontradas no caule e apresenta um grande número de gemas dormentes de origem cambial, porém Bamber e Mullette (1977) relataram a presença do dobro da quantidade de células de parênquima axial e cerca de metade a mais de fibras e fibrotraqueídes, quando comparadas ao tecido do caule, em um estudo anatômico de lignotubers da espécie *E. gummifera*. O conjunto desses elementos anatômicos se apresenta de maneira contorcida, como se pode observar na Figura 1.

Figura 1 - A) corte anatômico (8 μ m) da seção transversal apresentando a conexão entre a estrutura do caule e o lignotuber (Lig); B) corte anatômico (8 μ m) da seção transversal do lignotuber evidenciando as gemas (setas) e a natureza contorcida dos elementos anatômicos. Barra: 10 μ m.



Fonte: Do autor (2016).

Os grãos de amido são muito abundantes nos tecidos dos lignotubers e estão, geralmente, armazenados nas células parenquimáticas do xilema contorcido, podendo, também, ser encontrados no córtex ou na medula do tronco, variando entre espécies (BAMBER; MULLETTE, 1977). A concentração de amido nos amiloplastos nos lignotubers diminui à medida que a planta está exposta ao estresse térmico, por exemplo. Provavelmente, essa reserva é convertida em açúcar livre para manutenção e controle do vegetal sobre uma situação adversa. Após a retirada do fator estressante à planta, seu metabolismo retorna ao normal, convertendo açúcar livre em amido e estocando nos seus órgãos de reserva (KERR, 1925).

Os lignotubers possuem uma característica ontogenética, ou seja, estão presentes desde os estágios iniciais de desenvolvimento da planta até suas fases fenológicas mais avançadas, ao contrário do que se acreditava que essa indução da formação dos lignotubers devia-se ao fato de repetidos distúrbios ou

infecções nas plantas (KERR, 1925). Essa característica genética foi confirmada em um experimento, realizado por Shepherd et al. (2008), com híbridos da família Myrtacea, no qual os autores relataram uma grande herdabilidade (aproximadamente, 90% das mudas híbridas do gênero *Corymbia*, em sua segunda geração, apresentavam lignotubers) e o multicontrolado gênico, na expressão dessa característica, nos seus descendentes.

Evidências arqueológicas em fósseis de plantas do período Mesozoico levam a crer que as características ligadas às adaptações ao fogo como, por exemplo, a característica regenerativa de rebrota dos lignotubers possam ser originárias de processos evolutivos em plantas típicas de regiões áridas com regimes de incêndios e, em algumas linhagens, essas características persistem até o presente. Entretanto a distinção entre adaptações necessariamente ligadas à frequência do fogo ou exceções originárias em resposta a outros fatores, ainda, é difícil de ser determinada (KEELEY et al., 2011).

2.3 Estresse térmico e fisiologia do estresse

O estresse térmico pelo calor ocorre, quando a temperatura das plantas alcançam valores acima da temperatura considerada ótima, levando a um desequilíbrio da homeostase e diminuindo o crescimento e desenvolvimento vegetativo (MATHUR; AGRAWAL; JAJOO, 2014).

Para evitar que o estresse térmico, associado ao consequente estresse hídrico, intensifique-se, para causar danos irreversíveis, as plantas podem responder, fisiologicamente, de duas maneiras: evitando os efeitos desses estresses pelo fechamento dos estômatos até um limite que minimize a transpiração, ou tolerando a deficiência hídrica do solo, pelo fechamento menos severo dos estômatos, mas que, ainda, permita o prosseguimento do processo de transpiração (MCDOWELL et al., 2008).

A primeira estratégia protege o xilema da cavitação por evitar baixos potenciais hídricos, mas pode causar um déficit de carbono pela respiração excessiva das plantas que continua reduzindo as reservas de carbono, mesmo com a fotossíntese estagnada pelo fechamento dos estômatos. Enquanto a segunda estratégia mantém o ganho de carbono, porém aumenta muito o risco de cavitação, que pode matar as árvores diretamente ou aumentar as chances futuras de déficits de carbono (ALLEN et al., 2010).

McDowell et al. (2008) postularam três mecanismos mutuais não exclusivos pelos quais o estresse hídrico, ocasionado pela seca, pode levar a uma larga escala de mortalidade florestal: (1) eventos extremos de seca e calor matam árvores por cavitação de água dentro dos vasos do xilema; (2) eventos prolongados de estresse hídrico elevam o déficit de carbono e limitações do metabolismo, reduzindo a habilidade da planta em se defender contra ataques dos agentes biológicos; (3) longos períodos de calor, durante a seca, podem aumentar a abundância populacional desses agentes biológicos, tornando-os dominantes sobre as plantas estressadas. Dessa forma, os autores ressaltam que compreender o grau com o qual as árvores regulam a perda hídrica, durante eventos de seca, pode explicar os padrões de produção de carboidratos e subsequente suscetibilidade a seca ou ataques biológicos.

Um dos fatores importantes, para essa resposta fisiológica, é o estágio de maturidade da planta, pois ela varia conforme as características pertinentes a cada estágio fenológico do vegetal. Esses efeitos dependem, ainda, dos genótipos de cada espécie devido às variações intra e interespecíficas (SAKATA; HIGASHITANI, 2008).

Quando a necrose ocorre, ao longo de toda circunferência da planta no caule (anelamento), ela impede o fluxo descendente de seiva elaborada, ocasionando a morte do caule pela subnutrição das raízes (KRAMER; KOZLOWSKI, 1960; NOBEL, 2009).

Ducrey et al. (1996), estudando as respostas ecofisiológicas e de crescimento de *Pinus halepensis*, durante 7 meses após indução de calor na base dos troncos, notaram queda na taxa de fotossíntese líquida e condutância estomática, no primeiro mês, após o tratamento térmico. O aquecimento do caule pode causar a mortalidade dentro de semanas, porém as árvores totalmente necrosadas, nessa região vascularizada, podem sobreviver por determinado período até que suas reservas de carbono, localizadas nas raízes, sejam estagnadas.

Em incêndios florestais, o fogo pode causar mortalidade das plantas pela redução da condutividade de seiva pelo xilema, porém os mecanismos de como esse processo ocorre, ainda, é pouco conhecido (DUCREY et al., 1996). Michaletz, Johnson e Tyree (2012) assumiram duas hipóteses para a ocorrência da mortalidade das árvores pela necrose no câmbio: a cavitação e deformação dos vasos condutores de seiva bruta, assumindo que esses dois mecanismos reduzem a condutividade do xilema pelo aumento demasiado da temperatura.

A deformação da estrutura dos vasos condutores ocorre quando a temperatura atinge certo limite de viscoelasticidade dos componentes da parede celular (WOLCOTT; KAMKE; DILLARD, 1990). A lignina, por exemplo, apresenta o começo de sua transição vítrea entre 60 a 90°C, permitindo o movimento das microfibrilas celulósicas, para o interior dos vasos condutores, dificultando o fluxo hidráulico (HILLIS; ROZSA, 1985). Essa deformação passa a ser permanente, após o resfriamento da célula aquecida, diminuindo a condutividade do xilema.

O problema da cavitação ocorre quando as forças de tensão e coesão da água no interior dos vasos são quebradas e o ar entra e preenche os espaços ocupados anteriormente pela água, ocorrendo, então, o seu embolismo, impedindo o fluxo hidráulico ascendente. Para compensar esse problema, momentaneamente, as plantas podem utilizar os vasos não obstruídos (TRIFILÒ

et al., 2008), porém o acúmulo de vários embolismos, durante períodos prolongados de seca, levam à falha da condutividade hidráulica do xilema e à morte da planta (BRODRIBB; COCHARD, 2009).

Para a prevenção do embolismo dos vasos e garantir a sobrevivência, as plantas adotam uma ou mais das seguintes estratégias: o controle da abertura dos estômatos e a produção de novo vaso do xilema e/ou a reversão do embolismo pelo preenchimento do espaço ocupado pelos gases com água (NARDINI; LO GULLO; SALLEO, 2011).

Os mecanismos pelos quais a reversão do embolismo ocorre, ainda, não são totalmente compreendidos, porém Nardini, Lo Gullo e Salleo (2011) sugerem uma forte teoria em que o acúmulo de amido que, aparentemente, é uma consequência da fotossíntese diurna, torna-se um pré-requisito para o preenchimento do xilema comprometido pelo embolismo em plantas estressadas pela seca.

Os autores, ainda, evidenciam que a teoria pode ser confirmada pelo seguinte processo: o embolismo/cavitação gera vibrações, na parede celular do vaso, que são transmitidas para as células adjacentes e estimulam a liberação e concentração de Ca^{2+} no citoplasma. Como consequência desse sinal metabólico, ocorre uma despolimerização do amido em açúcares simples que são direcionados para reparar os danos nos vasos cavitados, gerando, assim, uma pressão osmótica que força o reabastecimento dos vasos cavitados com água, ou seja, há uma depleção das reservas de amido presentes nas células do parênquima radial, as quais funcionam como um dreno de açúcar e água provenientes do floema que serão direcionados para os vasos cavitados até seu total reenchimento com água e sua completa desobstrução.

