UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

ATIVIDADE CAMBIAL E O EFEITO DE ANELAMENTO NO XILEMA SECUNDÁRIO EM ESPÉCIES DE CERRADO

FABIO BOSIO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), área de concentração Morfologia e Diversidade Vegetal.

BOTUCATU - SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ATIVIDADE CAMBIAL E O EFEITO DE ANELAMENTO NO XILEMA SECUNDÁRIO EM ESPÉCIES DE CERRADO

FABIO BOSIO

PROFª DRª CARMEN REGINA MARCATI

ORIENTADORA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), área de concentração Morfologia e Diversidade Vegetal.

BOTUCATU

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO D INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO – CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE – CRB 8/5651

Bosio, Fabio.
Atividade cambial e o efeito de anelamento no xilema secundário em espécies de cerrado / Fabio Bosio. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Carmen Regina Marcati
Capes: 20302037

1. Xilema. 2. Floema. 3. Sistema vascular de plantas. 4 Plantas - Efeito da auxina. 5. Plantas dos cerrados.

Palavras-chave: Anelamento; Auxina; Câmbio vascular; Fenologia; Periodicidade de crescimento.

“Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe

Só levo a certeza de que muito pouco sei

Ou nada sei...”

(Almir Sater e Renato Teixeira)

DEDICO aos meus pais, Marinêz Rosa Bosio e Pedrinho José Bosio (*in memorian*). Foram eles quem me ensinaram a amar o mundo das plantas.

AGRADECIMENTOS

À Profª. Drª. Carmen Regina Marcati, minha orientadora, por tudo o que você é e por tudo que você fez e faz por mim! Pela profissional competente que és, pela paciência, zelo e dedicação que você sempre teve e tem com a minha formação. Por sempre compartilhar de maneira alegre o seu conhecimento! Por sempre se preocupar com o meu bem estar e pelo ombro amigo em muitas horas. Cresci muito profissionalmente e como pessoa neste período que eu estive sob a sua orientação.

Ao Dr. Sergio Rossi, que abriu as portas de seu laboratório, e desde o meu estágio na Université du Québec à Chicoutimi, contribuiu com as pesquisas desenvolvidas nesta tese. Muito obrigado também pela orientação e por tantas coisas que você me ensinou durante o período em que estive sob sua orientação!

À Liliane Catarina Pereira pelo auxílio nos trabalhos de laboratório, pela sua dedicação em ajudar com a rotina do laboratório e, principalmente, pela sua amizade! Sua ajuda foi imprescindível para a realização desta tese!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado, à Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), processo 2009/17778-9, pelo auxílio financeiro necessário ao desenvolvimento de pesquisa e ao Fonds de la recherche du Québec – Nature et Technologies, do governo de Quebéc – Canadá, pela concessão de bolsa de estudo para a realização do estágio de doutorado no exterior (doutorado sanduíche).

Ao Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botância) pela possibilidade de cursar o Doutorado. Em especial aos funcionários da seção de pós-graduação, que sempre estiveram de prontidão para me atender e a responder meus questionamentos.

Aos professores Volker Bittric e Jorge Yoshio Tamashiro que confirmaram a identificação das espécies, e ao Sr. Clemente José Campos, que auxiliou na identificação das espécies no campo.

À estação meteorológica da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, campus de Botucatu pelo fornecimento dos dados meteorológicos.

Ao Departamento de Ciência Florestal da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP de Botucatu, em especial ao Laboratório de Anatomia da Madeira, por possibilitar o desenvolvimento desta pesquisa em sua instalações.

Aos funcionários das bibliotecas do campus Botucatu e Lageado, que sempre me atenderam com cordialidade e não mediram esforços para auxiliar na obtenção de artigos via comut.

Ao Departamento de Botânica do IB e a todos os seus professores e funcionários, que sempre me receberam com muito carinho e cordialidade; local onde fiz muitas amizades.

Ao herbário Herbário Irina Delanova De Gemtchujnicov (BOTU), onde estão depositadas as exicatas, bem como aos seus funcionários, que sempre estão de prontidão para nos ajudar.

Além das pessoas que nos ajudam diretamente em nossa pesquisa, existem aquelas que estão ao nosso lado, que nos dão suporte e fazem de nossas vidas mais felizes. O bom andamento do trabalho depende também se estamos bem, do nosso estado de espírito. Por isso, um agradecimentos a todos que eu listo agora:

A Deus, ser criador que me deu a vida e as oportunidades que tive nesta vida.

Aos meus pais, Marinêz e Pedrinho, aos meus irmãos Leandro e Humberto Mateus, às minhas “irmãs” Verenice e Mônica e ao meu sobrinho Marcos, que sempre me apoiaram em

minhas decisões, mesmo que estas me levassem para longe deles. Por serem o meu porto seguro, por sempre estarem de portas abertas e sempre estarem na torcida. Amo vocês!

À minha prima e amiga Tatiane, que é minha "irmã" do coração! Obrigado pelo apoio e por sempre em escutar nas horas difíceis, bem como fez parte de muitos momentos felizes também.

Aos meus amigos do Laboratório da Madeira: Liliane, Natália, Larissa, Paulinha, Rafaela, Marcela, Jane, Olívia, Caroline, Renan e José Matheus. Pela amizade, brincadeiras, desabafos, troca de informações, companhia, ajuda, apoio. Pelo clima gostoso de trabalho que vocês propiciaram nestes quatro anos. O Doutorado não teria sido o mesmo sem vocês!

A todos os amigos de Botucatu, sejam eles da faculdade ou não: Fernanda Tresmondi, Sandra (Liba), Sérgio (Thunder), Felipe, Bruno, Thaís Carboni, Yve, Plácido Fabrício, Clívia, Juliana (Ju), Vanessa, Ursula, Ricardo, Camila Braga, Camila (Ranceira), Luís Paulo, Débora Molizane, Talita Amador, Talita Torres, Rúbia, Daniel Baron, a todos os meus colegas de Pós-Graduação, aos amigos do grupo Papa Trilhas e aos do Coral da UNESP. Ao lado de vocês eu vivi momentos felizes e tristes aqui em Botucatu. Obrigado

Aos meus amigos que estão distantes: Marcela Moura, Carlos Chinasso, Ciane, Ricardo Rautenberg e Aline. Muito obrigado por vocês existirem.

A todos os meus familiares, que sempre me deram apoio e mesmo longe, caminharam ao me lado nestes quatro anos.

Aos colegas e amigos do Banco do Brasil, em especial à Elisa Maruyama, Eliana Goetems, Carolina Cunha e Mara de Bona, que desde que eu cheguei em Curitiba sempre me incentivaram a continuar os estudos e a cursar o doutorado.

E a todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho ou que sempre torceram por mim e aqui não foram mencionados.

SUMÁRIO

Resumo..... 01
Abstract..... 02
1 Introdução geral..... 03
1.1. Objetivos..... 04
2 Revisão bibliográfica..... 05
2.1. Relação entre a fenologia e a atividade cambial em espécies tropicais..... 05
2.2. Relação entre a brotação e fatores climáticos e ambientais..... 06
2.3. Relação entre a atividade cambial e fatores climáticos e ambientais..... 07
2.4. A auxina e o xilema secundário..... 08
2.5. O Cerrado..... 10
Capítulo I Periodicity and environmental drivers of apical and lateral growth in a Cerrado woody species..... 14
Capítulo II Efeito de anelamento caulinar na produção de xilema secundário e no tamanho e densidade dos vasos em *Aegiphila verticillata* Vell. (Lamiaceae)…….. 47
Considerações finais..... 78
Referências bibliográficas..... 79

BOSIO, F. **ATIVIDADE CAMBIAL E O EFEITO DE ANELAMENTO NO XILEMA SECUNDÁRIO EM ESPÉCIES DE CERRADO**. 2015, 83p. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, UNESP, UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

Resumo - Este estudo abordou a sazonalidade da atividade cambial e da fenologia vegetativa, a relação existente entre estes dois eventos e a relação destes com fatores climáticos e ambientais, bem como os efeitos de anelamento caulinar na estrutura do xilema secundário em espécies de cerrado. Para o estudo da sazonalidade da atividade cambial, amostras do caule principal de *Kielmeyera grandiflora* (Wawra) Saddi (Calophyllaceae) foram coletadas mensalmente, entre setembro de 2011 e dezembro de 2012. No mesmo período, foram feitas observações mensais das fases fenológicas vegetativas para avaliar a sazonalidade na produção de folhas e comparar estes dados com a atividade cambial. Para verificar quais os fatores ambientais e climáticos relacionados com a brotação e com o início da atividade cambial, foram calculadas as médias de temperatura e do fotoperíodo, e obtido o somatório da precipitação em uma escala de tempo que variou de 1 a 30 dias antes da brotação e do início da atividade cambial. Em seguida, foi calculado o coeficiente de variação das médias para avaliar a variabilidade entre os anos. Para o estudo do efeito de anelamento caulinar na estrutura do xilema secundário foi montado um experimento em campo com a espécie *Aegiphila verticillata* Vell. (Lamiaceae). O experimento foi composto por dois grupos, anelamento e controle. No grupo anelamento, a casca e o câmbio vascular foram removidos completamente do caule principal na porção central do tronco, formando um anel completo. O objetivo do anelamento foi interromper o fluxo polar de auxina produzido na copa para avaliar os efeitos dessa interrupção na estrutura do xilema secundário. No grupo controle, o caule não foi anelado. Para identificar o xilema secundário formado antes do anelamento do formado posteriormente ao tratamento foi feita uma incisão na casca, nas porções acima e abaixo do anelamento, até atingir o câmbio vascular. Esta incisão alcançava 03 centímetros de comprimento. Da mesma forma, no grupo controle, foi feita uma incisão na casca, em um ponto central do caule, até atingir o câmbio vascular. Observou-se que a produção de folhas e a atividade cambial foram sazonais. A brotação ocorreu em setembro de 2011 e em agosto de 2012, na estação seca, um a dois meses antes da reativação do câmbio vascular, que ocorreu em outubro de 2011 e em outubro de 2012, no início da estação chuvosa. O câmbio vascular entrou em dormência em maio, em plena estação chuvosa. O fotoperíodo e a temperatura tiveram menor coeficiente de variação quando comparados à precipitação, o que evidencia a importância destes dois fatores na atividade cambial. Quanto aos efeitos do anelamento no caule, observou-se que, após o tratamento, a proporção de xilema formado nas porções acima do anelamento foi maior do que a proporção do xilema formado nas porções abaixo do anelamento, e houve redução do diâmetro e da área do lúmen de vasos e aumento da densidade de vasos após o tratamento. No grupo controle não foram observadas diferenças anatômicas entre o xilema formado antes e depois de quando foi realizado o tratamento no grupo anelamento. Os resultados mostram que existe uma interação de fatores climáticos, ambientais e hormonais envolvidos nos processos de crescimento e de formação dos tecidos vasculares em espécies de cerrado.

Palavras-chave: auxina; floema secundário; periodicidade de crescimento; xilema secundário.

BOSIO, F. **CAMBIAL ACTIVITY AND THE GIRDLING EFFECT IN THE SECONDARY XYLEM IN CERRADO SPECIES**. 2015, 83p. THESIS (DOCTORATE) – INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, UNESP, UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

This study approached the seasonality in cambial activity and vegetative phenology, the relationship between these events and their relation with wheater and environmental factors, and also the effects of stem girdling in the structure of secondary xylem in Cerrado species. In order to study of seasonality in cambial activity, monthly samples from main stem of *Kielmeyera grandiflora* (Wawra) Saddi (Calophyllaceae) were collected from September 2011 to December 2012. In the same period, observations of vegetative phenological phases were made to assess the seasonality in leaf production, and to compare these data with cambial activity. In order to certify which environmental and weather features are related with bud opening and onset of cambial activity, it was calculated the mean value of temperature and photoperiod, and obtained the sum of rainfall in a time scale that ranged from 1 to 30 days before bud opening and the onset of cambial activity. After that, the coefficient of variation was calculated to assess the variability between years. In order to evaluate the stem girdling effect in the structure of secondary xylem was conducted an experiment in field with the species *Aegiphila verticillata*Vell (Lamiaceae), composed of two groups, girdling and control. In girdling group, bark and cambium were completely removed from the central portion of main stem, forming a complete ring. The purpose of girdling was to interrupt the polar flow of auxin produced in the crown, and to assess the effect of its disruption in the structure of secondary xylem. In control group, it has not made a girdling in the stem. To distinguish the xylem formed before girdling from xylem formed after the treatment, an incision (03 cm in length) was made in the regions above and below girdling until reaches the vascular cambium. In the same way, in control group an incision in the bark was made at a central point of the stem, until it reaches the vascular cambium. Leaf production and cambial activity were seasonal. The bud opening occurred in September 2011 and August 2012, during the dry season, one or two months before the onset of vascular cambium, which occurred in October 2011 and in October 2012, at beginning of the rainy season. The photoperiod and temperature showed a lower coefficient of variation than rainfall, which highlights the importance of these factors in cambial activity. Regarding the girdling effects in the stem, it was observed that after treatment, the proportion of xylem formed in the portions above girdling was higher than the proportion of xylem formed below it, and also was observed a reduction in vessel lumen area, width and an increasing in vessel density after treatment. In control group were not observed anatomical differences between the xylem formed before and after when it has been made the girdling in the stems of girdling group. The results show that there is an interaction of climatic, environmental and hormonal factors involved in the process of growth and formation of vascular tissues in Cerrado species.

Key words: auxin; growth periodicity; secondary phloem; secondary xylem.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Em muitas espécies tropicais, o desenvolvimento foliar e a atividade cambial são eventos sazonais, ou seja, a produção de folhas novas e de xilema e floema secundários ocorrem em períodos específicos do ano (ver GHOUSE; HASHMI, 1983; VENUGOPAL; KRISHNAMURTHY, 1987; RAJPUT; RAO, 2001a). Devido a sazonalidade nestes dois eventos em algumas dessas espécies, é natural esperar que produção sazonal de folhas e dos tecidos vasculares secundários esteja correlacionada. Sendo assim, um número representativo de estudos abordou a atividade sazonal destes meristemas e observou-se que, dependendo da espécie, o desenvolvimento foliar pode ou não estar relacionado com a atividade cambial (ver GHOUSE; HASHMI, 1983; VENUGOPAL; KRISHNAMURTHY, 1987; RAJPUT; RAO, 2001b).

Em relação a correlações entre fatores ambientais e desenvolvimento foliar, alguns estudos mostram que o fotoperíodo está positivamente relacionado com a brotação (BORCHERT; RIVERA, 2001; RIVERA et al., 2002; YÁÑEZ-ESPINOSA; TERRAZAS; LÓPEZ-MATA, 2006), e em algumas espécies a senescência foliar relaciona-se com a estação seca (RAO; RAJPUT, 1999). Quanto a atividade cambial, a precipitação sazonal é o principal fator que tem sido relacionado com os períodos de atividade e dormência do câmbio vascular e com o crescimento radial (RAJPUT; RAO, 2001a; LISI et al., 2008; KREPKOWSKI et al., 2011). Em geral, o câmbio vascular retoma a atividade no início da estação chuvosa e entra em dormência durante a estação seca (RAJPUT; RAO, 2001a). No entanto, alguns estudos dão evidências que outros fatores ambientais podem estar relacionados tanto com a brotação quanto com o início da atividade cambial (AJMAL; IQBAL, 1987; VENUGOPAL; LIANGKUWANG, 2007; TROUET et al., 2012), mostrando que existem lacunas no conhecimento acerca dos fatores relacionados com o crescimento apical e lateral.

Outro aspecto importante relacionado ao desenvolvimento caulinar é a influência da auxina na estrutura do xilema secundário. Estudos mostram que este hormônio vegetal está envolvido no processo de diferenciação dos elementos traqueais do xilema (ver JACOBS, 1952; FUKUDA, 1997; ALONI, 2014). Aloni e Zimmermman (1983) propuseram a hipótese de que um gradiente de concentração de auxina ao longo do corpo da planta regula o diâmetro e a frequência de vasos, o que reflete na diferença de diâmetro e frequência de vasos encontrada entre os ramos, caule principal e raízes. Considerando que a principal fonte de

auxina em plantas são as folhas jovens em formação, (LJUNG; BHALERAO; SANDBERG, 2001), e que esta é transportada na zona cambial e no floema (UGGLA et al., 1996; ALONI, 2010), pesquisas que associem a interrupção do fluxo da auxina ao período de sua produção podem trazer informações importantes sobre o seu papel na estrutura do xilema secundário.

O Cerrado é um domínio fitogeográfico que apresenta sazonalidade na precipitação e, temperatura média anual entre 22-23°C, onde a temperatura máxima pode chegar aos 40°C no verão, e a temperatura mínima pode chegar à zero no inverno (ver COUTINHO, 2002). Portanto, pode-se dizer que o Cerrado é um "laboratório vivo" para o estudo das relações entre o a sazonalidade nos fatores climáticos e ambientais com o crescimento sazonal em espécies tropicais. No entanto, estudos que relacionam a fenologia com a atividade cambial em espécies de Cerrado ainda são poucos, e só publicados em teses (ver CORADIN, 2000; MARCATI, 2014). Além disso, no cerrado existe um número considerável de espécies decíduas (ver PIRANI; SANCHEZ; PEDRONI, 2009), que são espécies que podem servir como modelo em estudos que avaliem da influência da auxina na estrutura do xilema secundário.