2.4 Escaldadura solar

A escaldadura solar aparece como um termo bastante diverso entre os pesquisadores. Segundo Barber e Sharpe (1971), há três tipos de escaldadura solar: as causadas por danos térmicos, as causadas por radiação ultravioleta e aquela causada por fotodinâmica de tecidos aquecidos.

Para Ropollo Junior e Miller (2001), a escaldadura solar é definida como a morte do câmbio e da casca, nas faces sul e sudoeste das árvores, que estão no hemisfério norte pelas rápidas flutuações de temperatura durante o final da estação do inverno. Essa ocorrência se dá pelo descongelamento dos tecidos das árvores, nessas respectivas faces, pelo aquecimento fornecido pela luz solar durante o dia e depois pelo rápido congelamento após a queda de temperatura brusca pelo pôr do sol (MANION, 1991; SINCLAIR; LYON; JOHNSON 1987; TATTAR, 1989).

Alguns pesquisadores, ainda, dividem a terminologia entre “queimadura solar” e “escaldadura solar” como, por exemplo, a Sociedade Americana de Fitopatologia (ASP), que define “queimadura solar” como o dano causado pela radiação solar à fruta, enquanto o termo “escaldadura solar” é definido como a lesão da casca e dos tecidos subsuperficiais causada por radiação solar, seguida por congelamento, durante o inverno (JONES; ALDWINCKLE, 1990). Para o presente trabalho, será considerada escaldadura solar as lesões ocasionadas na casca e tecidos subsuperficiais da casca, após exposição à radiação solar, em temperaturas consideradas letais ao tecido cambial.

Muitas pesquisas relacionam a morte do câmbio vascular, por meio de elevadas temperaturas alcançadas em incêndios florestais, como o estudo de Dickinson e Johnson (2004), que simularam incêndios superficiais no tronco de árvores e determinaram que a morte do tecido vascular ocorria em torno dos 60°C. Porém poucas são as pesquisas que foram dedicadas, exclusivamente, aos efeitos da escaldadura solar, como Levitt (1956), afirmando que as temperaturas

limites, para causarem danos às plantas, variam de 45 a 55°C, enquanto Kozłowski (1979) ressalta que esse limite pode se estender até os 60°C.

Uma das características determinantes, para que ocorra a escaldadura, é a espessura da casca, pois ela pode agir como um material isolante ou até mesmo como um armazenador de energia que conduz o calor após a diminuição da temperatura. Os caules de árvores mais finas, ou seja, as árvores mais jovens tendem a sofrer mais com os efeitos da escaldadura solar, assim como as árvores que se encontram nas bordas, após rápida exposição à radiação solar (SAVAGE, 1970).

As lesões causadas por escaldadura solar afetam o transporte de seiva elaborada, visto que o floema, em grande parte das espécies vegetais, está disposto sob a casca, influenciando, assim, na condução da seiva para as raízes logo abaixo da região lesionada, o que pode causar um desequilíbrio, na produção de biomassa, além de queda na qualidade da madeira formada nesta região. Além disso, outro fator preocupante é a entrada de pragas e patógenos florestais nas áreas lesionadas pela facilidade de acesso aos recursos biológicos das plantas (SHIGO, 1979), que podem intensificar os efeitos do apodrecimento e, conseqüentemente, acentuar a queda da produção de madeira.

2.5 Vermelho neutro

O vermelho neutro é um corante de fórmula química conhecida (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina), amplamente utilizado em estudos biológicos por, aproximadamente, um século e pela sua baixa toxidez tem sido muito utilizado em estudos fisiológicos de crescimento de raízes (DUBROVSKY et al., 2006).

Por ser um corante vital, com alta capacidade de atravessar a membrana celular, acumula-se, em células viáveis, principalmente, nos vacúolos, os quais possuem grandes depósitos de amido (TIMMERS; TIRLAPUR; SCHEL, 1995).

O acúmulo nos vacúolos pode, também, ocorrer por interações do corante com substâncias fenólicas presentes e células do floema, as quais aparentam coloração em suas estruturas globulares ou dendríticas internas (STADELMANN; KINZEL, 1972).

Didden-Zopf e Nobel (1982) estudaram a tolerância a altas temperaturas e aclimação ao calor para uma espécie de Cactácea, variando os tratamentos térmicos (diferentes temperaturas e tempos) e analisaram a viabilidade de células do clorênquima, por meio da avaliação de injúrias, decorridas pelo calor com o corante vermelho neutro, por sua propriedade em corar apenas células vivas, enquanto células mortas não acumularam esse corante ou foram plasmolisadas. Os autores observaram que, com o aumento de temperatura e tempo, a porcentagem de células coradas com vermelho neutro começou a diminuir aos 45°C e, praticamente, inexistiu aos 60°C.

Dickinson e Johnson (2004), também, utilizaram o corante vermelho neutro, para avaliar a mortalidade de células cambiais, após ensaios laboratoriais a elevadas temperaturas, assim, puderam ajustar modelos não lineares de quatro espécies florestais de coníferas. Mesmo utilizando poucas espécies, os autores constataram diferenças significativas entre as taxas de sobrevivência de células cambiais entre as espécies analisadas após os tratamentos térmicos que variaram entre 43°C e 60°C.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As mudas clonais de *Toona ciliata* (M. ROEMER) var. *australis* foram cultivadas, durante um ano, compreendendo o período de novembro de 2014 a outubro de 2015, no viveiro da empresa Bela Vista Gestão Florestal Ltda., localizado no município de Campo Belo, Minas Gerais, latitude 20° 53' S, longitude 45° 16' W e altitude média de 945 m. Segundo a classificação climática de Köppen, o clima da região é classificado como Cwa: subtropical, úmido e mesotérmico. A região apresenta uma temperatura média anual de 20,5°C e precipitação média anual de 1406 mm.

Os clones utilizados no experimento: BV1110, BV1120, BV1121, BV1151, BV1210 e BV1321 possuem registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sob os números 31617, 31618, 31616, 31615, 31614 e 31613, respectivamente. Essas cultivares têm como mantenedor a empresa Bela Vista Gestão Florestal Ltda.

As mudas dos seis clones de *Toona ciliata* (M. ROEMER) var. *australis* foram produzidas em tubetes de polietileno de 55 cm³ preenchidos com substrato composto por vermiculita e casca de arroz carbonizada na proporção de 3:1 (v:v). As mudas experimentais de cada clone foram separadas, por meio de padronização por tamanho, com os valores médios de altura de 25 cm e diâmetro do coleto de 1 cm.

Os tratos culturais foram realizados, durante os 12 primeiros meses, em que foram procedidos: à eliminação manual de ervas daninhas e fertirrigação por microaspersão por bicos com vazão de 300 L.hora⁻¹, espaçados de 4 x 4 m. Foram utilizadas sete turnos de irrigações diárias, sendo cada turno de 6 minutos de microaspersão.

Foi ajustada, para a fertirrigação, uma solução nutritiva que continha (mg.dm⁻³): 80 de N, 200 de P, 150 de K, 50 de S, 75 de Ca, 15 de Mg, 0,5 de B, 1,5 de Cu e 5,0 de Zn. As fontes dos nutrientes foram os seguintes sais:

Ca(H₂PO₄)₂·2H₂O, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, K₂SO₄, NH₄H₂PO₄, KNO₃, H₃PO₄, Ca(NO₃)₂·4H₂O, Mg(NO₃)₂·6H₂O, (NH₄)₂SO₄, CaSO₄·2H₂O, H₃BO₃, CuCl₂, ZnCl₂, NH₄NO₃, conforme adaptação realizada por Moretti et al. (2011).

Após esse período de 12 meses, as mudas foram levadas ao campus da Universidade Federal de Lavras – UFLA, localizado no Município de Lavras, Minas Gerais e acondicionadas, no viveiro florestal do campus, em pleno sol e com irrigações diárias uniformes, até começarem as pesquisas laboratoriais que foram conduzidas, no período de novembro de 2015 a janeiro de 2016, para quantificar as células do parênquima radial, quanto aos níveis de depleção nos seus estoques de amido, em função do tratamento de indução de aquecimento do caule dos clones estudados. O estudo foi dividido em três etapas, que serão discutidas a seguir.

3.1 Primeira Etapa – Estimativa do tempo para 50% de depleção dos estoques de amido (td₅₀)

Na primeira etapa, dos seis clones de *Toona ciliata* (M. ROEMER) var. *australis* foi escolhido, aleatoriamente, o clone BV1120, para determinar a estimativa do tempo para 50% de depleção dos estoques de amido (td₅₀), avaliados pela quantificação das células do parênquima radial com estoque de amido remanescente, como descrito a seguir.

No laboratório, as mudas foram separadas de acordo com o tratamento de indução de calor. Os tratamentos térmicos escolhidos foram 55°C, 52,5°C, 50°C e 47,5°C. O tratamento térmico de 55°C serviu de limite, para comparação com estudos de incêndios florestais, os quais definem essa temperatura como um valor inicial para a necrose no tecido cambial (BROWN; DEBYLE, 1987; GUTSELL; JOHNSON, 1996). Para cada um dos quatro tratamentos térmicos, foram designados diferentes tempos, sendo eles: 0, 10, 20, 30, 40 e 50 min, para a temperatura de 55 °C; 0, 20, 40, 60 e 80 min, para a temperatura de 52,5°C; 0,

40, 60, 80, 100, 120 e 140 min para a temperatura de 50°C; e 0, 30, 60, 90, 120 e 150 min para a temperatura de 47,5°C. O tempo zero representou o controle de cada tratamento.

A variação dos tempos, em função de cada temperatura escolhida, foi pelos pré-testes realizados no laboratório, pois se verificou que, para cada temperatura, a depleção de amido se comportava diferentemente, ou seja, para maiores temperaturas, os intervalos de tempos, para resposta da depleção do amido, foram mais rápidos do que para os tratamentos realizados com menores temperaturas, em que foram utilizados maiores intervalos de tempo.

No total, foram utilizadas 6x3=18, 5x3=15, 7x3=21 e 6x3=18 mudas, para os tratamentos térmicos de 55°C, 52,5°C, 50°C e 47,5°C, respectivamente, para que houvesse três repetições, para cada um dos tempos, utilizados em cada tratamento térmico.

Estando as mudas separadas no laboratório, foram cortadas a 1 cm abaixo e 3 cm acima do coleto e, imediatamente, as extremidades desses caules cortados foram seladas com um gel de silicone acético, de rápida cura, para evitar a perda de água durante o tratamento térmico. Essa vedação dos caules serviu para simular uma condição de fechamento dos estômatos quando em situações reais de elevado estresse térmico.

Os tratamentos térmicos foram induzidos, em uma estufa com ventilação mecânica (Famem® modelo 320E), a qual facilitava a manutenção da temperatura, durante os tempos de tratamento, evitando oscilações maiores que 0,5°C para manter a uniformidade dos tratamentos. Os caules vedados foram acondicionados em orifícios de um suporte de poliestireno expandido (isopor), escolhido para não conduzir calor aos caules por contato e garantir a uniformidade do tratamento térmico (convecção) sobre toda a região do coleto. Esse suporte era carregado com as três repetições das mudas para cada um dos tempos pré-estabelecidos de tratamento térmico.

Ao final de cada tratamento térmico em estufa, os caules foram, imediatamente, levados ao laboratório de Anatomia da Madeira da UFLA e cortados no micrótomo de deslize (Leica® Modelo Jung SM 2000), sendo os cortes realizados com espessura aproximada de 8µm. Os melhores cortes foram separados e corados por 8 min, em uma solução de vermelho neutro a 0,3 mM (0,01% por peso), dissolvida em 7 mM KH₂PO₄/Na₃PO₄ a pH 7,4, conforme padronizado por Stadelmann e Kinzel (1972) e, após serem corados, os cortes foram lavados em água corrente para se retirar o excesso de solução. Assim, as lâminas foram preparadas e, rapidamente, analisadas para se evitar a perda do material in vivo.

As lâminas foram analisadas pelo software WinCELL (Regent Instruments Inc., versão Pro 2001a), após serem microfotografadas por uma câmera (PixelINK® modelo PL-A662), acoplada ao microscópio (OLYMPUS® modelo BX41) na objetiva de 10x de aumento. Foram capturadas pelo menos 10 fotos de cada repetição, a fim de se ter uma média representativa das regiões dos parênquimas radiais externas ao xilema, os quais continham as células coradas. Para contagem das células coradas pelo vermelho neutro, foram estabelecidos campos visuais (1 mm²) aleatórios, para as tomadas das referidas fotos, estabelecendo, assim, um padrão na contagem das células coradas.

Para cada tratamento térmico, o tempo zero minuto (sem tratamento) foi tomado como um controle, contabilizado como 100%, para comparação dos dados obtidos, em cada tratamento térmico e tempo, a fim de se contabilizar as células do parênquima radial com estoque de amido remanescente (células coradas) em relação à testemunha, sendo expresso em percentagem (%) e servindo, portanto como indicativo da depleção do amido presente nessas células em função do tempo em cada tratamento térmico.

Para validação do uso do vermelho neutro, para contagens das células do parênquima radial com depósitos de amido remanescentes, bem como dos

ajustes das curvas de depleção de amido, para o clone modelo BV1120, foram utilizadas 15 mudas (3 repetições e 5 tempos) de *Eucalyptus urophylla* que continham lignotuber, com mesma idade e tratos silviculturais das mudas de cedro australiano e realizado um tratamento térmico de 55°C, nos tempos 0, 20, 40, 60 e 80 min, na região dos lignotubers, visto que essas estruturas vegetais apresentam elevado conteúdo de amido e são reservas de proteção das plantas contra estresses abióticos, principalmente, decorrentes de temperaturas elevadas como, por exemplo, em incêndios florestais (KERR, 1925; MIBUS; SEDGLEY, 2000).

Após a coleta dos dados de porcentagem de células com depósitos remanescentes de amido, em cada tratamento térmico, foram ajustados os modelos polinomiais, utilizando o software GENES (CRUZ, 2013). Em seguida, estimaram-se, por tratamento térmico, o tempo para depleção de 50% (td_{50}) das reservas de amido, nas células do parênquima radial, a partir da derivada dos modelos polinomiais.

3.2 Segunda etapa – Teste com glicosímetro

Para validação da hipótese de que o amido era convertido em açúcares simples (glicose), após os devidos tratamentos térmicos nos tempos pré-estabelecidos, foi repetido o mesmo procedimento utilizado na primeira etapa com o uso de outras 15 mudas (3 repetições e 5 tempos) de *Eucalyptus urophylla*, que continham lignotuber, com mesma idade e tratos silviculturais das mudas de cedro australiano, no tratamento térmico de 55°C, nos tempos 0, 20, 40, 60 e 80 min, na região dos lignotubers.

Após cada tempo no respectivo tratamento térmico escolhido, os caules eram, imediatamente, retirados da estufa, cortados ao meio e extraía-se a seiva remanescente com auxílio de um alicate comum, por meio da pressão gerada no caule. Apenas uma gota de seiva foi necessária para aferir os níveis de glicose

(mg/dL) em um glicosímetro (Accu-Chek Performa®), comumente utilizado para verificação dos níveis de glicose em humanos.

Após a coleta dos dados, foi realizado um ajuste de modelo exponencial, utilizando o software GENES (CRUZ, 2013), que serviu como comparação ao modelo polinomial utilizado, para avaliar os estoques de amidos remanescentes, também, nos lignotubers, para o tratamento térmico de 55°C, realizado na primeira etapa do experimento, com a finalidade de analisar o comportamento da amido e da glicose e verificar se o amido estocado (inicial) era convertido em açúcar simples (glicose) após os referidos tempos do tratamento térmico.

3.3 Terceira etapa – Avaliação do comportamento dos clones em suas respectivas td_{50}

Os td_{50} obtidos para cada tratamento de indução de calor na base do caule das mudas serviram de base para os tratamentos térmicos e comparação entre os seis clones de *T. ciliata* com relação à manutenção dos estoques de amido. Assim, foram realizados mais quatro tratamentos térmicos, cada um em seu td_{50} , aplicados nos cinco clones restantes (BV1110, BV1121, BV1151, BV1210 e BV1321), para saber o comportamento de cada um e compará-los entre si e com o clone utilizado como modelo, o BV1120.

Foram selecionadas 15 mudas por tratamento térmico em sua td_{50} , composto de 3 repetições para cada um dos 5 clones. Os procedimentos de aquisição e condicionamento das mudas, cortes dos caules, tratamentos térmicos, cortes no micrótomo, contagem das células coradas com estoque de amido remanescente (percentagem) seguiram os mesmos protocolos que foram descritos na primeira etapa do experimento.

Após a obtenção de todos os dados, processaram-se análises de variância conjunta e individuais, para cada tratamento térmico, estimativas dos parâmetros fenotípicos, genotípicos e ambientais, bem como teste de

comparação de médias de genótipos (clone), em cada tratamento térmico, segundo a metodologia de Scott e Knott (1974).

Na análise conjunta, os dados de porcentagem de células com estoque remanescente de amido, após tratamentos de tempo para uma td_{50} , foram submetidos à análise de variância, disposta em arranjo fatorial em um delineamento de blocos casualizado, com três repetições de uma planta (ramete) por parcela. Nesse fatorial, o primeiro fator foi constituído de seis genótipos (C): clones BV1110, BV1120, BV1121, BV1151, BV1210 e BV1321 e o segundo de quatro tratamentos térmicos (T): 47,5 °C, 50 °C, 52,5 °C e 55 °C, cada um dos T foram conduzidos em tempos de indução de calor específicos para um td_{50} , definido para o clone modelo BV1120.

Nessa análise conjunta, utilizou-se o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + C_j + TC_{(ij)} + B/T_{(ik)} + E_{ijk}$$

Em que: Y_{ijk} é o valor observado na $i^{\text{ésimo}}$ tratamento térmico (T), aplicado no $j^{\text{ésimo}}$ clone (C) do $k^{\text{ésimo}}$ bloco (B).

μ é a média geral observada.