Diante disso, o objetivo do presente trabalho é estudar a atividade cambial e os efeitos da interrupção do fluxo de auxina, via anelamento caulinar, no xilema secundário de espécies do cerrado.

1.1 Objetivos

- Verificar se a produção de folhas e a atividade do câmbio vascular em *Kielmeyera grandiflora* (Wawra) Saddi (Calophyllaceae) são eventos sazonais;
- Identificar a duração dos períodos de atividade e dormência do câmbio vascular nessa espécie;
- Investigar a existência de correlação entre fenologia e atividade cambial, e a relação destes eventos com a precipitação, temperatura e o fotoperíodo;
- Verificar se a interrupção do fluxo de auxina, via anelamento no caule principal, leva à produções variáveis de xilema secundário ao longo do eixo caulinar, alterações no diâmetro, na área e na densidade de vasos no xilema secundário em *Aegiphila verticillata* Vell. (Lamiaceae);
- Verificar o período de formação dos vasos de maior diâmetro do lenho inicial em *A. verticillata*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Relação entre a fenologia e a atividade cambial em espécies tropicais

Em espécies tropicais, estudos que relacionam a brotação com o início da atividade cambial mostram que para muitas espécies a reativação do câmbio vascular ocorre de duas semanas a dois meses após a brotação (LU; CHIANG, 1975; DAVE; RAO, 1982b; GHOUSE; HASHMI, 1983; DESPHANDE; RAJENDRABABU, 1985; AJMAL; IQBAL, 1987; VENUGOPAL; KRISHNAMURTHY, 1987; RAJPUT; RAO, 2001a, 2001b; VENUGOPAL; LIANGKUWANG, 2007). Entretanto, em outras, a reativação do câmbio pode ocorrer antes ou simultaneamente a brotação (ver VENUGOPAL; KRISHNAMURTHY, 1987; RAO; RAJPUT, 1999, RAJPUT; RAO, 2001a), mostrando que não existe um padrão geral quanto a relação entre a brotação e a reativação do câmbio vascular nas espécies tropicais.

Quando se avalia as relações entre a brotação e a reativação do câmbio vascular por grupos fenológicos funcionais, observa-se que para as espécies sempre verdes e brevidecíduas, aparentemente não existe um único padrão que relacione a brotação com a reativação do câmbio vascular. Em um número representativo de espécies, o câmbio vascular reativa após a brotação (GHOUSE; HASHMI, 1983; VENUGOPAL; KRISHNAMURTHY, 1987; RAJPUT; RAO, 2001a, 2001b; VENUGOPAL; LIANGKUWANG, 2007), mas em outras a reativação do câmbio vascular pode ocorrer junto com a brotação (VENUGOPAL; KRISHNAMURTHY, 1987; RAJPUT; RAO, 2001b), ou ainda estes dois eventos podem não estar relacionados (RAJPUT; RAO, 2000). Em algumas espécies sempre verdes, a atividade cambial pode se estender por todo o ano, não apresentando relação com a brotação (DAVE; RAO, 1982a; VENUGOPAL; KRISHNAMURTHY, 1987; RAJPUT; RAO, 2000, 2001a).

Em algumas espécies decíduas, a reativação do câmbio pode ocorrer um pouco antes ou junto com a brotação (ver VENUGOPAL; KRISHNAMURTHY, 1987; RAO; RAJPUT, 1999), mas em um número representativo de espécies, a atividade cambial retoma de duas semanas a dois meses após a brotação (LU; CHIANG, 1975; DAVE; RAO, 1982b; GHOUSE; HASHMI, 1982; DESPHANDE; RAJENDRABABU, 1985; VENUGOPAL; KRISHNAMURTHY, 1987), caracterizando um padrão para este grupo funcional, onde a

reativação do câmbio vascular ocorre após a brotação. Como proposto por Larson (1969), a produção de hormônios pelas gemas pode estar relacionada com a retomada da atividade cambial nas espécies em que a brotação ocorre antes da reativação do câmbio vascular.

Apesar de não haver um padrão único quando se trata da relação entre a brotação com o início da atividade cambial, a presença das folhas adultas parece ser um fator importante para o período de atividade cambial como um todo. Observa-se que o pico de atividade cambial em muitas espécies ocorre quando as plantas estão com sua folhagem completa (DAVE; RAO, 1982b; RAO; RAJPUT, 1999; MARCATI; ANGYALOSSY; EVERT, 2006; MARCATI; MILANEZ; MACHADO, 2008; TROUET et al., 2012), e em algumas espécies o período de dormência do câmbio e o término da diferenciação dos tecidos vasculares relacionam-se com a abscisão foliar e com o período em que as plantas estão sem folhas (ver DAVE; RAO, 1982b; DESPHANDE; RAJENDRABABU, 1985; VENUGOPAL; KRISHNAMURTHY, 1987; MARCATI; MILANEZ; MACHADO, 2008; COSTA et al., 2013).

2.2. Relação entre a brotação e fatores climáticos e ambientais

Em muitas espécies tropicais em ambientes com precipitação sazonal, a brotação ocorre no período seco (DESPHANDE; RAJENDRABABU, 1985; AJMAL; IQBAL, 1987; RAJPUT; RAO, 2001a; RIVERA et al., 2002). Em geral, somente espécies decíduas com sistema subterrâneo raso brotam após as primeiras chuvas (BORCHERT, 1999). Isso mostra que em geral a sazonalidade na precipitação não é um fator limitante para a brotação em espécies tropicais.

Se a precipitação não sincroniza a brotação em espécies tropicais, quais os fatores que podem regular a brotação nessas espécies? Alguns estudos mostram que o fotoperíodo é um fator importante para a indução da brotação em espécies tropicais. O aumento no comprimento do dia induz a brotação em espécies de florestas destas regiões (BORCHERT; RIVERA, 2001; RIVERA et al., 2002; YÁÑEZ-ESPINOSA; TERRAZAS; LÓPEZ-MATA, 2006). Além do comprimento do dia, para algumas espécies, a temperatura parece ser um fator envolvido na indução da brotação. A brotação está correlacionada com a temperatura máxima em algumas dessas espécies (YÁÑEZ-ESPINOSA; TERRAZAS; LÓPEZ-MATA,

2006), e o aparecimento dos primórdios foliares pode ocorrer quando a temperatura atinge o máximo no ano (RAO; RAJPUT, 1999). No entanto, informações sobre os fatores ambientais e climáticos envolvidos com a brotação em espécies tropicais ainda são escassos.

2.3. Relação entre atividade cambial e fatores climáticos e ambientais

Nas regiões tropicais, a precipitação sazonal é um dos principais fatores relacionados com a atividade cambial e incremento radial. Em geral, a atividade cambial e a diferenciação dos tecidos vasculares secundários estão relacionados com a estação chuvosa (ver MARCATI; ANGYALOSSY; EVERT, 2006; YÁÑEZ-ESPINOSA; TERRAZAS; LÓPEZ-MATA, 2006; MARCATI; MILANEZ; MACHADO, 2008; WANG et al., 2013). Com o início das primeiras chuvas, o câmbio vascular entra em atividade e inicia-se a formação e diferenciação dos tecidos vasculares secundários (ver RAJPUT; RAO, 2001a; KREPKOWSKI et al., 2011). Observa-se um pico de atividade cambial na estação chuvosa (ver DAVE; RAO, 1982b; RAO; RAJPUT, 1999; RAJPUT; RAO, 2000; MARCATI; MILANEZ; MACHADO, 2008) e, assim, o maior incremento radial ocorre durante o período chuvoso (ver LISI et al., 2008; KREPKOWSKI et al., 2011; DIÉ et al., 2012). No entanto, alguns estudos de atividade cambial a nível histológico mostram que, em algumas espécies, a reativação do câmbio vascular ocorre antes do início das chuvas (DAVE; RAO, 1982b; AJMAL; IQBAL, 1987; RAJPUT; RAO, 2001a), dando indícios que além da precipitação, outros fatores ambientais podem interagir na reativação do câmbio vascular em espécies tropicais.

A atividade cambial e a diferenciação dos tecidos vasculares cessam durante a estação seca em ambientes com precipitação sazonal (ver VETTER; BOTOSSO, 1989; RAO; RAJPUT, 1999; RAJPUT; RAO, 2001a; MARCATI; ANGYALOSSY; EVERT, 2006; MARCATI; MILANEZ; MACHADO, 2008; DIÉ et al., 2012). Worbes (1995) observou que um período seco de dois a três meses, com menos de 60 mm mensais de precipitação, pode gerar um estresse que induz a dormência do câmbio vascular em espécies tropicais. Em *Cedrela odorata*, a redução na precipitação parece ser realmente o fator que leva a sazonalidade no crescimento da espécie (COSTA et al., 2013). No entanto, em algumas espécies, a atividade cambial cessa antes do inicio da estação seca (RAJPUT; RAO, 2001a),

mostrando que embora o período de dormência se sobreponha ao período seco, outros fatores também podem estar relacionados com o término da atividade do câmbio vascular em espécies tropicais.

A temperatura (máxima e mínima) também é um fator envolvido no processo de reativação da atividade do câmbio vascular em espécies tropicais. Alguns estudos observaram uma relação positiva da atividade cambial com a temperatura máxima, (RAJPUT; RAO, 2001a; YÁÑEZ-ESPINOSA; TERRAZAS; LÓPEZ-MATA, 2006), e em algumas espécies a

reativação do cambio requer uma condição quente e seca (AJMAL; IQBAL, 1987). Para *Tectona grandis*, uma espécie da Índia, Rao e Rajput (1999) observaram que a temperatura entre 34-36°C é a temperatura ótima para o crescimento radial. Quanto à temperatura mínima, esta pode ter algum efeito positivo na atividade cambial e na formação do xilema secundário (Venugopal e Liangkuwang 2007), mas em *Grewia tiliaefolia* o decréscimo da temperatura no inverno cessa a atividade cambial e a diferenciação de tecidos vasculares (DESHPANDE; RAJENDRABABU, 1985). No entanto, informações sobre o efeito da temperatura na atividade cambial em espécies dos trópicos são escassas, sendo necessária a realização de mais estudos para uma melhor compreensão do papel da temperatura na atividade cambial e diferenciação dos tecidos vasculares nestas espécies.

Estudos recentes mostram que o fotoperíodo também tem papel importante na reativação do câmbio vascular. Em algumas espécies tropicais o aumento no comprimento do dia e a proximidade do verão austral estão relacionados positivamente com a reativação do câmbio vascular (YÁÑEZ-ESPINOSA; TERRAZAS; LÓPEZ-MATA, 2006; TROUET et al., 2002), enquanto que o final da atividade cambial corresponde ao comprimento do dia entre 74 e 53% do máximo anual (TROUET et al., 2002). O ciclo anual de mudanças no fotoperíodo é regular o bastante para representar um sinal constante para plantas (ROSSI et al.; 2006), e provavelmente é um sinal importante que está envolvido na reativação do câmbio vascular em espécies tropicais.

2.4. A auxina e o xilema secundário

O ácido indol-3- acético (AIA) é a auxina predominante nas plantas superiores (BERLETH; MATTSON; HARDTKE, 2000). Sua produção ocorre principalmente nas

regiões apicais da planta, em tecidos com divisão e crescimento rápido, como gemas apicais do caule, folhas jovens, flores e no ápice da raiz (BERLETH; MATTSON; HARDTKE, 2000; SACHS, 2000; LJUNG; BHALERAO; SANDBERG, 2001; ALONI et al., 2003). A auxina produzida nos órgãos apicais segue um fluxo polar no corpo da planta, ou seja, num sentido unidirecional, que vai do ápice dos ramos em direção ao caule e às raízes (ver GERSANI; SACHS, 1984; SACHS, 2000; SCARPELLA; HELARIUTTA, 2010). Nas plantas lenhosas o transporte da auxina ocorre no câmbio vascular e felogênio, onde o fluxo é polar (ver UGGLA et al., 1996; ALONI, 2010, 2013), bem como no floema secundário, onde o fluxo de auxina não é polar, ou seja, no floema o fluxo de auxina ocorre nos dois sentidos (ALONI, 2010, 2013).

Quanto à sinalização para a diferenciação dos elementos traqueais doo xilema, o trabalho desenvolvido por Jacobs (1952) foi um dos primeiros a mostrar que a auxina é o estímulo responsável pela regeneração dos elementos traqueais do xilema em regiões injuriadas. Assim, nas plantas vasculares, a auxina é o estímulo que sinaliza a diferenciação dos elementos de vaso (JACOBS, 1952; FUKUDA, 1997; ALONI, 2010; SCARPELLA; HELARIUTTA, 2010), bem como é um dos hormônios que sinalizam a diferenciação das traqueídes (ALONI, 2014).

Aloni e Zimmermann (1983) propuseram a hipótese do “gradiente da auxina” em que a auxina oriunda das folhas jovens segue até as raízes e atua como um sinal morfogenético, formando um gradiente de concentração polar ao longo do eixo da planta. Este gradiente de AIA polar e gradual no câmbio vascular fornece uma informação direcional e de localização para as células em diferenciação. A hipótese propõe que o gradiente decrescente da concentração de auxina ao longo do eixo da planta, das folhas até as raízes, controla a taxa de diferenciação e de expansão celular antes da deposição da parede secundária. Assim, altas concentrações de auxina próximo a folhas jovens induzem a formação de vasos estreitos como resposta de uma diferenciação rápida, permitindo somente um tempo limitado para a expansão celular. Por outro lado, baixas concentrações de auxina mais abaixo da região das folhas jovens resultam na diferenciação mais lenta, que permite maior expansão celular antes da deposição da parede secundária, resultando em vasos largos. Segundo esta hipótese, a densidade de vasos também é controlada pela concentração de auxina: altas concentrações deste hormônio induzem um aumento na densidade de vasos e baixas concentrações de auxina induzem uma menor densidade de vasos.

Alguns estudos realizados com plantas modificadas geneticamente para uma super produção, ou para a redução no montante de auxinas produzido mostram que a alteração nos níveis endógenos de auxina leva a alterações na dimensão dos elementos traqueais (KLEE et al., 1987; ROMANO; HEIN; KLEE, 1991). Segundo estes estudos, altos níveis de auxina levam à diferenciação de um grande número de vasos (KLEE et al., 1987) e baixas concentrações desse hormônio resultam em elementos traqueais com maior diâmetro (ROMANO; HEIN; KLEE, 1991). Sachs (2000) comenta que apesar da concentração de auxina não ser o suficiente para a diferenciação vascular, a concentração de auxina nas células parece ser um fator decisivo para que ocorra a diferenciação.

2.5. O Cerrado

O Cerrado é um domínio fitogeográfico brasileiro (COUTINHO, 2002), e está inserido dentro do domínio da zona tropical. Ocupa uma área de aproximadamente 2,0 milhões de km² e abrange boa parte dos estados brasileiros, concentrando-se na região do Planalto Central (EITEN, 1972; COUTINHO, 2002). Além da porção central do país, o Cerrado ocorre também em áreas disjuntas ao norte dos estados do Amapá, Amazonas, Pará e Roraima, e ao sul em pequenas "ilhas" no Paraná (OLIVEIRA-FILHO; RATTER, 2002; RIBEIRO; WALTER, 2008). Possui uma grande diversidade de espécies vegetais e é um dos *hotspots* de biodiversidade com prioridade de conservação (MYERS et al., 2000).

Em geral, o Cerrado é composto por uma sinúsia arbóreo-arbustiva, composta por arbustos, subarbustos e árvores baixas, inclinadas, tortuosas, muitas vezes com cortiça espeça e com folhas coriáceas (OLIVEIRA-FILHO; RATTER, 2002), além de uma sinúsia herbácea (EITEN, 1972; FILGUEIRAS, 2002). Algumas espécies vegetais do Cerrado possuem sistema radicular profundo (OLIVEIRA-FILHO; RATTER, 2002).

Em seu conceito amplo (*sensu latu*), o Cerrado é constituído por fitofisionomias campestres, como o campo limpo, o campo sujo e o campo cerrado, uma fitofisionomia savânica, o cerrado *sensu strictu*, e uma fitofisionomia florestal, o cerradão (COUTINHO, 1978). Além dessas fitofisionomias, as matas de galeria podem fazer parte desse domínio (RIBEIRO; WALTER, 2008). Dessa forma, pode-se dizer que o Cerrado é um complexo de

biomas distribuídos em mosaico (COUTINHO, 2006), constituindo assim um domínio fitogeográfico.

A região por onde o Cerrado distribui-se possui uma grande diversidade de solos, onde a classe dos latossolos corresponde a cerca de 49% do total (MOTTA; CURI; FRANZMEIER, 2002; REATTO et al., 2008). Morfologicamente, em áreas de Cerrado os solos são não hidromórficos, profundos (normalmente superior a 2m), possuem baixos teores de silte e de argila, são bem drenados e possuem alta permeabilidade à água (MOTTA; CURI; FRANZMEIER, 2002; REATTO et al., 2008). Apesar de possuírem em geral boas propriedades físicas para o crescimento das plantas, são solos com baixa quantidade de nutrientes (MOTTA; CURI; FRANZMEIER, 2002; REATTO et al., 2008).