T_i é o efeito da $i^{\text{ésimo}}$ tratamento térmico (efeito fixo); $i=1, 2, \dots, t$.

C_j é o efeito do $j^{\text{ésimo}}$ clone (efeito fixo); $j=1, 2, \dots, c$.

$TC_{(ij)}$ é o efeito da interação entre a $i^{\text{ésimo}}$ tratamento térmico e o $j^{\text{ésimo}}$ clone (efeito aleatório);

$B/T_{(ki)}$ é o efeito do $k^{\text{ésimo}}$ bloco dentro do $i^{\text{ésimo}}$ tratamento térmico (efeito aleatório) e

E_{ijk} é o erro aleatório e independente associado às observações Y_{ijk} .

As análises individuais, conduzidas para avaliar os efeitos de clones em cada tratamento térmico, foram conduzidas para um delineamento experimental de blocos ao acaso, com três repetições e uma planta (ramete) por parcela.

Nessas análises utilizou-se o modelo estatístico:

$$Y_{jk} = \mu + C_j + B_k + E_{jk}$$

Em que: Y_{jk} é o valor observado no $j^{\text{ésimo}}$ clone (C) do $k^{\text{ésimo}}$ bloco.

μ é a média geral observada.

C_j é o efeito do $j^{\text{ésimo}}$ clone (efeito fixo); $j=1,2, \dots, c$.

B_k é o efeito do $k^{\text{ésimo}}$ bloco (efeito aleatório), $k=1,2..b$ e

E_{ijk} é o erro aleatório e independente associado às observações Y_{ijk}

A análise de variância conjunta e individuais e as comparações entre médias foram feitas pelo software GENES (CRUZ, 2013). As estimativas dos parâmetros genéticos e fenotípicos como: ganho genético – ganho esperado com a seleção (intensidade de seleção 1 em 6 clones); CV_e – coeficiente de variação experimental; ϕ_F – componente quadrático fenotípico, σ_e^2 – variância ambiental; ϕ_c - componente quadrático genotípico; h^2 – coeficiente de determinação genotípico; CV_c – coeficiente de variação genética e, CV_c/CV_e – índice de variação foram realizadas, por meio das esperanças dos quadrados médios, conforme Cruz (2013).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Vários processos químicos para extração e quantificação do conteúdo total de amido em tecidos de plantas lenhosas são, amplamente, divulgados na literatura. Muitos desses processos são mencionados por Chow e Landhäusser (2004). Entretanto, quando se tem por objetivo a quantificação de células do parênquima radial do caule de plantas lenhosas com estoques de amido remanescente e que sofrem despolimerização, para formar açúcares simples solúveis, para reparo de vasos embolizados do xilema, como sugerem Bucci et al. (2003), Nardini, Lo Gullo e Salleo (2011) e Salleo et al. (2004), vários dos métodos propostos se baseiam em caracterizações anatômicas microscópicas feitas em cortes transversais coradas com corantes específicos que permitem a contagem de depósitos de amido, como, por exemplo, o iodo e a safranina (BELL; OJEDA, 1999; ISLAM; BEGUM, 2011, 2012; ORIBE; FUNADA; KUBO, 2003; VERDAGUER; OJEDA, 2002).

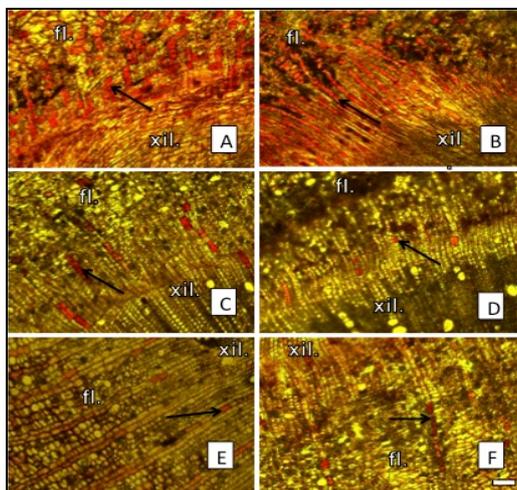
O corante vermelho neutro, de uso amplo na constatação de células vivas ou mortas, tem potencial para se estudar o conteúdo de vacúolos, tal como o amido, que é o principal componente de reserva de energia nas células do parênquima radial e fonte de carbono não estrutural (CHANTUMA et al., 2007; DIETZE et al., 2014). Por essa razão, ele pode ser, facilmente, utilizado para caracterizar necroses de tecidos de cambiais, quando as plantas se deparam com situações de incêndios florestais (DICKINSON; JOHNSON, 2004), ou de estresses de aquecimento causados por escaldaduras solares ou por frio intenso (MANION, 1991; SINCLAIR; LYON; JOHNSON, 1987; TATTAR, 1989).

Em estudo preliminar, o vermelho neutro mostrou-se adequado para evidenciar a depleção de estoques de amido presentes nas células do parênquima radial de *T. ciliata* (FIGURA 2-C a 2-F). Essa constatação preliminar foi validada, por meio dos cortes anatômicos de lignotuber de *E. urophylla*

(FIGURA 2-A e 2-B), que possuem, reconhecidamente, grandes fontes e reserva de amido (BAMBER; MULLETTE, 1977).

Os resultados, apresentados na Figura 2, mostram a qualidade das imagens, para a caracterização anatômica e contagem de células com amido remanescente, permitindo uma precisa e rápida contagem dessas células. Esses fatos possibilitaram a avaliação de grande número de amostras para, assim, obter um bom ajuste das curvas de normas de reação térmica, bem como para selecionar clones de *T. ciliata* com baixa depleção dos estoques de amido, quando submetidos a estresses térmicos.

Figura 2 - Reservas de amido nas células do parênquima radial coradas em vermelho pelo corante vermelho neutro (setas). A e B) Cortes transversais (8 μ m) do lignotuber e detecção de grande quantidade de depósitos de amido nas células do parênquima radial; C a F) detecção de amido nas células do parênquima radial (células coradas em vermelho) do clone BV1120 com aplicação dos tratamentos térmicos variáveis em intensidade e exposição: 47,5°C/150min (C), 50°C/120min (D), 52,5°C/72min (E), 55°C/30min (F).



Legenda: xil.: xilema; fl.: floema. Barra: 10 μ m.
Fonte: Do autor (2016).

Na Figura 2, também, são evidenciados os resultados positivos do processo de coloração de amostras obtidas em caules submetidos às diferentes temperaturas. Nota-se, na Figura 2-E, o esmaecimento da cor vermelha no interior de algumas células do parênquima radial bisseriado, sugerindo que tais células, possivelmente, estão em processo de despolimerização de seus estoques de amido. Dessa forma, elas não foram levadas em consideração na contagem como células coradas pelo vermelho neutro para evitar erros e padronizar a quantificação.

Os resultados deste estudo e ajustes das curvas de normas de reação térmica, como apresentados a seguir, foram validados pelos dados obtidos dos cortes transversais (testemunha), em lignotubers de *Eucalyptus urophylla* (FIGURA 2-A e 2-B), que exibiram a esperada grande quantidade de depósitos de amido que, reconhecidamente, traz benefícios às plantas, detentoras dessa estrutura, quando se deparam com fortes estresses ambientais (KERR, 1925; MIBUS; SEDGLEY, 2000).

4.1 Estimativa do tempo para 50% de depleção dos estoques de amido (td_{50})

Na primeira etapa do presente estudo, após serem realizados os tratamentos térmicos, em diferentes condições temporais, para o clone BV1120, utilizado como um modelo, para estimar a cada temperatura aplicada o tempo, para provocar 50% de depleção (td_{50}), nos estoques de amido nas células do parênquima radial, foi possível obter a quantificação das células com amido remanescente pelo processo de coloração dessas células com o corante vermelho neutro.

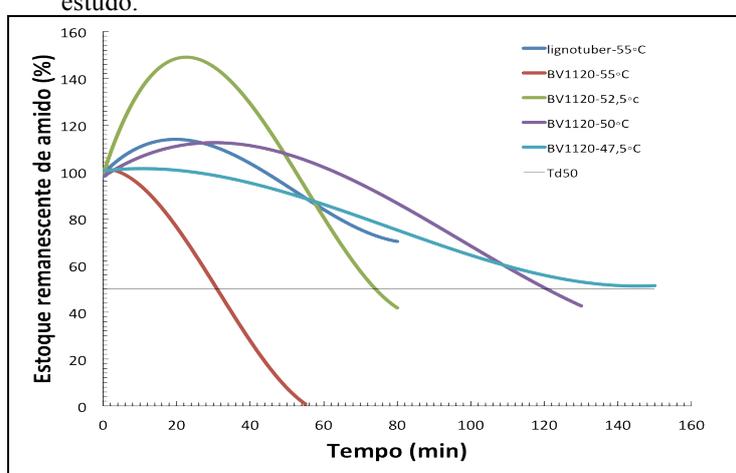
As curvas apresentadas, na Figura 3, apresentam as formas com que os estoques de amido se modificam com o aumento da temperatura. Essas diferentes formas, quando o clone BV1120 foi submetido às diferentes temperaturas, foram ajustadas por polinômios de terceiro grau (TABELA 1). Os

modelos de todos os ajustes foram altamente significativos pelo teste F de Fischer e permitiram ajustes (R^2) de 99,4; 85,6; 94,9 e 97,6% para os tratamentos de indução de calor de 47,5; 50,0; 52,5 e 55°C, respectivamente.

Esses ajustes com polinomiais do terceiro grau são considerados uma forma comum para as normas de reação térmica (KNIES et al., 2006), os quais propiciaram a constituição de bases fisiológicas para interpretação do processo de evolução biológica. Nessas bases, as variações, nas normas de reação térmicas, se hereditárias, evidenciam mudanças evolucionárias que possibilitam a condução de seleções genéticas que visam ao melhoramento da tolerância às alterações da temperatura do ambiente (HUEY; KINGSOLVER, 1989).

O polinômio de terceiro grau, também, foi ajustado para o estoque de amido remanescente, em lignotubers de *E. urophylla*, utilizados como uma testemunha, para efeitos de comparações entre os td_{50} alcançados, nos diferentes tratamentos de indução ao calor. O ajuste do referido modelo, também, foi altamente significativo e apresentou um valor R^2 de 87,8%.

Figura 3 - Curvas de depleção de amido nas células do parênquima radial da região do floema, ajustadas para o clone BV1120, utilizado como modelo para avaliação dos tempos de exposição que causam 50% de depleção do amido (td_{50}). Os td_{50} para as temperaturas de 47,5; 50,0; 52,5 e 55,0°C foram, respectivamente, de 150; 120, 72 e 30 minutos. O td_{50} para o estoque de amido nas células do parênquima radial de lignotubers de *Eucalyptus urophylla* não foi alcançado no tempo de estudo.



Fonte: Do autor (2016).

Tabela 1 – Resumo da análise de variância para regressão polinomial de terceiro grau em diferentes tratamentos térmicos (T) aplicados ao clone BV1120 e Lignotuber (Ligno.).

		Quadrado médio		
		Resíduo	Regressão	R ² (%)
BV1120 47,5°C	$100,45+0,19x-0,009x^2+0,00004x^3$	9,68	2256,71**	99,4
BV1120 50°C	$98,00+1,025x-0,020x^2+0,00006x^3$	534,51	4732,13**	85,6
BV1120 52,5°C	$98,87+4,863x-0,135x^2+0,00082x^3$	105,15	6967,64**	94,9
BV1120 55°C	$101,31+0,030x-0,081x^2+0,00086x^3$	190,18	6991,92**	97,6
Ligno. 55°C	$99,271+1,613x-0,050x^2+0,00032x^3$	111,47	1181,64**	87,8

**significativo ao nível de probabilidade pelo teste F de Fischer ($p \leq 0,01$).

Fonte: Do autor (2016).

As derivações dos modelos polinomiais de terceiro grau, apresentados na Tabela 1, permitiram estimar os respectivos tempos, para alcançar a td_{50} , os quais assumiram valores de 30, 72, 120 e 150 min, para as temperaturas induzidas de 55,0; 52,5; 50,0 e 47,5°C, respectivamente. No caso do ajuste para o estoque de amido remanescente nos lignotubers, o td_{50} , na temperatura 55,0°C, não foi alcançado até o limite testado de 80 min. Nessa temperatura, comparando-se as curvas ajustadas para o lignotuber e para o clone BV1120, percebe-se o quanto essa estrutura de reserva é tolerante à depleção de amido quando comparada com o clone modelo BV1120.

Os picos de acréscimo de células com amido (ambiente ótimo) somente foram observados, nas temperaturas de 50,0 e 52,5°C, para o clone BV1120 e de 55°C do lignotuber. Esses valores de acréscimo, no estoque de amido, indicam que os picos de máxima concentração de amido ocorrem dentro de uma faixa de tempo de exposição que varia entre 20 e 30 minutos.

Para *Toona ciliata*, esses aumentos de estoque de amido apontam a existência de estratégias das plantas para aumentar as suas tolerâncias aos estresses térmicos. Contudo deve-se salientar que, na temperatura de 55°C, essa estratégia pode ocorrer, mas não pode ser detectada no ajuste da curva, visto que, nessa temperatura, o tempo mínimo de estudo foi de 10 minutos. Na temperatura de 47,5°C, o pico de expressão de resposta à indução de aquecimento não ocorreu, apesar do ajuste do polinômio ter um R^2 de 99%.

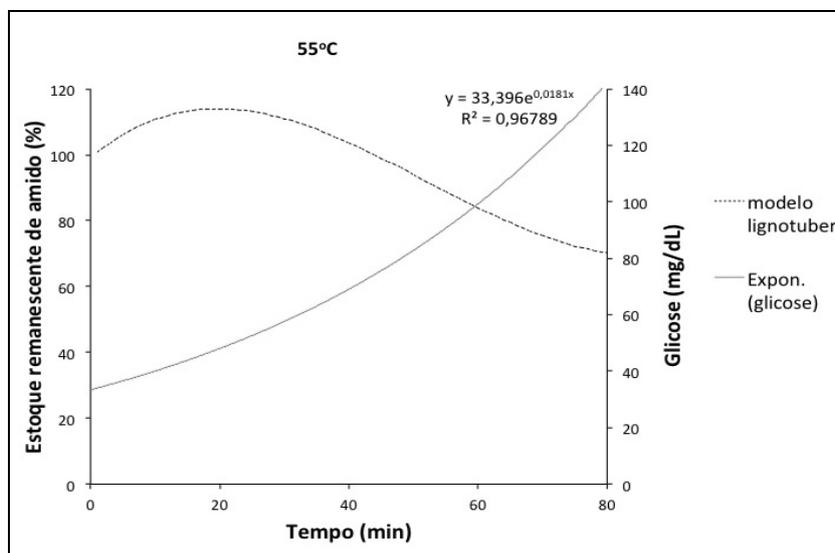
4.2 Teste com glicosímetro

Os picos iniciais de aumento de células do parênquima radial com amido ocorrem antes do início da depleção de amido e são controlados por sinais específicos. Nardini, Lo Gullo e Salleo (2011) sugerem que o aumento da $[Ca^{2+}]$ intracelular, após o embolismo dos vasos e vibração das paredes celulares, ativa

uma cascata de tradução de sinais que conduzem às alterações no metabolismo do amido em açúcares simples.

Essas alterações são sugeridas pelo resultado apresentado, na Figura 4, na qual se podem observar as mudanças no estoque remanescente de amido (% de células coradas) e nas concentrações de glicose (mg/dL) com o aumento do tempo de aplicação do tratamento térmico. Nessa figura, nota-se que o amido estocado (inicial) foi convertido em açúcar simples (glicose), após os referidos tempos do tratamento térmico, nos lignotubers de *E. urophylla*. Percebe-se que, após o pico inicial no aumento do estoque de amido, iniciou-se um acréscimo exponencial, nos teores de glicose, que pode ser explicado pelo modelo com R^2 de 96%.

Figura 4 – Comportamento das células do parênquima radial com amido remanescente e da glicose nos lignotubers de *E. urophylla* para o tratamento térmico de 55°C.



Fonte: Do autor (2016).

4.3 Avaliação do comportamento dos clones em suas respectivas td_{50}

A análise de variância conjunta de um experimento em fatorial evidenciou que o estoque de amido remanescente sofre efeitos altamente significativos de clones e de tratamentos térmicos, constituídos pela magnitude da temperatura e pelo tempo de sua exposição. As interações entre esses dois fatores, também, foram significativas, indicando a existência de plasticidade fenotípica, para depleção de amido, em função de aquecimento induzido.

A existência dessa plasticidade revela a importância deste estudo, visto que ela mostra a possibilidade de se construir, via melhoramento genético, adaptações às condições de ambientes em que os estresses por temperatura são bastante pronunciados.

Após a constatação dessas interações, procederam-se às análises de variância, para avaliar a significância dos efeitos de clones, dentro de cada tratamento térmico. A Tabela 2 apresenta essas análises evidenciando que os coeficientes de variação experimental C_{Ve} (%) foram de 6,43 a 9,57%, indicando que o delineamento e a técnica de avaliação do estoque de amido remanescente pelo vermelho neutro apresentam erros experimentais de baixa magnitude, possibilitando confiabilidade no processo de coleta de dados.

Tabela 2 - Resumo das análises de variância conjunta para os clones 1 ao 6 e estimativas dos parâmetros genéticos e fenotípicos para os tratamentos térmicos: 47,5°C/150min (T1), 50°C/120min (T2), 52,5°C/72min (A3), 55°C/30min (T4).

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios			
		T1	T2	T3	T4
Blocos	2	14,39	3,50	4,06	6,06
Tratamentos Térmicos	5	586,22*	410,37*	1846,59*	1171,42*
Resíduo	10	14,86	10,57	22,52	15,46
Média		40,56	36,50	49,61	61,11
CV _e (%)		9,50	8,91	9,57	6,43
ϕ_F		195,41	136,79	615,53	390,47
σ_e^2		4,95	3,52	7,51	5,15
ϕ_c		190,46	133,27	608,02	385,32
h ² (%)		97,47	97,43	98,78	98,68
CV _c (%)		34,03	31,63	49,70	32,12
CV _c /CV _e		3,58	3,55	5,20	4,99
Ganho (%)		50,49**	46,92**	74,24**	47,95**

*significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, **ganho genético esperado com a seleção (intensidade de seleção 1 em 6).