Quanto às condições ambientais, o Cerrado é marcado pela sazonalidade na precipitação ao longo do ano. A precipitação média anual fica em torno de 1200 e 1800 mm, e concentra-se no período entre os meses de outubro e abril, caracterizando uma estação chuvosa. Entre maio a setembro, a precipitação diminui e os índices pluviométricos mensais podem chegar à zero, resultado em uma estação seca com duração de três a cinco meses (COUTINHO, 2002; MENDONÇA; DANNI-OLIVEIRA, 2007; SILVA; ASSAD; EVANGELISTA, 2008). A temperatura média anual fica em torno de 22-23°C, com máxima mensal podendo chegar a mais de 40°C no verão e as e mínima podendo atingir valores próximos ou até abaixo de zero no inverno (COUTINHO, 2002).

No Cerrado, queimadas, naturais ou de origem antrópica, principalmente na estação seca (MIRANDA; BUSTAMANTE; MIRANDA, 2002; MIRANDA; SATO, 2005) são frequentes. Muitas espécies lenhosas do Cerrado apresentam forte suberização de troncos e ramos (MIRANDA; BUSTAMANTE; MIRANDA, 2002) e são resistentes ao fogo regenerando poucos dias após a queimada (MIRANDA; BUSTAMANTE; MIRANDA, 2002; MIRANDA; SATO, 2005). No entanto, o fogo afeta a floração, bem como a sobrevivência de plântulas e indivíduos jovens (MIRANDA; BUSTAMANTE; MIRANDA, 2002; MIRANDA; SATO, 2005), e diferentes tipos de danos ocorrem com a vegetação lenhosa (MIRANDA; SATO, 2005). Esses danos alteram a composição de espécies e a estrutura da vegetação, (MIRANDA; BUSTAMANTE; MIRANDA, 2002) e resultam em fisionomias mais abertas como consequência das altas taxas de mortalidade (MIRANDA; SATO, 2005).

Conforme estabelecido pelo conselho do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), os resultados obtidos durante a execução deste projeto de tese foram reunidos em dois capítulos, em formato de artigos científicos para publicação. Seguimos as normas do Annals of Botany para o Capítulo I, e do IAWA Journal para o Capítulo II.

Capítulo I: Periodicity and environmental drivers of apical and lateral growth in a cerrado woody species.

Capítulo II: Efeito de anelamento caulinar na produção de xilema secundário e no tamanho e densidade dos vasos em *Aegiphila verticillata* Vell. (Lamiaceae).

CAPÍTULO I

Original Article

PERIODICITY AND ENVIRONMENTAL DRIVERS OF APICAL AND LATERAL GROWTH IN A CERRADO WOODY SPECIES

Fabio Bosio[1], **Sergio Rossi**[2] and **Carmen Regina Marcati**[3]*

1 Universidade Estadual Paulista, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Instituto de Biociências, Distrito de Rubião Júnior, S/N , Cx Postal 510, CEP: 18618-970 - Botucatu / SP, Brazil.

2 Laboratorie d' Écologie Végétal, Département des Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, Québec, Canada.

3 Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Departamento de Ciência Florestal, Fazenda Experimental Lageado, Rua José Barbosa de Barros, 1780, CEP: 18610-307 - Botucatu / SP, Brazil.

* Corresponding autor; e-mail: carmen@fca.unesp.br

ABSTRACT

Background and Aims In some tropical species leaf production is related to photoperiod, and cambial activity and radial growth are strongly related to seasonal rainfall. In addition, bud opening and onset of cambium can be related events in some species. In Cerrado, a tropical ecosystem with seasonal rainfall, it was observed whether cambial activity and leaf production are seasonal events, whether these events are correlated one to each other and with climatic and environmental features in a woody species.

Methods For cambial activity, samples from main stem of *Kielmeyera grandiflora* (Wawra) Saddi (Calophyllaceae) were collected monthly, between September 2011 to December 2012. At the same time, monthly phenological observations were made to assess the seasonal production of leaves and to compare with cambial activity data. To check whether the environmental features are related to bud opening and onset of cambium, we calculated the average of temperature and day length, and the sum of precipitation in a time window ranging from 1 to 30 days before the occurrence of these events. With these values we calculated the coefficient of variation of mean values to assess the variability between years.

Key results Leaf production and cambial activity were seasonal events. Bud opening occurred in September 2011 and August 2012, during dry season The onset of cambium occurred both 2011 and 2012, one to two months after bud opening, at beginning of the rainy season. Cambium dormancy was observed in May, before the end of the rainy season. Day length and temperature showed low coefficient of variation along the time window before bud opening and onset of cambium, while rainfall present high coefficient of variation.

Conclusions The results suggest that a set of features can be related to apical and lateral growth in Cerrado species.

Key words: buds; cambium; Cerrado, *Kielmeyera grandiflora*, leaf production; phloem; seasonal growth, xylem.

INTRODUCTION

Tropical ecosystems show a great diversity in plant species and functional types (Borchert, 1999; Clarke and Gaston, 2006). Due to this diversity, different patterns of activity in apical (buds) and lateral (vascular cambium) meristems are expected. Among the growth patterns, the seasonal growth is a common feature among tropical species (see Venugopal and Krishnamurty, 1987; Rivera *et al*., 2002). Considering the relationships between apical and lateral seasonal growth, some studies observed that in some species bud opening and onset of vascular cambium could be related, but no definitive rule could be drawn (see Rajput and Rao, 2001a). These observations give origin to the follow question: do the apical and lateral growths of tropical trees consist of phenologically-related events?

About the relationship between bud opening and environmental features, the increase in photoperiod is the major signal involved in bud opening in a representative number of tropical species (Rivera *et al*., 2002; Yánez-Espinosa *et al*., 2006). However, a positive relationship between maximum temperature and bud opening in three tropical species from Mexico was observed (Yánez-Espinosa *et al*., 2006), suggesting the importance of these feature in bud reactivation. Although temperature appears to be an important feature related to bud opening, the information about these relationships is still scarce for tropical species.

Regarding the relationships between the seasonal lateral growth and climatic factors, it is observed that the rainy period has been linked with the seasonality in cambium activity (Rao and Rajput, 1999; Marcati *et al*., 2006a; Marcati *et al*., 2008; Dié *et al*., 2012), and in some species, the onset of cambial activity is synchronous with the onset of the rainy season (Krepkowski *et al*., 2011; Wang *et al*., 2013). Regarding cambium dormancy, Worbes (1995) states that a period of two to three months with less than 60 mm monthly rainfall generates a water stress and induces dormancy of vascular cambium. In many species, the vascular

cambium remain dormant during the dry season (Aljaro *et al*., 1972; Rao and Rajput, 2001; Marcati *et al*., 2006a). However, detailed histological studies of cambial zone show that in some species the onset of cambium can occur just before the start of the rainy season in areas with seasonal rainfall (Dave and Rao, 1982b; Rao and Rajput, 2001), which raises the question whether factors other than precipitation may be related to reactivation of cambium.

The Cerrado is a Brazilian phytogeographic domain inserted in the limits of tropical zone (Coutinho, 2006). Cerrado has some kinds of vegetation, and among them there is savannah vegetation, knowing as cerrado *sensu strictu* (Oliveira-Filho and Ratter, 2002). In Cerrado the rainfall is seasonal: there is a rainy season between October – April, and a dry season between May – September (Coutinho, 2002). The mean temperature is 22-23°C, but the maximum temperature can range 40°C in the summer, and the minimum temperatures can range 0°C in the winter (Coutinho, 2002). Moreover, Cerrado has many species with growth markers in wood (Marcati *et al*., 2006b), giving evidences about the existence of seasonal growth in these species. Thus, Cerrado is a good environment to study the relationships between seasonal weather and periodic growth.

The aim of this study is to assess the periodicity and the environmental drivers of the apical and lateral growth in *Kielmeyera grandiflora* (Wawra) Saddi (Calophyllaceae), a Cerrado woody species. *K. grandiflora* is a deciduous species typical from the Cerrado areas (Durigan *et al*., 2004; Santos *et al*., 2011; Caddah *et al*, 2012), and it is present in all states of Brazil where this phytogeographic domain occurs. Some species of the same genus have growth markers in the secondary xylem (Coradin, 2000; Marcati *et al*., 2006b), that are a indicative of allowing to raise the hypothesis that also *K. grandiflora* may have meristems showing periodical activity.

MATERIAL AND METHODS

Study site

The study was carried out in a Cerrado area in Rubião Junior district (22°53'11" S, 48°29'17" W), in Botucatu, São Paulo, Brazil. The vegetation of the area is a fragment of cerrado *sensu stricto*, composed of an herbaceous-shrub layer in association with sparse trees. The climate is warm temperate, with annual mean temperature of 20.3°C; the minimum temperature of the coldest month can reach to 0°C, and the maximum temperature in the warmest month draw near to 40 °C (Cunha and Martins, 2009). The annual rainfall of 1400-1500 mm is distributed throughout the year, although a dry period occur between April and September (Coutinho, 2002; Cunha and Martins, 2009). The soil is classified as oxisol, a deep and low nutrient availability soil with high concentrations of aluminum and iron (Motta *et al*., 2002). Bud and leaf phenology, and vascular cambium activity were monitored monthly from September 2011 to December 2012 in .*K. grandiflora*. Vouchers were deposited at the Herbarium "Irina Delanova De Gemtchujnicov" (BOTU) and stem samples were deposited at the Wood Collection "Maria Aparecida Mourão Brasil" (BOTUw).

Bud and leaf phenology

Bud and leaf phenology were recorded on a number of sample trees varying between 22 to 45. The low height of trees facilitated the observations of phenological phases (Table 01). The phenological phases were identified according to Morellato *et al*. (1989) procedure, modified by addition of subdivisions in some phonological categories. The phenological phases observed were: (a) leaf primordium emergence, the appearance of the red or light-

green colored leaf primordium; (b) young leaves, characterized by expanding, red coloured leaf blades; (c) expanded leaves, fully expanded, bluish-green leaves; (d) senescent leaves with a changing color becoming yellow or with brown spots on their surface; (e) leaf fall, when at least one of the following characteristics were observed, the leave drops easily from the branch, presence of leaf scars at the apex of the branch, presence of voids in the canopy or leafless branches.

A semi-quantitative value was attributed to each phenological phase according to the procedure by Fournier (1974), modified by reduction in the number of phenological classes, and redistribution of percentages in the remaining values. The assigned values ranged from 0 to 3, whether a phenological phase was lacking (0), present between 1 and 50% (1), between 50 and 70% (2), or more than 70% (3) of the crown.

Vascular cambium activity

Samples of 2 cm^3 were collected from the stem of 3-5 trees showing a circumference of at least 26 cm at breast height. Sample extraction was performed each month on different trees because the small diameter of the stem did not allow repeated sampling on the same individual. The samples containing bark, cambial zone and the recently formed xylem were taken from trunk at a height of 1.30 m from soil, with a saw, a hammer, and a chisel. In the periods when the bark easily separated from the trunk, sampling was performed with a saw and a stylus.

Samples were stored for c.a. one month in CRAF III fixative (chromic acid, glacial acetic acid and formaldehyde, Berlyn and Miksche, 1976). After fixation, cubes of 3 mm^3 were cut out from the samples, dehydrated in ascending alcohol series, and then passed

through a process of pre-infiltration with a solution of Historesin ® (Leica, Wetzlar, Germany) and ethanol 99.9% (1:1) for 7 days. The samples were infiltrated in pure historesin for 25-30 days, and were embedded in historesin (Bennet *et al*., 1976). The blocks were sectioned at 4-5 µm along the transverse, tangential and radial planes using a rotary microtome. The sections obtained were stained for 5 minutes with toluidine blue in phosphate buffer pH 4.7 that produced a metachromatic staining (O'Brien *et al*., 1964; O'Brien and McCully, 1981), and observed under a light microscope at magnifications of 400-1000×.

The vascular cambium was considered active when signs of cell division in the cambial zone were observed in terms of mitosis phases, phragmoplast and newly formed anticlinal or periclinal cell walls in the initial and mother cells (Evert, 1963; Farrar and Evert, 1997; Frankenstein *et al*., 2005). The dormant period occurred when there was no evidence of cell divisions in the cambial zone, and in tangential sections the radial walls of fusiform initial cells were thick, and with prominent primary pit-fields, giving the radial cell wall a "beaded aspect". Differentiation of secondary xylem was considered when at least one of the following characteristics were observed: enlargement of xylem derivatives, deposition of secondary wall and lignification (see Evert, 2006). Secondary phloem differentiation was considered when was observed the enlargement of phloem derivatives, presence of nucleus and/or dispersion of P-protein in sieve tubes (see Evert, 2006).

Weather data

Data of temperature and rainfall were obtained from the weather station belonging to the Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, installed in an open field located 9 km from the study site. Photoperiod data were obtained from website time and date (TimeandDateAS, 2014).

Data analysis

Weather data were averaged (temperature and photoperiod) or cumulated (rainfall) at time windows varying between 1 and 30 days preceding the events of leaf primordium emergence and cambium activity. As variability depends on the sample mean, the coefficients of variation were calculated to evaluate the variability between years, which allowed to standardize the measure of dispersion (standard deviation) to the mean.

RESULTS

Weather during the monitoring

Between August 2011 and December 2012, the average temperature was 22.1°C, with an absolute minimum of 2.4°C recorded in August 2011, and an absolute maximum of 36.2°C recorded in February 2012 (Fig. 1A). A variation of 2.9 h of light occurred during the year, from a minimum of 10.6 h in June, at the winter solstice, to a maximum of 13.5 h in December, at the summer solstice (Fig. 1B). In total, the site received 2526 mm of rain during the study period, of which 1895.8 mm felt during 2012. The distribution of rainfall was irregular: two rainy seasons occurred, between October 2011 and June 2012 (1745 mm) and between October and December 2012 (682.1 mm). Two dry periods were also observed in August-September 2011 (24.8 mm) and July-September 2012 (74.1 mm) (Fig. 1C).

Bud and leaf phenology

All phenological phases showed a clear seasonal pattern (Fig. 2). Leaf primordium emergence occurred with high intensity once per year, in September 2011 (52.17% of trees), and August 2012 (86.67% of trees). The peak was followed by a drastic reduction in leaf primordium emergence, occurring only in few branches of the crown. Young leaves peaked in the same months than leaf primordium emergence, but decreased gradually in the successive months (between 7 and 86% of trees still showed young leaves in October-May).

Expanded leaves were sporadic in September 2011 and August 2012, and represented the leaves remaining from the previous growth period. In October 2011 and September 2012, one month after the peaks in leaf primordium emergence and young leaves, an abrupt increase in the amount of mature leaves was observed (from 13% to 100% in 2011 and from 13% to 86% in 2012), indicating that leaf expansion was nearly complete. The trees showed a complete foliage until April 2012, when the percentage of trees with mature leaves began to reduce. This reduction occurred until August 2012.

Leaf senescence and leaf fall spread several months. The first senescent leaves were observed in November of both years, but in a small number of trees and with a low intensity (between 4 and 5% of trees). From February 2012, 70% of the trees showed senescent leaves, but with a low intensity, and in August trees were almost without senescent leaves. Leaf fall began in February, and increased during the following months, culminating in July, when more than 90% of the trees lost their leaves, and 57% of the trees were classified at the degree 3. In August, the last leaves fell. In September 2012, a fire occurred in the study area that led the fall of the young leaves.

Cambial activity and differentiation of vascular tissues

The vascular cambium showed a seasonal activity (Figs 3-4). In May the vascular cambium was dormant, without evidence of cell divisions (Fig. 4A). In this period, the radial walls of fusiform initial cells in tangential sections were thick with numerous pit fields, giving to the wall a "beaded" aspect (Fig. 4B).

The onset of cambium activity occurred in October in both years (2011-2012, Fig. 3A), when signs of cell division in the cambial zone were observed in terms of mitosis, phragmoplast (Fig. 4D, E) and newly formed anticlinal or periclinal cell walls (Fig. 4E). In this period, the radial walls of fusiform initials in tangential sections were thin and smooth, and primary pit fields were not prominent (Fig. 4F).

The differentiation of xylem and phloem was also seasonal (Fig. 3BC), and these processes were simultaneous with the beginning of the cambium activity. Phloem and xylem differentiation extended until May and June, respectively, about one and two months after the end of cambial activity. The vascular cambium remained active for seven months and differentiation of secondary xylem and phloem occurred for about eight to nine months, respectively.

Relationship between bud opening and vascular cambium

In both years, the onset of vascular cambium activity and the beginning of xylem and phloem differentiation occurred in October, one to two months after leaf primordium emergence. In this period, more than 60% of trees showed the leaves fully developed.

Dormancy of vascular cambium and ending of xylem and phloem differentiation corresponded with the increasing of senescent leaves.

Relationship between phenology and weather and environmental features

The peaks of leaf primordium emergence and new leaves occurred during the dry period (September 2011; August, 2012), when the photoperiod was increasing from 10 to 11 hours (Fig. 1-2). Most mature leaves were present during the rainy season. Leaf senescence and leaf fall started in the rainy period (November both 2011 and 2012), but the higher intensity of leaf fall occurred during the dry period.