Legenda: CV_e : coeficiente de variação experimental, ϕ_F : componente quadrático fenotípico, σ_e^2 : variância ambiental, ϕ_c : componente quadrático genotípico, h² : coeficiente de determinação genotípico, CV_c: coeficiente de variação genética, CV_c/CV_e : índice de variação.

Fonte: Do autor (2016).

Na Tabela 2, também, observa-se que o efeito de clones foi altamente significativo em todos os tratamentos de indução térmica. Isso indica a existência de altos níveis de variação genética, independente da condição térmica avaliada. Os altos valores de coeficiente de variação genotípico, em relação ao experimental (CV_c/CV_e), indicam a possibilidade de se alcançar pronunciados ganhos genéticos pela seleção. As estimativas desses ganhos, na manutenção do estoque de amido, superaram os níveis de 46,9%, podendo se

estender aos 74,2%, quando a temperatura foi induzida a 52,5°C, por um tempo de 72 minutos, sendo este o maior valor estimado de ganho.

Outro fato interessante foram os altos valores dos coeficientes de determinação genotípicos, todos acima de 97%. Isso revela que os genes de resistência ao aumento de temperatura, como as induzidas neste estudo, já estão fixados na população de clones estudada. Esse fato indica que a depleção de amido, para gerar os açúcares simples e posterior reparo do embolismo do xilema, está sob forte controle genético.

Os altos valores de plasticidade fenotípica exibidos pelos clones estudados, a alta variabilidade genética e os extremamente altos valores estimados dos coeficientes de determinação genotípicos são fortes indícios de que, na história de vida da *Toona ciliata*, o processo evolutivo, para armazenamento e depleção do amido para proteger o xilema da cavitação e reparação do embolismo, já ocorreu em eras passadas.

A plasticidade fenotípica é um fator muito importante, que designa as mudanças fenotípicas, nos ambientes naturais e deve ser implementada nos modelos de persistência de populações (CHEVIN; LAND; MACE, 2010). Esses autores, ainda, afirmam que, nos estudos que envolvem as mudanças nas NRT dos indivíduos, devem ter foco na importância ecológica dos aspectos fenotípicos como, por exemplo, a morfologia, fisiologia, comportamento ou fenologia, que afetam o crescimento populacional por sua influência no seu ciclo histórico de vida.

Além disso, neste referido estudo, há a sugestão de que os modelos das NRT permitem fazer previsões a respeito da dinâmica evolutiva das curvas de tolerância para as espécies analisadas. Com a variação genética comprovada pela diferença de comportamentos nas NRT, a amplitude da tolerância, nos diferentes ambientes, pode evoluir como consequência da plasticidade fenotípica da característica analisada. Dessa forma, essa abordagem pode ser utilizada, para

testar predições em casos específicos, os quais são baseados nas estimativas de variabilidade, herdabilidade e plasticidade fenotípica da característica em questão (CHEVIN; LAND; MACE, 2010).

A Tabela 3 mostra as médias dos clones em todos os tratamentos de indução térmica. Observa-se que o melhor desempenho foi do clone BV1110, visto que o estoque de amido remanescente foi maior que os demais clones nas condições de aquecimento de 47,5; 50,0; 52,0 e 55°C. Nessa temperatura mais extrema e com exposição de 30 min, esse clone manteve o estoque de amido bem superior aos demais clones avaliados e os níveis desse estoque foram próximos aos verificados nas células do parênquima radial do lignotuber de *Eucalyptus urophylla* (FIGURA 5-D), apesar do número dessas células com estoques de amido ser bem superior, como apresentado na Figura 2-A e 2-B.

Tabela 3 - Resumo do teste de médias para os seis clones nos ambientes: 47,5°C/150min (T1), 50°C/120min (T2), 52,5°C/72min (T3), 55°C/30min (T4).

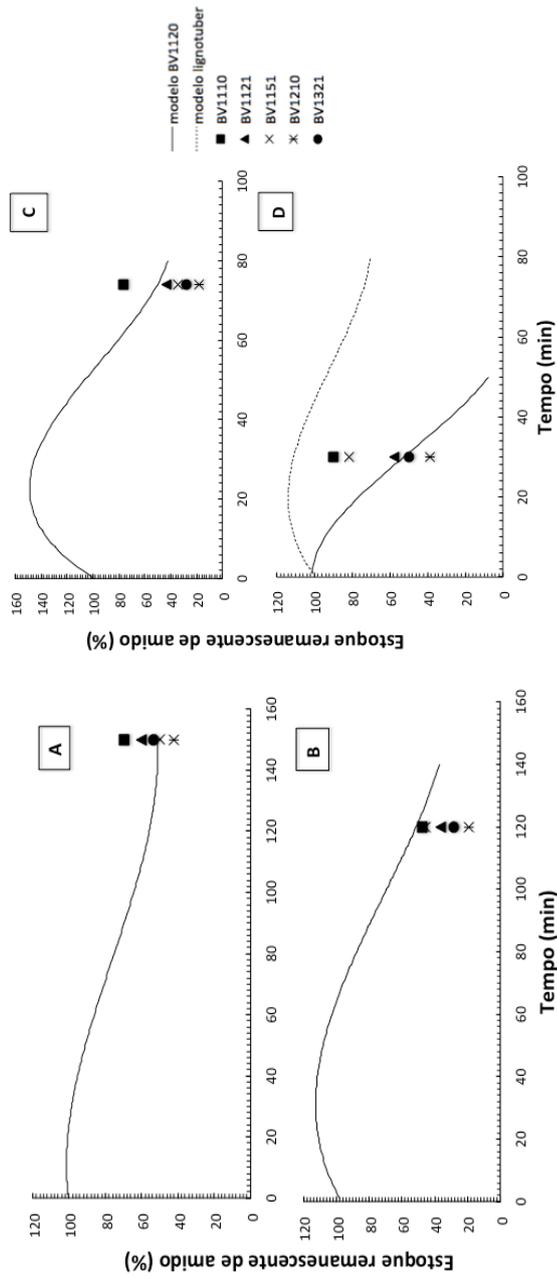
Clone	T1	T2	T3	T4
1110	62,7 a	47,7 a	76,3 a	88,3 a
1120	51,0 b	44,7 a	56,0 b	47,7 b
1121	33,3 c	36,3 a	51,7 b	61,0 b
1151	39,3 c	45,0 a	42,3 b	81,0 a
1210	24,3 c	18,3 b	21,7 c	38,3 b
1321	32,7 c	27,0 b	32,7 c	50,3 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si a 1% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

Fonte: Do autor (2016).

A Figura 5 apresenta os resultados de média dos clones nos diferentes tratamentos térmicos e respectivos td_{50} junto aos modelos polinomiais de terceiro grau ajustados para o clone BV1120 e lignotuber de *E. urophylla*.

Figura 5 - Curvas das normas de reação térmica para células do parênquima radial após depleção dos estoques de amido para o clone BV1120 (modelo) de *Toona ciliata* quando submetidas às temperaturas de 47,5°C (A), 50,0°C (B), 52,5°C (C) e 55°C (D). A depleção de amido nos seis clones de *T. ciliata* quando submetidos aos td_{50} nas temperaturas estudadas estão destacadas nos gráficos. Em D nota-se a curva de depleção de amido no lignotuber de *Eucalyptus urophylla* (estrutura e espécie para validação dos modelos).

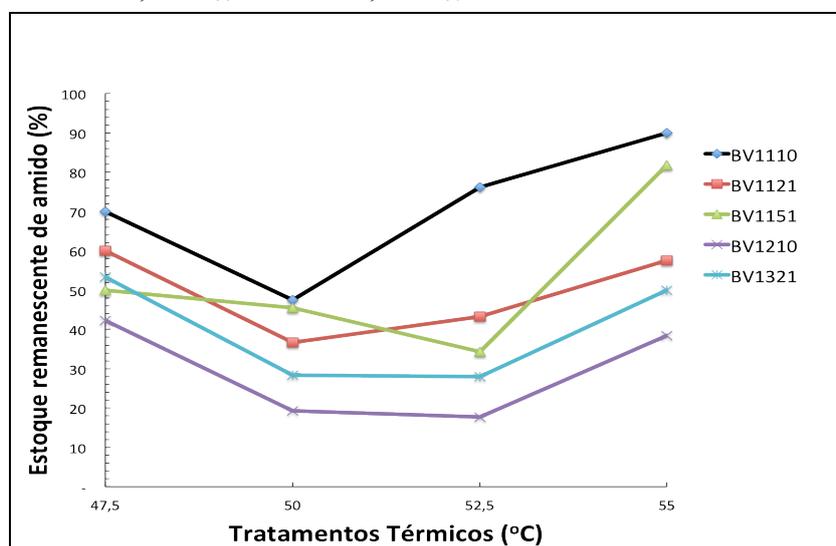


Fonte: Do autor (2016).