The onset of vascular cambium activity and the beginning of xylem and phloem differentiation occurred at the beginning of the rainy season (October both 2011 and 2012), when the mean temperature was 21.7 °C, and day length was near to 12 h (Fig. 1, 3). The dormancy of the vascular cambium started when the rainy events were still abundant (May 2012), with a mean temperature of 18.9 °C and daylenght of less than 12 h.

Coefficient of variation from weather features

Across a time window of 30 days, both leaf primordium emergence and onset of vascular cambium activity showed the same pattern of the coefficient variation of weather (Fig. 5). The minimum, mean and maximum temperatures, as well as photoperiod, showed lower coefficients of variation within the time window (between 0,056 and 16,089), while the precipitation showed higher values (141 for leaf primordium emergence, between 61 and 141 for onset of vascular cambium activity). Along the time scale, variations in the coefficients of

variation of rainfall and photoperiod were constant, while the coefficients of minimum, mean and maximum temperature showed the greatest variability.

DISCUSSION

Periodicity of meristem activity

In this study, the growth dynamics of leaf production and cambial activity of *K. grandiflora* were monitored monthly from September 2011 to December 2012. The results show that this species has a clear seasonal pattern in leaf production, cambium activity and differentiation of secondary vascular tissues, confirming the periodicity in growth observed for *Kielmeyera coriacea*, a sympatric species of the same genus (Coradin, 2000). Tropical ecosystems are composed of a mosaic of functional types with species exhibiting different patterns of apical and lateral meristem growth (Borchert, 1999, 2000). The results of this study are compatible with those observed for other tropical species, where leaf production and cambial activity are represented by seasonal events (see Venugopal and Krishnamurty, 1987; Marcati *et al*., 2008; Trouet *et al*., 2012).

Leaf development and cambial activity

In *K. grandiflora*, the onset of cambial activity in the main stem occurred when the new leaves were completing their development, two months after leaf primordium emergence. The scientific literature is rich of examples of tropical species with cambium reactivating either before, during or after bud opening (see Venugopal and Krishnamurty, 1987; Rao and Rajput, 1999; Rao and Rajput, 2001; Rajput and Rao, 2001b), indicating the co-existence in

plants of distinct patterns relating bud opening and cambium reactivation. However, in a representative number of diffuse porous deciduous species, such as *K. grandiflora*, the resumption of cambial activity and the formation of the first vessel elements occur after bud opening (Lu and Chiang, 1975; Dave and Rao, 1982; Suzuki *et al*., 1996). Our results are in agreement with the observations performed in both tropical ecosystems, confirming the knowledge on deciduous species with diffuse porosity.

Some authors propose that the reactivation of the vascular cambium is related to plant hormones, in particular auxin (Larson, 1969; Lachaud *et al*., 1999; Li *et al*., 2013). In trees, most auxin is produced in the apical regions during leaf emergence and expansion (Berleth *et al*., 2000; Ljung *et al*., 2001; Aloni *et al*., 2003), and moves basipetally along the stem (Sachs, 2000). Larson (1969) proposed that the auxin produced in apical buds was responsible for the basipetal reactivation of the vascular cambium, and leading to a temporal lag between auxin production and the onset of the vascular cambium. However, in some species the resumption of cambial activity occurs before bud burst (Rossi *et al*., 2009; Li *et al*., 2013), suggesting that the reactivation of the cambium may be more related to sensitivity of cambium cells to the presence of auxin irrespective of its amount in cambial zone (Baba *et al*., 2011. In addition, manipulating experiments with local heating of stem induced a resumption of cambial growth in conifer species, indicating that this meristem does not require necessarily auxin from young needles for its reactivation (Gričcar *et al*., 2006; Begun *et al*., 2010). However, the observed lag between leaf primordium emergence and onset of cambium activity in *K. grandiflora* support the idea proposed by Larson (1969). In this species, it is possible that the auxin produced in apical buds may be involved with the resumption of cambial activity.

In both years, onset of cambial activity occurred when the new leaves were almost fully expanded and mature. Furthermore, as observed in other tropical species, the central period of cambial activity and differentiation of secondary vascular tissues occurred when

trees were with their foliage completely developed (Rajput and Rao, 2001a; Marcati *et al*., 2006a; 2008; Trouet *et al*., 2012).

The leaves are the main organ related to the production of carbohydrates and hormones, such as auxin, necessary for the growth and development of the plant (Kozlowski *et al*., 1991; Ljung *et al*., 2001). The young leaves are photosynthetically active, but the use of reserves for their respiration usually exceeds the production of photosyntates by photosynthesis, therefore their early growth is strongly dependent from the carbohydrates stored in the stem in form of starch, or in the near old leaves (Kozlowski *et al*., 1991; Deslauriers *et al*., 2014). As *K. grandiflora* is a deciduous species, the canopy renewing occurs once a year, and the new foliage takes one to two months to complete its development. Probably, the photosyntates produced during this period are consumed exclusively by leaf and branch development, and are not available to the other sinks of the plant. Thus, cambium activity and differentiation of the vascular tissues occur when the leaves have completed their development and can act as active sources of carbon, supplying with recently-produced photosyntates the growth of lateral tissues.

Photoperiod, temperature, rainfall and meristem reactivation

In *K. grandiflora*, leaf primordium emergence and onset of vascular cambium occurred when photoperiod was increasing (from 10 to 11h for bud opening; from 11 to 12h for onset of cambium), while cambium dormancy occurred when photoperiod was decreasing (from 12 to 11h). Moreover, both leaf primordium emergence and cambium reactivation showed low coefficients of variation of photoperiod in the time window of 30 days before these events, indicating a strong homogeneity of this environmental factor between the two study years. The annual cycle of change in photoperiod is regular enough to represent a

constant signal for plants (Rossi *et al*., 2006), and the perception of light by phytochrome provides a temporal mechanism that ensures that bud opening and the onset of cambium occur at appropriate moment of the year (Smith, 2000). Our data show that changes in photoperiod explain the observed synchronization of both leaf primordium emergence and onset of cambium, and confirm the relationships between phenology and photoperiod in tropical species (Rivera *et al*., 2002; Yánez-Espinosa *et al*., 2006; Trouet *et al*., 2012). Temperature also showed low coefficients of variation for both leaf primordium emergence and onset of cambium activity, providing evidence of the importance of this climatic factor for growth resumption of this species. In temperate regions, the breaking of dormancy and cambium reactivation are directly linked to temperature (Wesołowski and Rowiński, 2006; Deslauriers *et al*., 2008; Caffarra and Donnelly, 2011). For breaking of dormancy, it is necessary that the plants are exposed to low temperatures (chilling process), and accumulate a certain amount of heat sums (forcing process). For the onset of cambium, Deslauriers et al (2008) observed that high temperatures in the spring above the historical average anticipated both cambium reactivation and xylogenesis in a conifer species in an Italian timberline. However, for tropical species, information about relationship between temperature and growth reactivation are still scarce, and few papers relate a positive relationship between maximum or minimum temperature and apical and lateral growth (see Ajmal and Iqbal, 1987; Rajput and Rao, 2001; Yánez-Espinosa *et al*., 2006; Venugopal and Liangkuwang, 2007).

The cambium completed its activity in May 2012, a period with amount of rainfall and high temperatures, two months before the end of the differentiation of xylem and phloem. The processes of formation of xylem and phloem is composed of a number of steps initiated with the formation of new cells by cambium (Fukuda, 1996). Moreover, the completion of secondary xylem differentiation is not always simultaneous with the onset of cambium dormancy (Gričcar *et al*., 2005; Rossi *et al*., 2006), observed that highest rates of growth in

conifers occurred before the period of the year with higher temperatures, allowing plants to complete the deposition of secondary wall and lignification before winter, in a period where conditions are still favorable to growth. The Cerrado domain is characterized by a dry and cold winter, when the monthly rainfall is less than 60 mm and temperatures attaining the freezing point (Coutinho, 2002). These results suggest that cambium dormancy in *K. grandiflora* in a period still favourable for growth occur before winter in order to secondary vascular tissues finishes its differentiation under favorable conditions. These results are in agreement with the observations in others tropical species experiencing seasonal environments (Lu and Chiang, 1975; Desphande and Rajendrababu, 1985).

The leaf primordium emergence occurred during the dry season, when rainfall was low, and precipitation showed high coefficients of variation within the time scale of 30 days before bud opening. These results suggest that rainfall is not a determinant feature for bud opening in *K. grandiflora*. Similar results were observed in other tropical ecosystems, where bud opening occurred at the end of the dry season (Desphande and Rajendrababu, 1985; Rao and Rajput, 2001; Rivera *et al*., 2002). Some tropical species access the water stored in deep soil or in stem tissues in the dry season, which enable it to produce new leaves before the onset of rains (Borchert, 1999). Jackson *et al*. (1999) observed that another *Kielmeyera* species from cerrado access water in the deep soil, allowing it to produce new leaves during the dry period. As other cerrado species, *K grandiflora* probably access the water in deep soil to begin produce new leaves during the dry period.

The onset of vascular cambium in many tropical species occurs together witth the onset of rains, and the cambial activity and secondary tissues differentiation are correlated with the rainy season (see Rajput and Rao, 2001a; Yánez-Espinosa *et al*., 2006; Krepkowski *et al*., 2011). However, in a detailed reading of the studies that explored the cambial activity at histological level, it is observed that the onset of cambium may occur at the end of the dry

season, when the first rains have not still felt (Dave and Rao, 1982; Rajput and Rao, 2001b). In the present study the onset of cambial activity coincides with the beginning of the rainy season, but the high coefficients of variation of rainfall data over the time scale of 30 days before the onset of cambium show that rainfall is highly variable, indicating that this factor is not a good indicator for the resumption of cambial activity. However, like others tropical species, it seems that the rainfall is important for cambial activity as a whole, since the period of cambial activity in this species overlaps with the core of the rainy season (see Rajput and Rao, 2000; Marcati *et al*., 2006; Wang *et al*., 2013).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) [2009/17778-9] and Fonds de la recherche du Québec – Nature et Technologies [187055]. We tanks to Liliane Catarina Pereira for assistance in laboratory procedures and Wolker Bittrich by species identification. . Thaks to weather station of Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, campus Botucatu, for providing the meteorological data.

LITERATURE CITED

Ajmal S, Iqbal M. 1987. Annual rhythm of cambial activity in *Streblus asper*. *IAWA Bulletin ns* **8**: 275-83.

Aljaro ME, Avila G, Hoffmann A, Kummerow J. 1972. The Annual Rhythm of Cambial Activity in Two Woody Species of the Chilean" Matorral". *American Journal of Botany* **59**: 879-885.

Aloni R, Schwalm K, Langhans M, Ullrich CI. 2003. Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in Arabidopsis. *Planta* **216**: 841-853.

Baba K, Karlberg A, Schmidt J, *et al*. 2011. Activity–dormancy transition in the cambial meristem involves stage-specific modulation of auxin response in hybrid aspen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 3418-3423.

Begum S, Nakaba S, Oribe Y, Kubo T, Funada R. 2010. Cambial sensitivity to rising temperatures by natural condition and artificial heating from late winter to early spring in the evergreen conifer *Cryptomeria japonica*. *Trees* **24**: 43-52.

Bennett HS, Wyrick AD, Lee SW, McNeil JH. 1976. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. *Stain Technlogy* **51**: 71-97.

Berleth T, Mattsson J, Hardtke CS. 2000. Vascular continuity and auxin signals. *Trends in plant science* **5**: 387-393.

Berlyn GP, Miksche JP. 1976. *Botanical microtechnique and cytochemstry*. Ames: The Iowa State University Press.

Borchert R. 1999. Climatic periodicity, phenology and cambium activity in tropical dry forest trees. *Iawa Journal* **20**: 239-248.

Borchert R. 2000. Organismic and environmental controls of bud growth in tropical trees. In: Víemont JD, Crabbé J. eds. *Dormancy in plants: from whole plant behavior to cellular control*. Wallingford: CAB International**:** 87-107.

Caddah MK, Mayer JLS, Bittrich V, Amaral, MCE. 2012. Species limits in the *Kielmeyera coriacea* complex (Calophyllaceae)–a multidisciplinary approach. *Botanical Journal of the Linnean Society* **168**: 101-115.

Caffarra A, Donnelly A. 2011. The ecological significance of phenology in four different tree species: effects of light and temperature on bud burst. *International journal of biometeorology* **55**: 711-721.

Clarke A, Gaston KJ. 2006. Climate, energy and diversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**: 2257-2266.

Coradin VTR. 2000. *Formação de anéis de crescimento e sazonalidade da atividade cambial de dez espécies lenhosas do cerrado*. PhD Thesis, Universidade de Brasília, Brasília.

Coutinho LM. 2002. O bioma do cerrado. In: Klein AL. ed. *Eugen Warming e o cerrado brasileiro*. São Paulo: UNESP, Imprensa Oficial do Estado, 77-92.

Coutinho LM. 2006. O conceito de bioma. *Acta Botanica Brasilica* **20**: 13-23.

Cunha AR, Martins D. 2009. Classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manoel, SP. *Irriga* **14**: 1-11.

Dave YS, Rao KS. 1982. Seasonal activity of the vascular cambium in *Gmelina arborea* Roxb. *IAWA Bulletin ns* **3**: 59-65.

Deslauriers A, Rossi S, Anfodillo T, Saracino A. 2008. Cambial phenology, wood formation and temperature thresholds in two contrasting years at high altitude in southern Italy. *Tree Physiology* **28**: 863-871.

Deslauriers A, Beaulieu M, Balducci L, Giovannelli A, Gagnon MJ, Rossi S. 2014. Impact of warming and drought on carbon balance related to wood formation in black spruce. *Annals of botany* **114**:, 335-345.

Deshpande BP, Rajendrababu T. 1985. Seasonal changes in the structure of the secondary phloem of *Grewia tiliaefolia*, a deciduous tree from India. *Annals of botany* **56**: 61-72.

Dié A, Kitin P, Kouamé FNG, Van den Bulcke J, Van Acker J, Beeckman H. 2012. Fluctuations of cambial activity in relation to precipitation result in annual rings and intra-

annual growth zones of xylem and phloem in teak (*Tectona grandis*) in Ivory Coast. *Annals of botany* **110**: 861-873.

Durigan G, Siqueira MF, Franco GADC, Contieri WA. 2004. A flora arbustivo-arbórea do Médio Paranapanema: base para a restauração dos ecossistemas naturais. In: Vilas-Boas O, Durigan G. eds. *Pesquisas em conservação e recuperação ambiental no Oeste Paulista: resultados da cooperação Brasil/Japão*. São Paulo: Páginas e Letras, 199-239.

Evert RF. 1963. The cambium and seasonal development of the phloem in *Pyrus malus*. *American Journal of Botany* **50**: 149-159.

Evert RF. 2006. *Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*, 3rd edn. New Jersey: John Wiley & Sons INC.

Farrar JJ, Evert RF. 1997. Ultrastructure of cell division in the fusiform cells of the vascular cambium of *Robinia pseudoacacia*. *Trees* **11**: 203-215.

Fournier LA. 1974. Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas em árboles. *Turrialba* **24**: 422-423.

Frankenstein C, Eckstein D, Schmitt U. 2005. The onset of cambium activity–a matter of agreement? *Dendrochronologia* **23**: 57-62.

Fukuda H. 1996. Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. *Annual review of plant biology* **47**: 299-325.

Gričar J, Čufar K, Oven P, Schmitt U. 2005. Differentiation of terminal latewood tracheids in silver fir trees during autumn. *Annals of Botany* **95**: 959-965.

Gričar J, Zupančič M, Čufar K, Koch G, Schmitt UWE, Oven P. 2006. Effect of local heating and cooling on cambial activity and cell differentiation in the stem of Norway spruce (*Picea abies*). *Annals of Botany* **97**: 943-951.

Jackson PC, Meinzer FC, Bustamante M, *et al*. 1999. Partitioning of soil water among tree species in a Brazilian Cerrado ecosystem. *Tree physiology* **19**: 717-724.

Kozlowski TT, Kramer Paul J, Pallardy SG. 1991. *The physiological ecology of woody plants*. San Diego: Academmic Press.

Krepkowski J, Bräuning A, Gebrekirstos A, Strobl S. 2011. Cambial growth dynamics and climatic control of different tree life forms in tropical mountain forest in Ethiopia. *Trees* **25**: 59-70.

Lachaud S, Catesson AM, Bonnemain JL. 1999. Structure and functions of the vascular cambium. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie* **322**: 633-650.

Larson PR. 1969. Wood formation and the concept of wood quality. *Yale University School Forestry* **74**: 1-54.

Li WF, Ding Q, Cui KM, He XQ. 2013. Cambium reactivation independent of bud unfolding involves de novo IAA biosynthesis in cambium regions in *Populus tomentosa* Carr. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**: 1827-1836.

Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G. 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal* **28**: 465-474.

Lu CY, Chiang SHT. 1975. Seasonal activity of the cambium in the young branch of *Liquidambar formosana* Hance. *Taiwania* **20**: 32-47.

Marcati CR, Angyalossy V, Evert RF. 2006*a*. Seasonal variation in wood formation of *Cedrela fissilis* (Meliaceae). *IAWA Journal* **27**: 199-211.

Marcati CR, Oliveira JS, Machado SR. 2006*b*. Growth rings in cerrado woody species: occurrence and anatomical markers. *Biota Neotropica* **6**. doi: 10.1590/S1676-06032006000300001.

Marcati CR, Milanez CRD, Machado SR. 2008. Seasonal development of secondary xylem and phloem in *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Trees* **22**: 3-12.

Morellato LPC, Rodrigues RR, Leitão-Filho HD, Joly CA. 1989. Estudo comparativo da fenologia de espécies arbóreas de floresta de altitude e floresta mesófila semidecídua na Serra do Japi, Jundiaí, São Paulo. *Revista brasileira de Botânica* **12**: 85-98.

Motta, PEF, Curi IN, Franzmeier, DP. 2002. Relation of soils and geomorphic surfaces in the Brazilian Cerrado. In: Oliveira PS, Marquis RJ. eds. *The cerrados of Brazil*. New York: Columbia University Press, 13-32.

O'brien TP, Feder N, McCully ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma **59***: 368-373.

O'Brien TP, McCully ME. 1981. *The study of plant structure: principles and selected methods*. Melbourne: Termarcarphi Pty LTD.

Oliveira-Filho AT, Ratter JA. 2002. Relation of soils and geomorphic surfaces in the Brazilian Cerrado. In: Oliveira PS, Marquis RJ. eds. *The cerrados of Brazil*. New York: Columbia University Press, 91-120.

Rajput KS, Rao KS. 2000. Cambial activity and development of wood in *Acacia nilotica* (L.) Del. growing in different forests of Gujarat state. *Flora* **195:** 165-171.

Rajput KS, Rao KS. 2001*a*. Cambial activity and development of xylem in *Tamarindus indica* L. growing in different forests of Gujarat state. *Acta Botanica Hungarica* **43**: 379-390.

Rajput K S, Rao K S. 2001*b*. Cambial anatomy and annual rhythm of secondary xylem development in the twigs of *Azadirachta indica* A. Juss.(Meliaceae) growing in different forests of Gujarat State. *Journal of Sustainable Forestry* **14**: 115-127.

Rao KS, Rajput KS. 1999. Seasonal behaviour of vascular cambium in teak (*Tectona grandis*) growing in moist deciduous and dry deciduous forests. *IAWA Journal* **20**: 85-93.

Rao KS, Rajput KS. 2001. Relationship between seasonal cambial activity, development of xylem and phenology in *Azadirachta indica* growing in different forests of Gujarat State. *Annals of forest science* **58**: 691-698.

Rivera G, Elliott S, Caldas LS, Nicolossi G, Coradin VT, Borchert R. 2002. Increasing day-length induces spring flushing of tropical dry forest trees in the absence of rain. *Trees* **16**: 445-456.

Rossi S, Deslauriers A, Anfodillo T, *et al*. 2006. Conifers in cold environments synchronize maximum growth rate of tree-ring formation with day length. *New Phytologist* **170**: 301-310.

Rossi S, Rathgeber CB, Deslauriers A. 2009. Comparing needle and shoot phenology with xylem development on three conifer species in Italy. *Annals of Forest Science* **66**: 1-8.

Sachs, T. 2000. Integrating cellular and organismic aspects of vascular differentiation. *Plant and Cell Physiology* **41**: 649-656.

Santos MF, Serafim H, Sano PT. 2011. Fisionomia e composição da vegetação florestal na Serra do Cipó, MG, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **25**: 793-814.

Smith H. 2000. Phytochromes and light signal perception by plants—an emerging synthesis. *Nature **407***: 585-591.

Suzuki M, Yoda K, Suzuki H. 1996. Phenological comparison of the onset of vessel formation between ring-porous and diffuse-porous deciduous trees in a Japanese temperate forest. *Iawa Journal* **17**: 431-444.

Time and Date. 2014. *Time and Date.* http://www.timeanddate.com/sun/brazil/sao-paulo. Retrieved in 24 Mar.

Trouet V, Mukelabai M, Verheyden A, Beeckman H. 2012. Cambial growth season of brevi-deciduous *Brachystegia spiciformis* trees from south central Africa restricted to less than four months. *PloS One* **7**: e47364. doi: 10.1371/journal.pone.0047364.

Venugopal N, Krishnamurthy KV. 1987. Seasonal production of secondary xylem in the twigs of certain tropical trees. *IAWA Bulletin ns* **8**: 31-40.

Venugopal N, Liangkuwang MG. 2007. Cambial activity and annual rhythm of xylem production of elephant apple tree (*Dillenia indica* Linn.) in relation to phenology and climatic factor growing in sub-tropical wet forest of northeast India. *Trees* **21**: 101-110.

Wang KH, Nobuchi T, Abdul Azim AA, Sahri MH. 2013. Seasonal variations in cambial anatomy of plantation-grown Azadirachta excelsa. *Journal of Tropical Forest Science* **25**: 111-117.

Wesołowski T, Rowiński P. 2006. Timing of bud burst and tree-leaf development in a multispecies temperate forest. *Forest Ecology and Management* **237**: 387-393.

Worbes M. 1995. How to measure growth dynamics in tropical trees: a review. *IAWA Journal* **16**: 337-351.

Yanez-Espinosa L, Terrazas T, Lopez-Mata L. 2006. Integrated analysis of tropical trees growth: a multivariate approach. *Annals of botany* **98**: 637-645.

Tabel 1: Height and circunference at breast height of studied trees of *K. grandiflora*

Tree	Heigth (m)	Circunference at breast height (cm)	Tree	Heigth (m)	Circunference at breast height (cm)
01	4,30	32	24	4,5	44
02	3,40	32	25	3,30	24
03	3,10	26	26	3,75	41
04	3,25	23,5	27	3,80	31
05	5	43	28	4,00	30
06	3,20	21	29	3,15	23
07	3,50	26,5	30	5,30	29
08	3,50	28	31	3,60	32
09	3,70	40	32	3,55	33,5
10	2,90	29	33	3,60	26
11	3,70	27	34	4,10	26
12	4,60	28	35	4,50	35
13	3,05	33,5	36	4,30	28
14	2,80	23	37	3,50	25
15	4	32	38	4,30	28
16	3,25	29	39	4,60	30,50
17	4,30	33,5	40	2,80	21
18	5,20	38	41	4,40	34
19	3,90	23,5	42	4,70	38
20	3,80	31	43	3,30	27
21	4,50	27,5	44	2,80	29
22	3,40	23	45	3,50	30
23	4,7	41	-	-	-

FIGURE CAPTION

FIG. 1. Weather features (temperature, photoperiod and rainfall) during the study period (from August 2011 to December 2012).

FIG. 2. Percentage of trees expressing phenological phase and percentage of trees in each phenogical degree.

FIG. 3. Periods of cambial activity, differentiation of secondary vascular tissue and percentage of trees that showed these events (black columns).

FIG. 4. Cambial activity and differentiation of vascular tissues of *K. grandiflora*. (A-B) dormant cambium. (A) narrow cambial zone in transverse section (double arrow). (B) Fusiform cambial cells with beaded aspect of radial walls in tangential sections. (C-F) cambium active. (C) Cambium with dormant aspect in transverse section of October 2011, without signs of cell division in cambial zone (double arrow), but with presence of mitosis in a cell from cambial zone at radial view in October 2011 (D). (E) Cambium active in November 2011, with phloem (Pd) and xylem (Xd) differentiation; arrows shows new cell walls formed in cambial zone (double arrow). (FD) Thin cell walls and phragmoplast (arrows) in tangential section. Scale bar (D) = 20µm; (A, C, E) = 50µm; (B, F) = 100µm. Abbreviations: CZ, cambial zone; X, secondary xylem; P, secondary phloem.

FIG. 05. Coefficients of variation from weather features in a time window of 30 days before leaf primordium emergence and onset of vascular cambium.

Figure 01

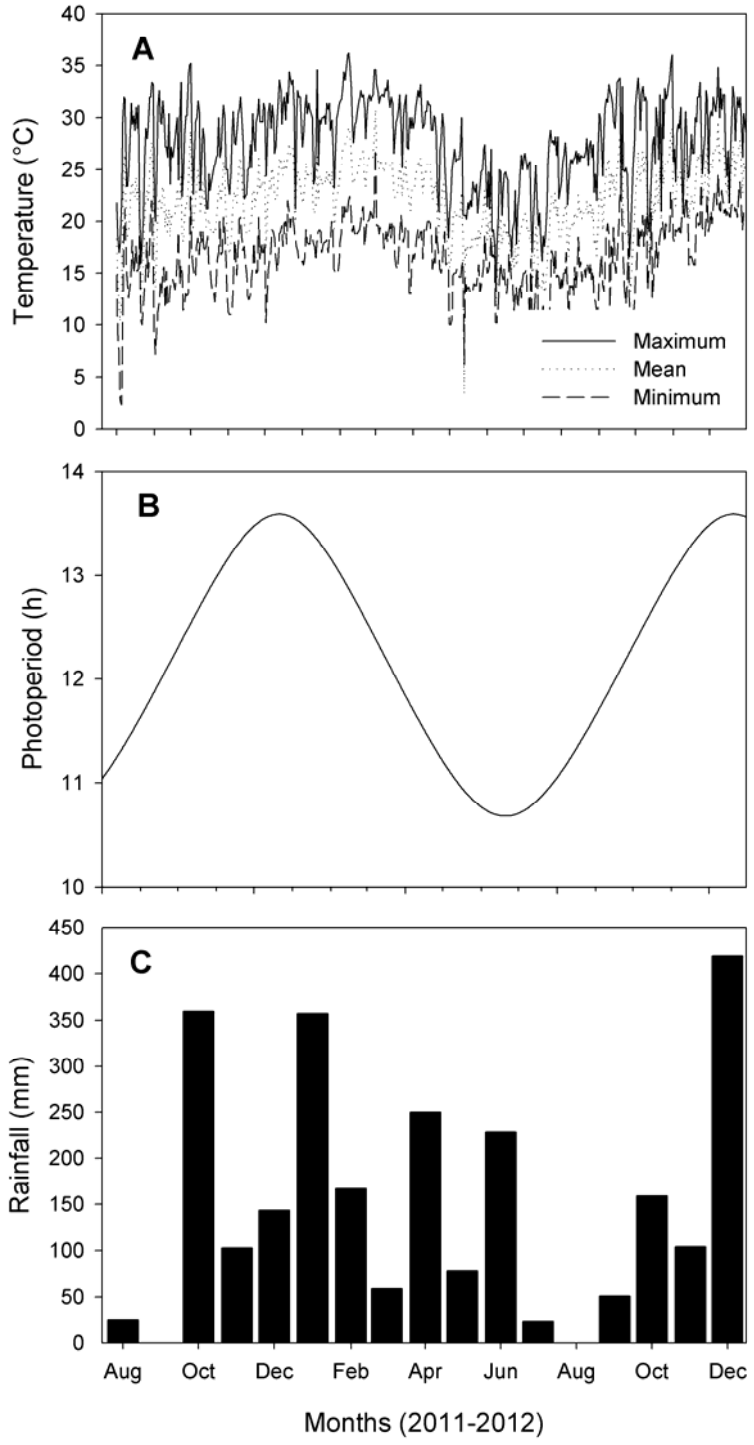

A
Temperature (°C)
Maximum
Mean
Minimum
B
Photoperiod (h)
C
Rainfall (mm)
Aug
Oct
Dec
Feb
Apr
Jun
Aug
Oct
Dec
Months (2011-2012)

Figure 2

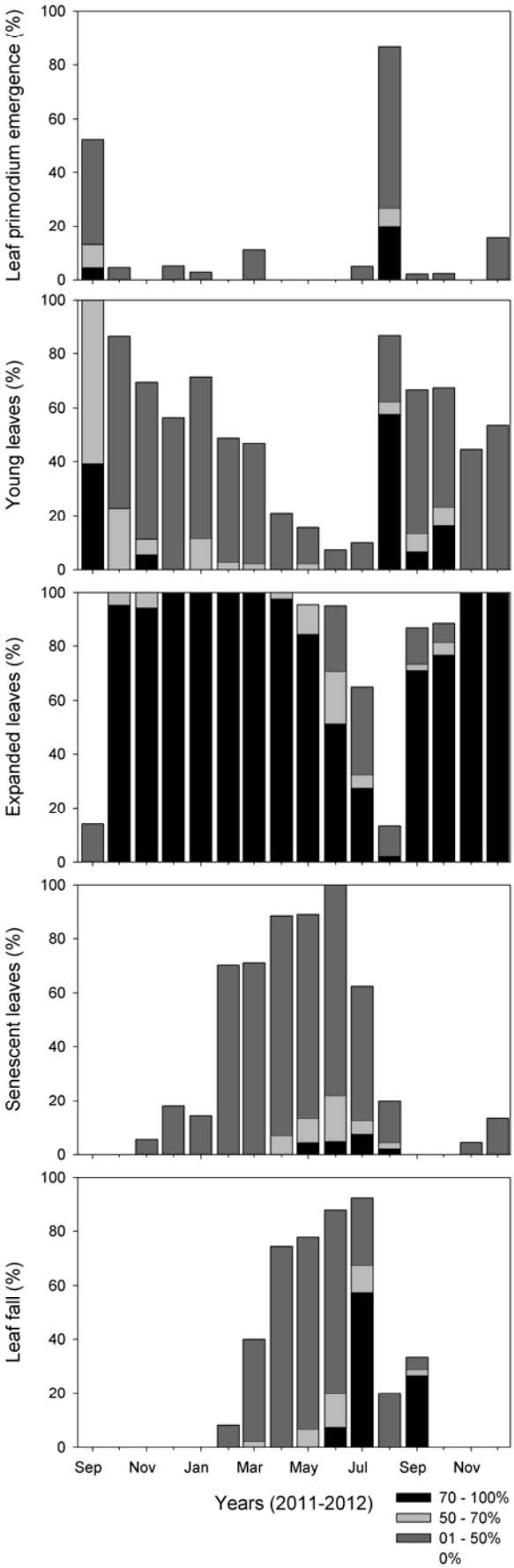

Leaf primordium emergence (%)
Young leaves (%)
Expanded leaves (%)
Senescent leaves (%)
Leaf fall (%)
0
20
40
60
80
100
Sep
Nov
Jan
Mar
May
Jul
Sep
Nov
Years (2011-2012)
70 - 100%
50 - 70%
01 - 50%
0%

Figure 3

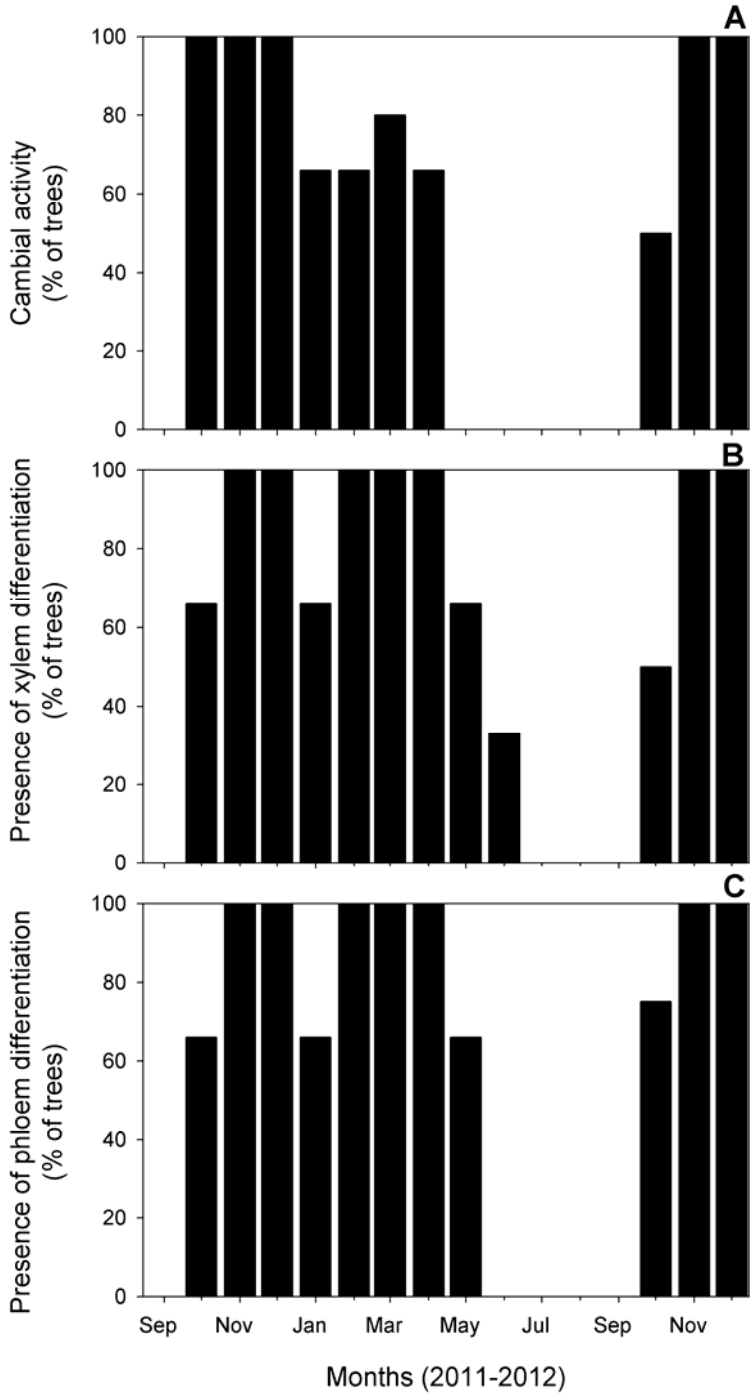

A
B
C
Cambial activity
(% of trees)
Presence of xylem differentiation
(% of trees)
Presence of phloem differentiation
(% of trees)
0
20
40
60
80
100
Sep
Nov
Jan
Mar
May
Jul
Sep
Nov
Months (2011-2012)