A Figura 6 apresenta o comportamento individual e conjunto de cinco clones para os diferentes tratamentos térmicos avaliados no experimento. O comportamento do clone BV1120 não está representado, na Figura 6, uma vez que o seu comportamento foi, previamente, definido ao ser, aleatoriamente, escolhido para estabelecer os tempos das td_{50} em todos os tratamentos térmicos simulados. Assim, nesses tratamentos, o seu comportamento não varia, tendo em todos eles 50% de depleção ou manutenção no estoque de amido.

Na Figura 6, observa-se que o clone BV1110 apresentou maior percentagem de células com estoque remanescente de amido e sempre apresentou resultados superiores aos demais clones avaliados, enquanto o clone BV1210 apresentou os valores mais baixos em todos tratamentos térmicos.

Figura 6 - Representação gráfica conjunta do comportamento de clones de *Toona ciliata* sob o efeito de indução de aquecimento para um td_{50} avaliado para o clone modelo BV1120, nos respectivos tratamentos térmicos: $47,5^{\circ}\text{C}/td_{50}=150\text{min}$, $50,0^{\circ}\text{C}/td_{50}=120\text{min}$, $52,5^{\circ}\text{C}/td_{50}=72\text{min}$ e $55,0^{\circ}\text{C}/td_{50}=30\text{min}$.



Fonte: Do autor (2016).

Desses seis clones avaliados com relação ao estoque de amido remanescente, quatro foram estudados por Rodrigues et al. (2013) quanto às suas características fisiológicas. Os autores afirmaram que o clone BV1110, o qual apresentou os maiores estoques remanescentes, após os tratamentos térmicos, também, evidenciou maior taxa fotossintética, enquanto o clone BV1321, que apresentou um dos menores estoques remanescentes de amido, teve a mais baixa taxa fotossintética. Essas relações, para esses dois clones, permitem conjecturar que os maiores estoques de amido remanescente estão relacionados com o estoque inicial, ou seja, antes da decepta da muda, quando esta estava, ainda, em atividade fotossintética.

Na Figura 6, nota-se que o comportamento dos clones BV1121 e BV1321, nos diferentes tratamentos térmicos, apresentam níveis intermediários de manutenção de estoque de amido.

Os comportamentos dos clones BV1121, BV1210 e BV1321 são semelhantes entre si e divergentes quando comparados com o clone BV1110 e BV1151. O comportamento do clone BV1110, que teve forte queda no depósito de amido, no tratamento térmico de $50^{\circ}\text{C}/t_{d_{50}}=120\text{min}$, modificou a sua tendência de comportamento com relação aos três clones anteriormente mencionados, mas não ao nível de promover alteração no ranking, indicando que, para esses quatro clones, a interação é do tipo simples. Por outro lado, o comportamento do clone BV1151, no tratamento térmico de $52,5^{\circ}\text{C}/t_{d_{50}}=72\text{min}$, apresentou forte queda no estoque de amido, fato que provocou uma alteração no ranking dos cinco clones nessa temperatura e tempo de exposição, revelando uma possível interação do tipo complexa. Provavelmente, foram os comportamentos dos clones BV1110 e BV1151 a causa da interação significativa entre clones e tratamentos térmicos, conforme apresentado na Tabela 2.

Esses fatos revelam uma grande influência da temperatura e do tempo de exposição nos níveis de amido remanescente nas células do parênquima radial. Para a maior temperatura simulada e em um tempo menor de exposição, como visto no tratamento térmico $55^{\circ}\text{C}/t_{d50}=30\text{min}$, os clones apresentaram os maiores valores de estoque de amido remanescente, enquanto para a temperatura menor e tempo de maior exposição, como no caso do tratamento térmico de $50^{\circ}\text{C}/t_{d50}=120\text{min}$, os clones apresentaram menores valores de estoque remanescente de amido, ou seja, nessa condição, a depleção de amido foi mais pronunciada.

Nessas condições combinadas de temperatura e tempo e, considerando a teoria de Nardini, Lo Gullo e Salleo (2011), na qual o amido é despolimerizado em açúcares simples e solúveis que migram via parênquima radial, para os vasos cavitados do xilema para, assim, proceder aos seus reparos, pode-se supor que, na condição de menores temperaturas estressantes em tempos de exposição mais longos, ocorrerá maior depleção do amido estocado, para reparar o embolismo no xilema, enquanto, nas temperaturas mais altas, mas com menor tempo de exposição, a necessidade de despolimerização do amido pode ser imperceptível, fazendo com que, nessa última condição, o estoque de amido remanescente permaneça em maiores níveis. Conforme a Figura 6 e Tabela 3, isso pode ser observado, para o caso dos clones BV1110 e BV1151, que mantiveram estoques de amido em 88,3 e 81%, respectivamente, ou seja, nessa condição de estresse térmico e tempo de exposição, a depleção de amido foi de apenas 11,7 e 19%.

Essas considerações, nas variações de temperatura e tempo de estresse, estão de acordo com Schulte, Healy e Fangue (2011) que mencionam que, para os estudos laboratoriais de normas de reação térmica, não se pode considerar somente a temperatura como fator de estresse, mas também o tempo com que as altas temperaturas permanecem para provocar estresse nas plantas. Dessa forma, pode-se interpretar que a interação entre essas duas condições ambientais se

constituem em fortes estresses abióticos que restringem os processos ontogênicos em plantas.

5 CONCLUSÃO

O corante vermelho neutro mostrou ser adequado para a coloração das células do parênquima radial com depósitos de amido, facilitando a sua contagem.

Os tratamentos térmicos, em que se combinaram elevação de temperatura e tempo de exposição, reduziram os depósitos de amido e possibilitaram o ajuste de curvas de reação térmica com alto grau de precisão. Esses ajustes foram feitos por um modelo polinomial de terceiro grau, com valores de R^2 acima de 85%.

Existe significativa variação entre clones de *Toona ciliata* quanto ao conteúdo remanescente de amido avaliado após os tratamentos térmicos. Essa variação indicou que as mudanças, nas curvas de normas de reação térmica com relação à depleção de amido, nas células do parênquima radial, seguem os princípios da teoria da evolução biológica.

Essa variação, nos conteúdos remanescentes de amido, é altamente hereditária, acima de 97% e indica que os genes que controlam essa característica estão fixados na população e que seleções podem aumentar a tolerância da espécie às alterações da temperatura ambiental.

REFERÊNCIAS

ALLEN, C. D. et al. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 259, n. 4, p. 660-684, Jan. 2010.

BAMBER, R. K.; MULLETTE, K. J. Studies of the lignotubers of *Eucalyptus gummifera* (Gaertn. and Hochr.) Il., anatomy. **Australian Journal of Botany**, Clayton South, v. 26, n. 1, p. 15-22, Dec. 1977.

BARBER, H. N.; SHARPE, P. J. H. Genetics and physiology of sunscald fruits. **Agricultural Meteorology**, Geneva, v. 8, n. 3, p. 175-191, Dec. 1971.

BELL, T. L.; OJEDA, F. Underground starch storage in *Erica* species of the Cape floristic region: differences between seeders and resprouters. **New Phytologist**, Lancaster, v. 144, n. 1, p. 143-152, Oct. 1999.

BRODRIBB, T. J.; COCHARD, H. Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, n. 1, p. 575-584, Jan. 2009.

BROWN, J. K.; DEBYLE, N. V. Fire damage, mortality, and suckering in aspen. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 17, n. 9, p. 1100-1109, Apr. 1987.

BUCCI, S. J. et al. Dynamic changes in hydraulic conductivity in petioles of two savanna tree species: factors and mechanisms contributing to the refilling of embolized vessels. **Plant, Cell & Environment**, Malden, v. 26, n. 10, p. 1633-1645, Oct. 2003.

CHANTUMA, P. et al. Increase in carbohydrate status in the wood and bark tissues of *Hevea brasiliensis* by double-cut alternative tapping system. **Kasetsart Journal (Natural Science)**, Bangkok, v. 41, n. 3, p. 442-450, June 2007.

CHEVIN, L.; LANDE, R.; MACE, G. M. Adaptation, plasticity and extinction in a changing environment: towards a predictive theory. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 8, n. 4, p. 1-8, Apr. 2010.

CHOW, P. S.; LANDHAUSSER, S. M. A method for routine measurements of total sugars and starch content in woody plant tissues. **Tree Physiology**, Victoria, v. 24, n. 10, p. 1129-1136, Aug. 2004.

- CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 3, p. 271-276, July/Sept. 2013.
- DICKINSON, M. B.; JOHNSON, E. A. Temperature-dependent rate models of vascular cambium cell mortality. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 34, n. 3, p. 546-559, Mar. 2004.
- DIDDEN-ZOPFY, B.; NOBEL, P. S. High temperature tolerance and heat acclimation of *Opuntia bigelovii*. **Oecologia**, Berlin, v. 52, n. 2, p. 176-180, Feb. 1982.
- DIETZE, M. C. et al. Nonstructural carbon in wood plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 65, n. 1, p. 667-687, Apr. 2014.
- DUBROVSKY, J. G. et al. Neutral red as a probe for confocal laser scanning microscopy studies of plant roots. **Annals of Botany**, Oxford, v. 97, n. 6, p. 1127-1138, June 2006.
- DUCREY, M. et al. The ecophysiological and growth responses of Aleppo pine (*Pinus halepensis*) to controlled heating applied to the base of the trunk. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 26, n. 8, p. 1366-1374, Aug. 1996.
- GUTSELL, S. L.; JOHNSON, E. A. How fire scars are formed: coupling a disturbance process to its ecological effect. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 26, n. 2, p. 166-174, Feb. 1996.
- HILLIS, W. E.; ROZSA, A. N. High temperature and chemical effects on wood stability: part 2, the effect of heat on the softening of radiate pine. **Wood Science and Technology**, München, v. 19, n. 1, p. 57-66, Mar. 1985.
- HUEY, R. B.; KINGSOLVER, J. Evolution of thermal sensitivity of ectotherm performance. **Trends in Ecology and Evolution**, Maryland Heights, v. 4, n. 5, p. 131-135, May 1989.
- INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate change 2014: synthesis report**. Geneva, 2014. 151 p.
- ISLAM, M. A.; BEGUM, S. Distribution of starch, lipid and nuclei in xylem and phloem of *Tectona grandis* Linn. **Journal of Bio-Science**, Bangladesh, v. 19, n. 1, p. 29-35, Jan. 2011.

- ISLAM, M. A.; BEGUM, S. Histochemical and anatomical studies of phloem and xylem cells of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) tree. **International Journal of Natural Sciences**, Bangladesh, v. 2, n. 1, p. 1-7, Mar. 2012.
- JONES, A. L.; ALDWINCKLE, H. S. **Compendium of apple and pear diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1990. 100 p.
- KEELEY, J. E. et al. Fire as an evolutionary pressure shaping plant traits. **Trends in Plant Science**, Maryland Heights, v. 16, n. 8, p. 406-411, Aug. 2011.
- KERR, L. R. The lignotubers of *Eucalypt* seedlings. **Proceedings of the Royal Society of Victoria**, Melbourne, v. 37, n. 1, p. 79-97, May 1925.
- KNIES, J. L. et al. The genetic basis of thermal reaction norm evolution in lab and natural phage populations. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 4, n. 7, p. 1257-1264, June 2006.
- KOZLOWSKI, T. T. **Tree growth and environmental stresses**. Seattle: University of Washington Press, 1979. 122 p.
- KRAMER, P. J.; KOZLOWSKI, T. T. **Physiology of trees**. New York: McGraw-Hill Book 1960. 642 p.
- LAMPRECHT, H. **Silvicultura nos trópicos: ecossistemas florestais e respectivas espécies arbóreas: possibilidades e métodos de aproveitamento sustentado**. Eschborn: Instituto de Silvicultura da Universidade de Göttingen, 1990. 343 p.
- LEVITT, J. **The hardiness of plants**. Columbia: University of Missouri, 1956. v. 6, 278 p.
- MANGIALAVORI, A. et al. Dasometria en plantaciones comerciales de toona (*Toona ciliata* var. *australis*) em la Provincia de Salta. In: JORNADAS TÉCNICAS FORESTALES Y AMBIENTALES, 10., 2003, Eldorado. **Anais...** Eldorado: Facultad de Ciencias Forestales, 2003. p. 1-7.
- MANION, P. D. **Tree disease concepts**. 2nd ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1991. 393 p.

MATHUR, S.; AGRAWAL, D.; JAJOO, A. Photosynthesis: response to high temperature stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 137, n. 1, p. 116-126, Aug. 2014.

MCDOWELL, N. et al. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought?: tansley review. **New Phytologist**, Lancaster, v. 178, n. 4, p. 719-739, Apr. 2008.

MIBUS, R.; SEDGLEY, M. Early lignotuber formation in *Banksia*: investigations into the anatomy of the cotyledonary node of two *Banksia* (Proteaceae) species. **Annals of Botany**, Oxford, v. 86, n. 3, p. 575-587, July 2000.

MICHALETZ, S. T.; JOHNSON, E. A.; TYREE, M. T. Moving beyond the cambium necrosis hypothesis of post-fire tree mortality: cavitation and deformation of xylem in forest fires. **New Phytologist**, Lancaster, v. 194, n. 1, p. 254-263, Apr. 2012.

MORETTI, B. S. et al. Crescimento e nutrição mineral de mudas de cedro australiano (*Toona ciliata*) sob omissão de nutrientes. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 4, p. 453-463, out./dez. 2011.

NARDINI, A.; LO GULLO, M. A.; SALLEO, S. Refilling embolized xylem conduits: is it a matter of phloem unloading? **Plant Science**, Shannon, v. 180, n. 4, p. 604-611, Apr. 2011.

NOBEL, P. S. **Physicochemical and environmental plant physiology**. 4th ed. Los Angeles: University of California, 2009. 582 p.

ORIBE, Y.; FUNADA, R.; KUBO, T. Relationships between cambial activity, cell differentiation and the localization of starch in storage tissues around the cambium in locally heated stems of *Abies sachalinensis* (Schmidt) Masters. **Trees**, Vancouver, v. 17, n. 3, p. 185-192, May 2003.

RODRIGUES, L. C. A. et al. Taxa fotossintética de quatro clones de *Toona ciliata* expostos ao paclobutrazol. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 22., 2013, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2013. 1 CD-ROM.

ROPOLLO JUNIOR, D. J.; MILLER, R. W. Factors predisposing urban trees to sunscald. **Journal of Arboriculture**, Champaign, v. 27, n. 5, p. 246-254, Sept. 2001.

SAKATA, T.; HIGASHITANI, A. Male sterility accompanied with abnormal anther development in plants-genes and environmental stresses with special reference to high temperature injury. **International Journal of Plant Developmental Biology**, Lausanne, v. 2, n. 1, p. 42-51, May 2008.

SALLEO, S. et al. New evidence for a role of vessel associated cells and phloem in the rapid xylem refilling of cavitated stems of *Laurus nobilis* L. **Plant, Cell & Environment**, Malden, v. 27, n. 8, p. 1065-1076, Aug. 2004.

SAVAGE, E. F. Cold injury as related to cultural management and possible protective devices for dormant peach trees. **HortScience**, Alexandria, v. 5, p. 425-428, 1970.

SCHULTE, P. M.; HEALY, T. M.; FANGUE, N. A. Thermal performance curves, phenotypic plasticity, and the time scales of temperature exposure. **Integrative and Comparative Biology**, McLean, v. 51, n. 5, p. 1-12, Aug. 2011.

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SEARS, M. W.; ANGILLETTO JUNIOR, M. J. Introduction to the symposium: responses of organisms to climate change: a synthetic approach to the role of thermal adaptation. **Integrative and Comparative Biology**, McLean, v. 51, n. 5, p. 662-665, Aug. 2011.

SHEPHERD, M. et al. Mapping species differences for adventitious rooting in a *Corymbia torelliana* × *Corymbia citriodora* subspecies variegata hybrid. **Tree Genetics & Genomes**, Davis, v. 4, n. 4, p. 715-725, Oct. 2008.

SHIGO, A. L. **Tree decay: an expanded concept**. Washington: U. S. Department of Agriculture, Forest Service, 1979. 73 p. (Information Bulletin, 419).

SINCLAIR, W. A.; LYON, H. H.; JOHNSON, W. T. **Diseases of trees and Shrubs**. Ithaca: Cornell University Press, 1987. 507 p.

SOUZA, J. C. A. V. de; BARROSO, D. G.; CARNEIRO, J. G. de A. **Cedro australiano (*Toona ciliata*)**. Niterói: Rio Rural, 2010. 12 p. (Programa Rio Rural. Manual Técnico, 21).

STADELMANN, E. J.; KINZEL, H. Vital staining of plant cells. In: PRESCOTT, D. M. (Ed.). **Methods in cell physiology**. New York: Academic, 1972. v. 5, p. 357-359.

TATTAR, T. A. **Diseases of shade trees**. San Diego: Academic, 1989. 377 p.

TIMMERS, A. C. J.; TIRLAPUR, U. K.; SCHEL, J. H. N. Vacuolar accumulation of acridine orange and neutral red in zygotic and somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.). **Protoplasma**, Bremen, v. 188, n. 3, p. 236-244, Sept. 1995.

TRIFILÒ, P. et al. Xylem embolism alleviated by ion-mediated increase in hydraulic conductivity of functional xylem: insights from field measurements. **Tree Physiology**, Lancaster, v. 28, n. 10, p. 1505-1512, Aug. 2008.

VERDAGUER, D.; OJEDA, F. Root starch storage and allocation patterns in seeder and resprouter seedlings of two Cape Erica (Ericaceae) species. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 89, n. 8, p. 1189-1196, Aug. 2002.

WOLCOTT, M.; KAMKE, F.; DILLARD, D. Fundamentals of flakeboard manufacture: viscoelastic behavior of the wood component. **Wood and Fiber Science**, Monona, v. 22, n. 4, p. 345-361, Oct. 1990.