Figure 4

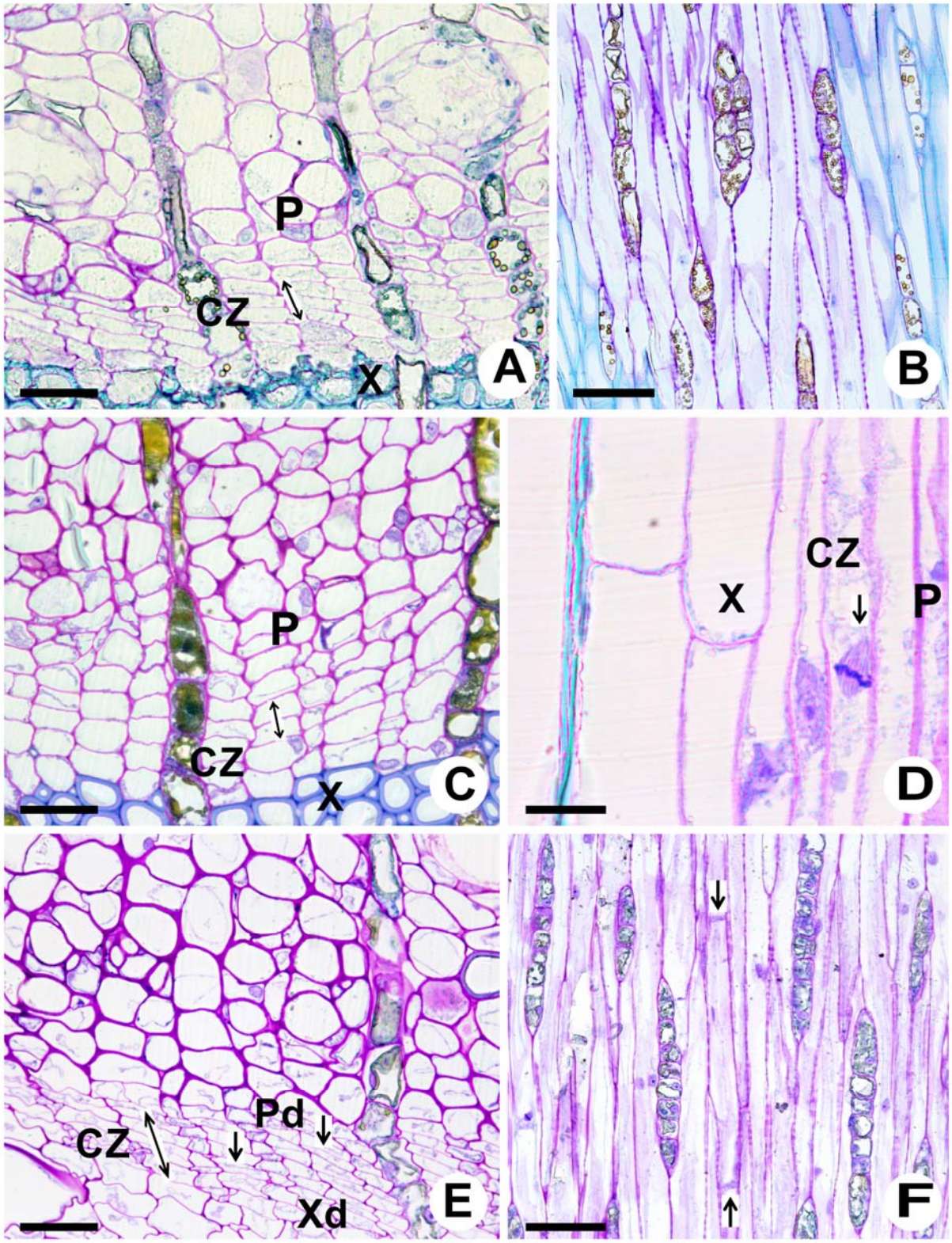
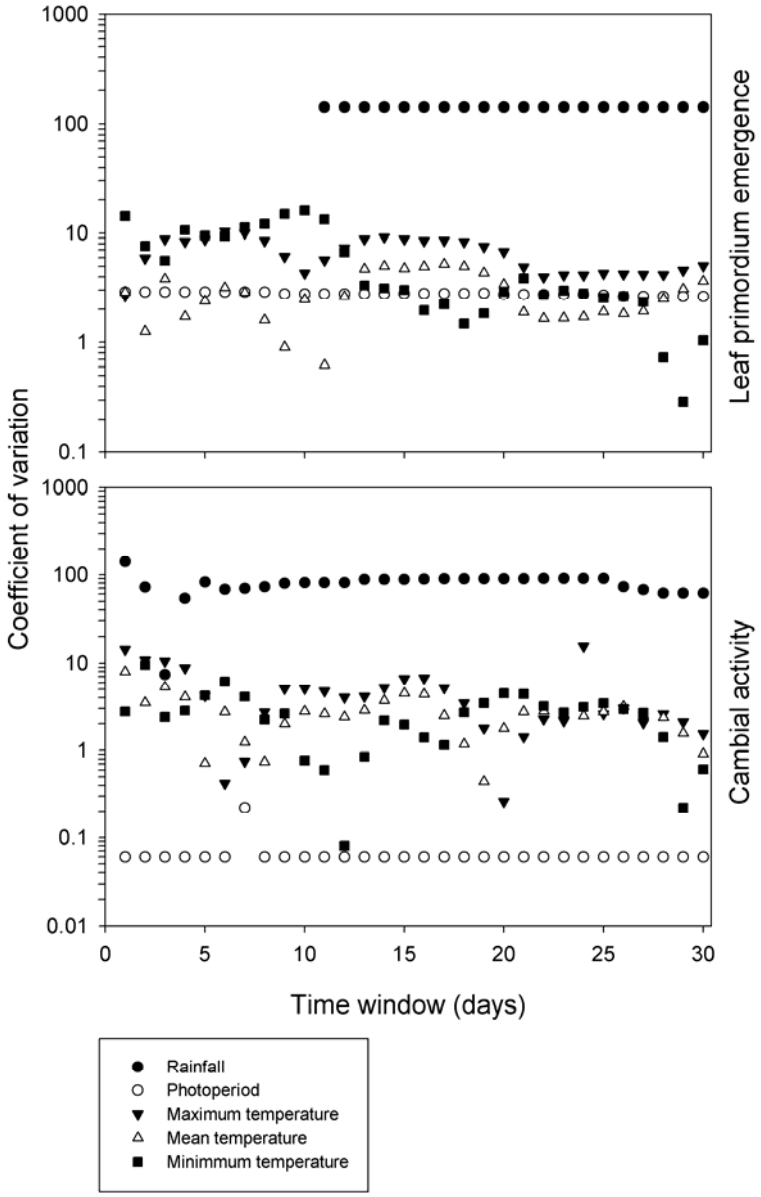


Figure 5


Coefficient of variation
1000
100
10
1
0.1
0.01
Leaf primordium emergence
Cambial activity
0
5
10
15
20
25
30
Time window (days)
Rainfall
Photoperiod
Maximum temperature
Mean temperature
Minimmum temperature

CAPÍTULO II

EFEITO DE ANELAMENTO CAULINAR NA PRODUÇÃO DE XILEMA SECUNDÁRIO E NO TAMANHO E DENSIDADE DOS VASOS EM *Aegiphila verticillata* Vell. (Lamiaceae)

Fabio Bosio[1*], **Sergio Rossi**[2] e **Carmen Regina Marcati**[3]

1 Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Distrito de Rubião Júnior, S/N , Cx Postal 510, CEP 18618-970 - Botucatu / SP, Brazil.

2 Laboratorie d' Écologie Végétal, Département des Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, Québec, Canada.

3 Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Departamento de Ciência Florestal, Fazenda Experimental Lageado, Rua José Barbosa de Barros, 1780, CEP 18610-307 - Botucatu / SP, Brazil.

* Autor para correspondência; e-mail: fabiobotanico@yahoo.com.br

RESUMO

Teoricamente a concentração de auxina é um dos fatores que regulam a dimensão do lúmen e da densidade de vasos no xilema secundário. No entanto, os poucos estudos que dão suporte a esta hipótese são baseados apenas em observações qualitativas. Assim, são necessários estudos anatômicos mais detalhados que observem a relação entre a auxina e as características de vaso. No presente estudo promoveu-se o anelamento do caule principal em *Aegiphila verticillata* Vell. (Lamiaceae) a fim de interromper o fluxo de auxina produzida na copa e, assim, avaliar se a interrupção no fluxo deste hormônio leva a alterações na dimensão do lúmen e na densidade dos vasos do xilema secundário. Adicionalmente, foi determinado o período de formação dos vasos maiores do lenho inicial na espécie. No estudo experimental, a proporção de xilema secundário produzido nas regiões acima do anelamento foi maior que a proporção produzida na região abaixo do anelamento. Os vasos formados após o anelamento tinham menor diâmetro, menor área do lúmen e estavam em maior densidade quando comparados com os vasos do xilema secundário formados no período anterior ao anelamento. A formação dos primeiros vasos de grande diâmetro do lenho inicial ocorreu no início da estação chuvosa concomitantemente à brotação e ao início do desenvolvimento das folhas novas. Os resultados mostram que a auxina parece estar relacionada com a regulação do tamanho do lúmen e na densidade de vasos, mostrando a importância deste hormônio na diferenciação do xilema secundário. Os resultados mostram também uma correlação positiva da precipitação e da brotação com o início da formação do lenho inicial na espécie.

Palavras-chave: auxina; ferimento; lenho inicial.

INTRODUÇÃO

O diâmetro dos vasos é uma das características relacionadas à condutividade hídrica nas plantas (ver Sperry *et al*. 2006). Um aumento em 20% do diâmetro de vaso implica na duplicação do volume de água conduzida, e que um vaso de grande diâmetro conduz um volume de água semelhante ao volume conduzido por 16 vasos com a metade do seu diâmetro (ver Zimmermman 1983; Sperry *et al*. 2006). Assim, é importante conhecer os fatores envolvidos nos processos de expansão do lúmen dos vasos.

Alguns estudos mostram que existe uma variação na área do lúmen dos vasos ao longo do corpo da planta, mostrando uma tendência no aumento da área do lúmen dos ramos em direção às raízes, bem como uma diminuição na densidade de vasos no mesmo gradiente (ver Anfodillo *et al*. 2006; Olson *et al*. 2014). Esta variação tem sido relacionada com aspectos funcionais na condução hídrica, mas pouco se conhece sobre os fatores envolvidos no processo de expansão do lúmen e na determinação da densidade dos vasos nas plantas vasculares.

Os hormônios vegetais são um dos fatores relacionados com a diferenciação dos elementos traqueais do xilema (ver Jacobs 1952; Aloni 2014). Dentre eles, a auxina é um dos que tem papel importante na sinalização para a diferenciação de elementos de vasos e de traqueídes (Jacobs 1952; Aloni 2014). Quanto à expansão do lúmen dos vasos, Aloni e Zimmermman (1983) propuseram a hipótese “do gradiente da auxina”. Segundo esta teoria, a auxina oriunda das folhas jovens segue até as raízes e atua como um sinal morfogenético. Este fluxo compõe um gradiente de concentração polar ao longo do eixo da planta, e controla a taxa de diferenciação celular e de expansão celular antes da deposição da parede secundária. Assim, altas concentrações de auxina próximas a folhas jovens induzem a diferenciação rápida, gerando um tempo limitado para a expansão celular e, consequentemente, levando à

formação de vasos estreitos. Por outro lado, baixas concentrações de auxina em porções mais basais do caule resultam na diferenciação celular mais lenta, permitindo uma expansão maior do lúmen que resulta em vasos com diâmetro maior. Alguns pesquisadores comentam sobre alterações nas características dos elementos traqueais em relação ao montante de auxina, mas estas observações são baseadas em análises qualitativas (ver Klee *et al*. 1987; Romano *et al.* 1991). Sendo assim, é importante a realização de estudos que testem a hipótese do gradiente de auxina e façam uma análise mais detalhada dos resultados.

O ácido indol-3-acético (AIA), auxina predominante nas plantas superiores, é produzido principalmente nas regiões apicais da planta, em folhas jovens e flores (Berleth *et al*. 2000; Ljung *et al*. 2001; Aloni *et al*. 2003). A auxina produzida nestes órgãos segue um fluxo polar no corpo da planta, dos ápices em brotação e folhas novas para caules e raízes (ver Gersani & Sachs 1984; Sachs 2000), induzindo a maturação polar do sistema vascular ao longo do eixo da planta (Aloni 1987). Sachs e Cohen (1982) comentam que ferimentos horizontais, como por o exemplo o anelamento, podem levar a um acúmulo local de auxina. Considerando que a principal fonte de auxina em plantas são as folhas jovens em formação (Ljung *et al*. 2001), e que este hormônio segue um fluxo polar no na zona cambial (Aloni 2010), pesquisas experimentais de interrupção do fluxo polar da auxina, via anelamento caulinar, podem trazer informações importantes sobre o papel desse hormônio na regulação da expansão do lúmen e na densidade de vasos, células importantes na condutividade hidráulica da planta.

Aegiphila verticillata Vell. (Lamiaceae) é uma espécie típica de Cerrado, sendo uma das 100 espécies mais frequentes nas regiões ao sul deste domínio fitogeográfico (Bridgewater *et al.* 2004). É espécie decídua (Pirani *et al*. 2009) , ou seja, a renovação da copa acontece durante um momento específico do ano, e a brotação e o desenvolvimento da nova folhagem ocorre cerca de um mês após a queda de folhas (ver Franco *et al*. 2005). Assim, esta

espécie pode servir como um modelo para estudos que abordem os efeitos da auxina no xilema secundário, uma vez que a produção de auxina ocorre é pontual, no momento da brotação.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da interrupção do fluxo de auxinas, no tamanho e na densidade dos vasos no xilema secundário em *A. verticillata*, bem como avaliar o período de formação dos vasos de maior diâmetro no lenho inicial desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi desenvolvido em um fragmento de cerrado localizado no bairro Rio Bonito (S 22°42'6.00" W 48°20'25.68"), município de Botucatu, estado de São Paulo, Brasil. A vegetação da área é *sensu stricto* em regeneração, e é composta por um extrato herbáceo-arbustivo e por um extrato arbóreo, com árvores distribuídas esparsamente pela paisagem, não compondo um dossel. O clima é temperado quente, com a temperatura média anual de 20,3°C; a temperatura mínima no mês mais frio pode chegar a 0°C, e a temperatura máxima do mês mais quente pode chegar a 40°C (Cunha & Martins, 2009). A precipitação anual varia entre 1400 a 1500 mm, e é distribuída ao longo do ano, embora possa ocorrer um período seco entre os meses de abril-maio a setembro (Coutinho 2002; Cunha & Martins 2009). O solo é do tipo latossolo, caracterizado por ser profundo, permeável, com baixa disponibilidade de nutrientes e com altas concentrações de alumínio e ferro (Motta *et al*. 2002).

Anelamento no caule principal

Foi montado um experimento em campo com plantas de *A. verticillata* em 05 de outubro de 2011. Nesta data as árvores estavam completamente sem folhas e sem sinais de brotação. A brotação e o início do desenvolvimento foliar ocorreu entre 15 a 20 dias após a instalação do experimento. Considerando que a brotação e as folhas novas em expansão são a principal fonte de auxina em plantas lenhosas (ver Berleth *et al*. 2000; Ljung *et al*. 2001; Aloni *et al*. 2003), o experimento foi montado em período anterior ao qual o principal montante de auxina fosse produzindo nas plantas em estudo.

Para compor o experimento foram escolhidas árvores com fuste reto, com circunferência entre X e Y , e altura entre X e Y (Tabela 1). O experimento foi composto por dois grupos:

Grupo anelamento: a fim de promover a interrupção do fluxo de auxina produzida durante a brotação e expansão foliar, foi feita a remoção completa da casca e do câmbio vascular num anel de 05 cm de comprimento na porção central do caule principal. Este grupo foi composto por cinco árvores.

Grupo sem anelamento: composto por quatro árvores, neste grupo o caule principal não foi anelado.

Em ambos os grupos foram feitas marcações no câmbio vascular para auxiliar na identificação do xilema secundário formado até o momento do anelamento daquele produzido após a data em que o caule foi anelado. No grupo anelamento, as marcações foram feitas em duas datas: a primeira em 05 de outubro de 2011, quando foi feita uma incisão de 03 cm de comprimento, tanto acima quanto abaixo ao anelamento, em todas as árvores deste grupo; a segunda marcação foi feita em duas árvores em 08 de novembro de 2011. No grupo sem

anelamento foi feita uma marcação em o5 de outubro de 2011, constituída de uma incisão de 01 cm de comprimento atingindo o câmbio vascular na porção central do caule.

Logo após o anelamento, as regiões aneladas das árvores foram recobertas com Parafilme® para e evitar a dissecação destas porções. Entre outubro de 2011 e junho de 2012, foram feitas visitas mensais às árvores estudadas, onde se observava se havia ou não a formação de tecidos de cicatrização nas regiões aneladas e o desenvolvimento de gemas e pequenos ramos nas regiões próximas ao anelamento. Sempre que presentes, os tecidos de cicatrização, as gemas e os novos ramos formados próximo ao anelamento foram removidos com o auxílio de uma lâmina afiada, e em seguida as regiões aneladas foram novamente recobertas com Parafilme®.

Coleta das amostras e procedimentos microtécnicos

As amostras caulinares foram coletadas em 27 de junho de 2012, cerca de oito meses após a instalação do experimento. No grupo anelamento foi coletada a porção do caule contendo a região anelada mais porções situadas a 10 centímetros de distância, tanto acima quanto abaixo, do anelamento. No grupo controle foi coletada a porção do caule contendo a região do ferimento mais 05 centímetros tanto acima quanto abaixo de distância deste. Estas amostras foram fixadas em FAA (formaldeído, ácido acético glacial e etanol 50%, Berlyn e Mische 1976), e permaneceram embebidas no fixador por cerca de sete dias. Após a fixação, as amostras foram armazenadas em etanol 70%.

As amostras do grupo anelamento foram subdivididas em discos com 01 cm de espessura, removidos nas distâncias de 01, 02, 05 e 10 cm do anelamento, tanto na porção acima quanto na porção abaixo do anel. A escolha destas posições foi baseada no princípio

que ferimentos horizontais, como por exemplo, o anelamento, pode levar a um acúmulo nas porções logo acima do ferimento (ver Sachs e Cohen 1982). Assim, nas porções situadas a 01 e 02 cm acima do anelamento espera-se observar os efeitos do provável acúmulo de auxinas nas características dos vasos, e nas porções situadas a 05 e 10 cm uma atenuação desses efeitos. No grupo sem anelamento, foi removido um disco com espessura de 01 cm na região onde foi feita a marcação no caule principal. Para as análises macroscópicas, estes discos foram polidos com uma série de lixas secas e lixas d'água. Primeiro utilizou-se uma sequência de lixas secas, com granulometria de 100 e 150, para o nivelamento das superfícies. Em seguida foram utilizadas lixas d'água, nas granulometrias de 320, 400, 600 e 1200 para o polimento da superfície nivelada. A análise macroscópica permitiu separar o xilema secundário formado antes e o formado depois do tratamento, com o auxílio dos ferimentos feitos no câmbio vascular em outubro e em novembro de 2011.

Após as análises macroscópicas, blocos com aproximadamente $1cm^3$ foram removidos dos discos para as análises microscópicas. Os blocos foram retirados de uma região afastada das marcações, para evitar os efeitos dos ferimentos de marcação. Estes foram seccionados em micrótomo de deslize, nos planos transversal, longitudinal tangencial e longitudinal transversal, e a confecção das lâminas permanentes seguiu as técnicas de Johansen (1940) e de Sass (1951). Os cortes foram clarificados em hipoclorito de sódio 50% e lavados em água acética 1%. Em seguida os cortes foram corados com dupla coloração com safranina aquosa 1% (Bukatsch 1972) e azul de astra aquoso 1% (Roeser 1972). Após a coloração, os cortes foram desidratados em uma série etanólica crescente (etanol 30% - 50% - 70% - 90% - 95% - 100%). Em seguida, a coloração foi fixada com acetato de butila e foram confeccionadas lâminas permanentes em meio sintético (Entellan®).

Obtenção dos dados

No grupo anelamento, calculou-se a proporção do xilema secundário formado após o anelamento nas regiões acima e abaixo deste. Optou-se pelo cálculo da proporção porque as árvores possuíam diâmetros diferentes e, assim, a comparação entre as posições foi mais precisa (Tabela 1). Para o cálculo das proporções, em cada disco de cada posição foram escolhidos aleatoriamente três raios. Com o auxílio de um paquímetro digital em cada um desses raios obteve-se duas medidas: a primeira compreendendo o xilema secundário formado até o momento do anelamento, onde mediu-se a distância entre o início do xilema secundário, na região próxima à medula até o início do xilema secundário formado após o anelamento; na segunda medida mediu-se o xilema secundário formado após o anelamento.

Ambas as medidas foram somadas, obtendo-se assim o valor total do raio. O valor correspondente ao xilema formado após o anelamento foi dividido pelo valor total do raio, obtendo-se assim a proporção de xilema formado após o tratamento. Nas porções situadas a 01, 02 e 05 centímetros de distância do anelamento as medidas da proporção de xilema secundário formado foram realizadas em quatro árvores, e nas porções situadas a 10 centímetros de distância do anelamento as medidas foram feitas em duas árvores, pois nestas regiões somente a marcação feita em novembro de 2011 possibilitou a identificação do xilema secundário formado antes e após o anelamento.

Para análise das características anatômicas dos vasos, foram obtidos os dados de diâmetro de vaso, área do lúmen de vaso e densidade de vasos (vasos por mm^2). Estes parâmetros foram medidos no xilema secundário formado após o anelamento que será denominado neste trabalho como “xilema secundário formado após o anelamento”, e no xilema secundário formado antes do anelamento adjacente à marcação feita no câmbio vascular, que serviu como controle e que será denominado como “xilema secundário formado

após o anelamento". No grupo anelamento, os dados foram obtidos nas amostras provenientes nas posições situadas a 01, 02 e 05 centímetros acima do anelamento e 01 centímetro abaixo, locais onde foi visível a marcação realizada no câmbio vascular e onde houve maior produção de xilema secundário. No grupo sem anelamento, os dados foram obtidos nos discos retirados da porção central do caule. Em função da quantidade de xilema secundário formado após o anelamento, a densidade de vasos foi medida em três campos por disco e os resultados foram transformados para o equivalente a uma área de um milímetro quadrado. O diâmetro e a área de vasos foram medidos em todos os vasos presentes em cada um dos três campos utilizados para a frequência de vasos, resultando em uma média de 55,43 vasos medidos por campo.

Análises estatísticas

Para verificar se a proporção de tecidos formada após o anelamento era diferente ao longo do caule no grupo anelamento, foi realizado um procedimento *glimmix* (modelo linear generalizado misto). Para verificar se houve diferenças entre as características anatômicas dos vasos formados no período anterior e no período posterior ao anelamento, os dados do grupo sem anelamento foram submetidos a o teste "t" pareado de Student, e os dados do grupo anelamento foram submetidos a uma análise se covariância (ANCOVA).

RESULTADOS

Análise geral

No grupo anelamento observou-se que, após o anelamento, a formação de xilema secundário foi proporcionalmente maior nas porções acima do anelamento (Fig. 1) quando

comparadas com as porções localizadas abaixo do anelamento (Fig. 2). Além disso, a produção de xilema nas porções abaixo ao anelamento foi muito irregular ao longo do disco (comparar as Fig. 2A, 2B). O procedimento glimmix mostra a existência de variação na proporção de xilema formado após ao anelamento ao longo do caule ($F=2,88$; $p<0,01$), e que o efeito foi diferente entre as árvores.

Com o auxílio das marcações feitas no câmbio vascular entre outubro e novembro de 2011 observou-se que os vasos grandes arranjados tangencialmente no lenho inicial formaram-se a partir de 05 de outubro de 2011 (Fig. 1, 2). A formação destes vasos coincidiu com o início da estação chuvosa (Fig. 3) e com a brotação e o início do desenvolvimento foliar do respectivo período.

Efeitos do anelamento nos parâmetros de vaso do xilema secundário

No grupo sem anelamento não foram observadas diferenças no diâmetro, na área do lúmen e na frequência de vasos entre os vasos formados no xilema secundário formado antes do anelamento daqueles formados no xilema secundário após o anelamento (Tabela 2).

No grupo com anelamento observou-se, após o anelamento, a formação de uma região anatomicamente alterada (Fig. 1, 2). Nesta porção os vasos do xilema secundário formado após do anelamento tinham diâmetro e área do lúmen menor quando comparados com os vasos formados no xilema secundário formado antes do anelamento (Fig. 4, 5; Tabelas 3-4) e apresentaram um número maior de vasos por mm^2 (Fig. 6; Tabelas 3-4). Quando as posições ao longo do caule foram comparadas entre si, não foi observada alteração nos parâmetros de vaso (Tabelas 3-4).

DISCUSSÃO

Efeitos do anelamento caulinar no xilema secundário

Neste estudo removeu-se o floema secundário e o câmbio vascular da porção central do caule de árvores em *A. verticillata*, visando à interrupção do fluxo de auxina proveniente da copa. Após o anelamento, observaram-se alterações significativas no diâmetro e na área do lúmen de vasos e na densidade de vasos formados, bem como diferença na proporção do xilema secundário formado após o anelamento entre as porções situadas acima e abaixo deste, mostrando que o anelamento resultou em alterações anatômicas na estrutura do xilema secundário.

Após o anelamento, os vasos tinham menor diâmetro e menor área do lúmen quando comparados com os vasos formados antes do anelamento. Resultados semelhantes foram obtidos por Wilson (1968) em traqueídes de caules em *Pinus strobus*. Aloni e Zimmermman (1983) propuseram que a concentração de auxina controla a taxa de diferenciação e de expansão celular antes da deposição da parede secundária. Segundo os autores, altas concentrações de auxina induzem a vasos estreitos por causa de sua diferenciação rápida, permitindo somente um tempo limitado para a expansão celular, enquanto que baixas concentrações de auxina resultam na diferenciação mais lenta, permitindo mais tempo para a expansão celular antes da deposição da parede secundária. Sachs e Cohen (1982) comentam que ferimentos horizontais como, por exemplo, o anelamento podem levar a um acúmulo local de auxina. Como o floema, o câmbio vascular e o felogênio são as principais vias do fluxo de auxina em plantas lenhosas (Uggla *et al*. 1996; Aloni 2010), presume-se que o anelamentoacarretou na interrupção do fluxo de auxina ao longo do caule principal, o que pode ter levado ao aumento dos níveis de auxina nas regiões acima do anelamento. Lev-

Yadun e Aloni (1993) relataram a diminuição do diâmetro de vasos como um dos efeitos de injúria em *Melia azedarach* e concluíram que tanto o efeito da injúria quanto o efeito do fluxo axial de substâncias sinalizadoras levaram ao resultado observado. Como observado por Lev-Yadun e Aloni (1993), no presente estudo também observou-se a formação de vasos de pequeno diâmetro após o anelamento. Assim, os vasos de pequeno diâmetro e de área menor formados após o anelamento podem ser resultado da interação entre a alteração na concentração e níveis de auxina presente no caule após o tratamento e os efeitos da injúria.

A hipótese do gradiente da auxina proposta por Aloni e Zimmermman (1983) também sugere que a densidade de vasos seja controlada pela concentração de auxina: altas concentrações de auxina levam a um aumento na densidade de vasos, e baixas concentrações deste hormônio levam a uma menor densidade destes (Aloni & Zimmermman 1983). Estudos com plantas alteradas geneticamente para a super produção de auxina (Klee *et al*. 1987), ou onde houve um aumento na concentração devido a aplicação de auxina no caule (ver Aloni 2013), mostram uma tendência no aumento do número de vasos, como observado no presente estudo. Considerando que o anelamento podem levar a um acúmulo local de auxina nas porções acima deste (Sachs & Cohen 1982), provavelmente um aumento na concentração de auxina na porção acima do anelamento pode ser um dos fatores envolvidos no aumento de número de vasos observado neste estudo.

Alguns estudos mostram que a largura do lúmen dos conduítes (vasos e traqueídes), aumenta num gradiente que vai dos ramos em direção à base do caule (Anfodillo *et al*. 2006, 2013; Olson *et al*. 2014), bem como a densidade de vasos diminui no mesmo gradiente (OLSON *et al*. 2014). Sachs (2000) comenta que apesar da concentração de auxina não ser o único fator envolvido na diferenciação vascular, a concentração de auxina nas células parece ser um fator decisivo para que ocorra a diferenciação vascular. No presente estudo, a alteração no tamanho e na densidade dos vasos nas porções logo acima do anelamento dão sinais que a

provavelmente a auxina seja um dos fatores que estão relacionados com o controle da expansão da área do lúmen e aumento da densidade de vasos nas plantas vasculares, como proposto por Aloni e Zimmermann (1983).

É importante ressaltar que além da auxina, outros hormônios como as citocininas, o etileno e os brassinoesteróides também participam na diferenciação dos elementos traqueais (Aloni 2013). Ou seja, provavelmente a alteração nas características de vasos observadas após o anelamento é resultado da interação desses hormônios com a auxina. No entanto, os resultados apresentados aqui são semelhantes aos observados por estudos que avaliaram características do sistema vascular em relação à concentração de auxina (Klee *et al*. 1987; Romano *et al*. 1991; Aloni 2013), o que dá evidências de que este hormônio provavelmente tem papel importante na regulação das dimensões do lúmen e da densidade de vasos.

O isolamento de porções de casca do restante do caule (através da remoção de anéis concêntricos de casca) pode resultar na produção irregular de xilema secundário nas porções isoladas (Evert *et al*. 1972). Neste estudo, uma produção irregular de xilema secundário foi observada na secção transversal dos discos, ao longo da circunferência. Esta produção irregular de xilema secundário foi melhor evidenciada nas porções inferiores ao anelamento, o que parece mostrar que a interrupção do fluxo de auxina através do anelamento afetou a produção de xilema nestas regiões, mostrando a importância deste hormônio na produção normal do xilema.

Os vasos produzidos após o tratamento nas porções inferiores ao anelamento também eram de diâmetro e área do lúmen menor, e estavam em maior densidade. Segundo Davies (1976), a auxina pode ser armazenada no caule e em outras partes da planta, inativa, conhecida como auxina conjugada. Esta auxina pode ser hidrolisada posteriormente sendo utilizada ativamente nos processos fisiológicos da planta (Davies 1976; Aloni 2013). Como o fluxo de auxinas produzida na copa foi interrompido pelo anelamento, provavelmente a

auxina armazenada no caule na região abaixo do anelamento esteve envolvida nas características dos vasos formados nessa região.

A. verticillata possui camadas de crescimento distintas, demarcadas por anel semiporoso (Sonsin *et al*. 2014). Neste estudo, observou-se que a formação dos vasos de grande diâmetro do lenho inicial ocorreu no começo da estação chuvosa, tal como foi descrito em *Tectona grandis* (Rao & Rajput 1999) e em *Cedrela fissilis* (Marcati *et al*. 2006). Adicionalmente, neste estudo, observou-se que a formação desses vasos ocorreu concomitantemente à brotação e ao desenvolvimento foliar. A formação dos vasos de grande diâmetro do lenho inicial concomitantemente ao desenvolvimento foliar provavelmente ocorre para que estes vasos contribuam com o fornecimento hídrico necessário para o desenvolvimento da nova folhagem da copa.

CONCLUSÕES

As alterações no diâmetro, na área do lúmen e na densidade de vasos do xilema secundário formado acima do anelamento caulinar corroboram a ideia que a auxina produzida na brotação e nas folhas jovens tem papel importante na regulação destas características. A produção irregular de xilema secundário nas porções abaixo do anelamento caulinar evidencia efeito da ausência da auxina proveniente da copa. A formação de vasos de grande diâmetro do lenho inicial ocorreu concomitante com a estação chuvosa e com a brotação e o desenvolvimento da nova folhagem da copa.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida ao primeiro autor. A Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), processo 2009/17778-9 pelo auxílio financeiro necessário ao desenvolvimento de pesquisa. À Liliane Catarina Pereira no auxílio nos trabalhos de laboratório. Ao laboratório de anatomia da madeira da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, campus de Botucatu e ao Laboratorie d' Écologie Végétal da Université du Québec à Chicoutimi pela seção do espaço e dos equipamentos para a realização desta pesquisa. À estação meteorológica da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, campus de Botucatu pelo fornecimento dos dados meteorológicos. Ao professor Jorge Yoshio Tamashiro pelo auxílio na identificação da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aloni R. 1987. Differentiation of vascular tissues. Annu. Rev. Plant Physiol. 38: 179--204.

— 2010. The induction of vascular tissue by auxin. In: PJ Davies (ed.), Plant hormones: biosynthesis, signal transduction: 485--506. Academic Publishers, Dordrecht.

— 2013. The role of hormones in controlling vascular differentiation. In: J. Fromm (ed.), Cellular aspects of wood formation: 99--139. Springer, Berlin Heidelberg.

— 2014. Ecophysiological implications of vascular differentiation and plant evolution. Trees: 1--14.

—, Schwalm K, Langhans M & Ullrich CI. 2003. Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in Arabidopsis. Planta 216: 841--853.

— & Zimmermman MH. 1983. The control of vessel size and density along the plant axis: a new hypothesis. Differentiation 24: 203--208.

Anfdillo T, Carraro V, Carren M, Fior C & Rossi S. 2006. Convergent tapering of xylem conduits in different woody species. New Phytologist 169: 279-290

Anfodillo T, Petit G & Crivellaro A. 2013. Axial conduit widening in woody species: a still neglected anatomical pattern. IAWA J. 34: 352--354.

Baas P, Werker E, & Fahn A. 1983. Some ecological trends in vessel characters. IAWA Bull. n.s. 4: 141--59.

Berleth T, Mattsson J & Hardtke CS. 2000. Vascular continuity and auxin signals. Trends Plant Sci. 5: 387--393.

Berlyn GP, Miksche JP. 1976. Botanical microtechnique and cytochemstry. The Iowa State University Press, Ames.

Bridgewater S, Ratter JA & Ribeiro JF. 2004. Biogeographic patterns, β-diversity and dominance in the cerrado biome of Brazil. Biodivers. Conserv.13: 2295--2317.

Bukatsch F. 1972. Bemerkungen zur doppelfärbung astrablau-safranin. Mikrokosmos 61: 255.

Coutinho LM. 2002. O bioma do cerrado. In: AL Klein (ed.), Eugen Warming e o cerrado brasileiro: 77--92. UNESP, Imprensa Oficial do Estado, São Paulo.

Cunha AR & Martins D. 2009. Classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manuel, SP. Irriga 14: 1--11.

Davies PJ. 1976. Bound auxin formation in growing stems. Plant Physiol. 57: 197--202.

Evert RF. 2006. Esau’s plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development, 3 ed. Wiley & Sons, New Jersey.

Evert RF, Kozlowski TT & Davis JD. 1972. Influence of phloem blockage on cambial growth of sugar maple. Am. J. Bot. 59: 632--641.

Franco AC, Bustamante M, Caldas LS, Goldstein G, Meinzer FC, Kozovits AR, Rundel P & Coradin VT. 2005. Leaf functional traits of Neotropical savanna trees in relation to seasonal water deficit. Trees 19: 326--335.

Gersani M & Sachs T. 1984. Polarity reorientation in beans expressed by vascular differentiation and polar auxin transport. Differentiation 25: 205--208.

Jacobs WP. 1952. The role of auxin in differentiation of xylem around a wound. Am. J. Bot. 39: 301--309.

Johansen DA.1940. Plant microtechnique. McGraw-hill, New York.

Klee HJ, Horsch RB, Hinchee MA, Hein MB & Hoffmann NL. 1987. Agrobacterium tumefaciens T-DNA. Genes dev. 1: 86--96.

Lev-Yadun S & Aloni R. 1993. Effect of wounding on the relations between vascular rays and vessels in *Melia azedarach* L. New phytol. 124: 339--344.

Ljung K, Bhalerao RP & Sandberg G. 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. Plant J. 28: 465--474.

Marcati CR, Angyalossy V & Evert RF. 2006. Seasonal variation in wood formation of *Cedrela fissilis* (Meliaceae). IAWA J. 27: 199--211.

Motta PEF, Curi IN & Franzmeier DP. 2002. Relation of soils and geomorphic surfaces in the Brazilian Cerrado. In: PS Oliveira & Marquis RJ (eds.), The cerrados of Brazil: 13--32. Columbia University Press, New York.

Olson ME, Anfodillo T, Rosell JA, Petit G, Crivellaro A, Isnard S, León-Gómez C, Alvarado-Cárdenas LO & Castorena M. 2014. Universal hydraulics of the flowering plants: vessel diameter scales with stem length across angiosperm lineages, habits and climates. Ecol. Lett. 17: 988--987.

Pirani FR, Sanchez M & Pedroni F. 2009. Fenologia de uma comunidade arbórea em cerrado sentido restrito, Barra do Garças, MR, Brasil. Acta Botanica Brasilica 23: 1096 – 1109.

Rao KS & Rajput KS. 1999. Seasonal behaviour of vascular cambium in teak (*Tectona grandis*) growing in moist deciduous and dry deciduous forests. IAWA J. 20: 85--93.

Roeser K R. 1972. Die nadel der schwarzkiefer massenprodukt und kunstwerk der Natur. Mikrokosmos 61: 33--36.

Romano CP, Hein MB & Klee HJ. 1991. Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. Genes dev. 5: 438--446.

Sachs T. 2000. Integrating cellular and organismic aspects of vascular differentiation. Plant Cell Physiol. 41: 649--656.

Sachs T & Cohen D. 1982. Circular vessels and the control of vascular differentiation in plants. Differentiation 21: 22--26.

Sass JE. 1951. Botanical microtechnique. The Iowa State College Press, Ames.

Sonsin JO, Gasson P, Machado SR, Caum C, Marcati CR. 2014. Atlas da diversidade de madeiras do cerrado paulista. FEPAF, Botucatu.

Sperry JS, Hacke UG & Pittermann J. 2006. Size and function in conifer tracheids and angiosperm vessels. American journal of botany 93: 1490–1500.

Uggla C, Moritz T, Sandberg G & Sundberg B. 1996. Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 9282--9286.

Wilson BF. 1968. Effect of girdling on cambial activity in white pine. Can. J. Bot. 46: 141--146.

Zimmermann MH. 1983. Xylem structure and the ascent of sap. Springer Verlag, Berlin.

Tabela 1: Altura e circunferência à altura do peito das árvores de *A. verticillata* estudadas.

Grupo de árvores	**Indivíduo**	**Altura (m)**	**Circunferência à altura do peito (cm)**
Grupo sem anelamento	01	3,70	16,00
	02	2,64	14,00
	03	2,30	13,50
	04	2,50	12,00
Grupo anelamento	01	3,04	16,00
	02	2,84	19,00
	03	2,57	13,50
	04	3,90	25,00
	05	4,00	19,80

Tabela 2: Valores do teste “t” pareado para o grupo sem anelamento.

Característica	**Tempo**		**Valor de p**
	Antes	Depois	
Diâmetro do lúmen do vaso (µm)	95,94	85,46	0,4917
Área do lúmen (µm)	7997,45	6633,05	0,544
Vasos por mm^2	14,45	15,82	0,6476

Tabela 3: valores médios das características de vaso do grupo anelamento. Antes= xilema secundário formado antes do anelamento. Depois= xilema secundário formado depois do anelamento.

Posição	Diâmetro de vaso (mμ)		Área do lúmen de vaso (mμ)		Densidade de vasos (vasos por mm^2)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
05 cm acima	91,79	66,00	7803,88	3386,59	18,13	54,36
02 cm acima	94,23	58,89	8058,32	2607,31	14,52	49,33
01 cm acima	88,38	52,97	6867,08	1801,59	13,41	62,08
01 cm abaixo	97,28	60,58	8250,95	3030,80	14,31	44,14

Tabela 4: Teste do efeito do anelamento nos parâmetros de vaso do xilema secundário. Valores destacados com asterisco mostram que as variáveis foram significativamente diferentes para a característica analisada.

Característica	Variáveis	Valor de F	Valor de p
Diâmetro de vaso	Posição no tronco	0.0225	0.8816
	Tempo (antes/depois do tratamento)	28.8588	< 0.0001 *
	Interação entre posição e tempo	0.4162	0.5234
Área do lúmen do vaso	Posição no tronco	0.4687	0.4985
	Tempo (antes/depois do tratamento)	43.8133	< 0.0001 *
	Interação entre posição e tempo	0.0259	0.8731
Vasos por mm^2	Posição no tronco	0.2477	0.6221
	Tempo (antes/depois do tratamento)	37.7088	< 0.0001 *
	Interação entre posição e tempo	0.0008	0.9777

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1. Aspectos anatômicos do xilema secundário em *Aegiphila verticillata* antes e após o tratamento nas porções situadas acima do anelamento.--A--B: 10 cm de distância do anelamento.--C--D: 05 cm.--E--F: 02 cm.--G--H: 01 cm. Note a região marcada no momento da instalação do experimento (setas largas), a delimitação entre o xilema secundário formado antes (X) e após (X') o tratamento e os vasos grandes do lenho (setas estreitas) formados no nível da marcação.-- Escala: A, C, E, G = 2 mm; B, D, F, H = 500 µm.

Figura 2. Aspectos anatômicos do xilema secundário em *Aegiphila verticillata* antes e após o tratamento nas porções situadas abaixo do anelamento.--A--B: 01 cm de distância do anelamento.--C--D: 02 cm.--E--F: 05 cm.--G--H: 10 cm. Note a região marcada no momento da instalação do experimento (setas largas), a delimitação entre o xilema secundário formado antes (X) após (X') o tratamento e os vasos grandes do lenho inicial (setas estreitas) no nível da marcação. Note a proporção estreita em A e a proporção larga em B.--Escala: A, C, E, G = 02 mm; B, D, F, H = 500 µm.

Figura 3. Precipitação mensal durante o período estudado.

Figura 4. Variação no diâmetro dos vasos entre o xilema formado antes e depois do tratamento.--Posição: -1=01cm abaixo do anelamento; 1=01cm acima do anelamento; 2=02cm acima; 5=05cm acima.

Figura 5. Variação na área do lúmen dos vasos entre o xilema formado antes e depois do tratamento.--Posição: -1=01cm abaixo do anelamento; 1=01cm acima do anelamento; 2=02cm acima; 5=05cm acima.

Figura 6. Variação no número de vasos por milímetro quadrado entre o xilema formado antes e depois do tratamento.--Posição: -1=01cm abaixo do anelamento; 1=01cm acima do anelamento; 2=02cm acima; 5=05cm acima.

Figura 1

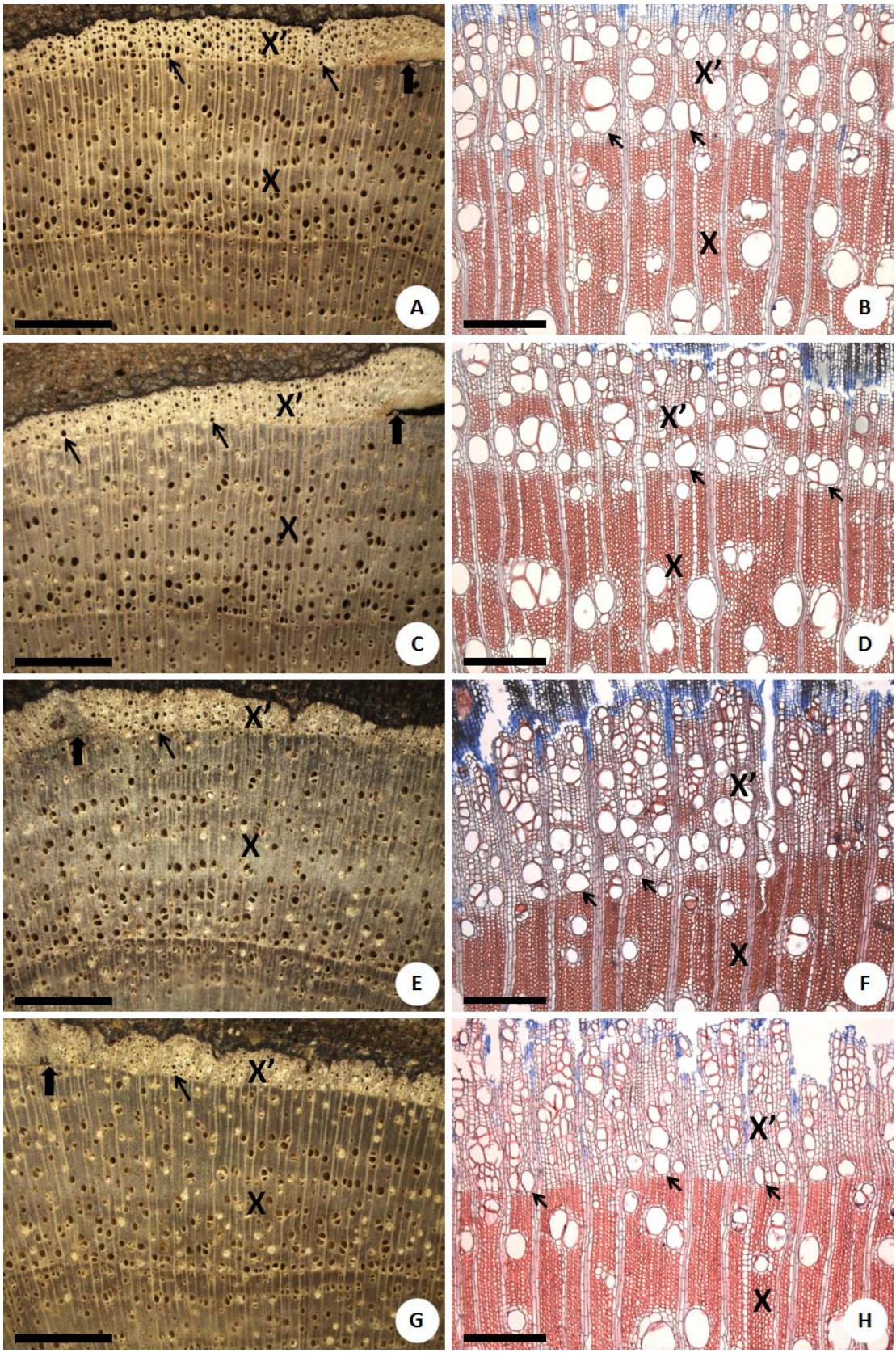


Figura 2

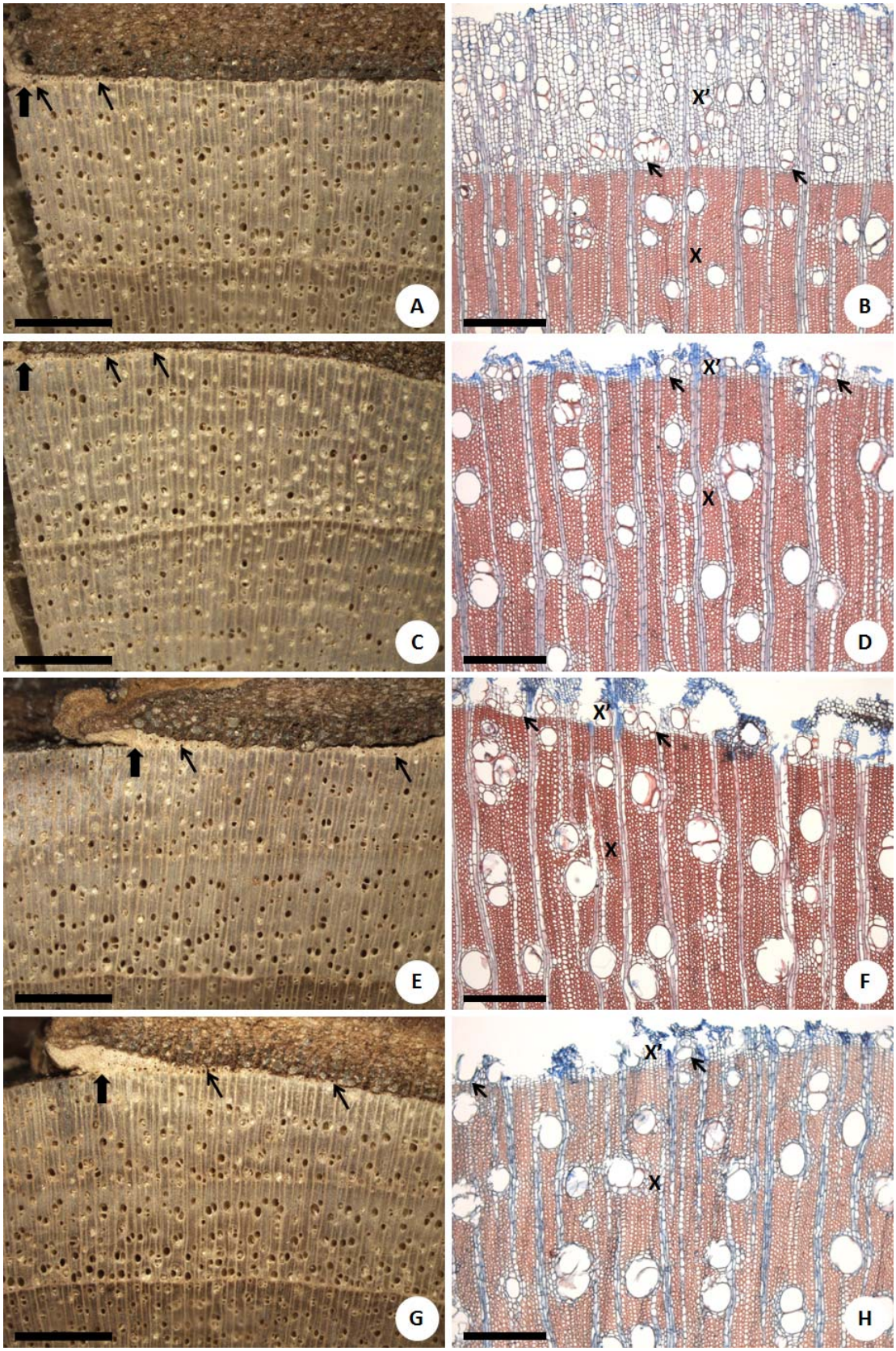


Figura 3

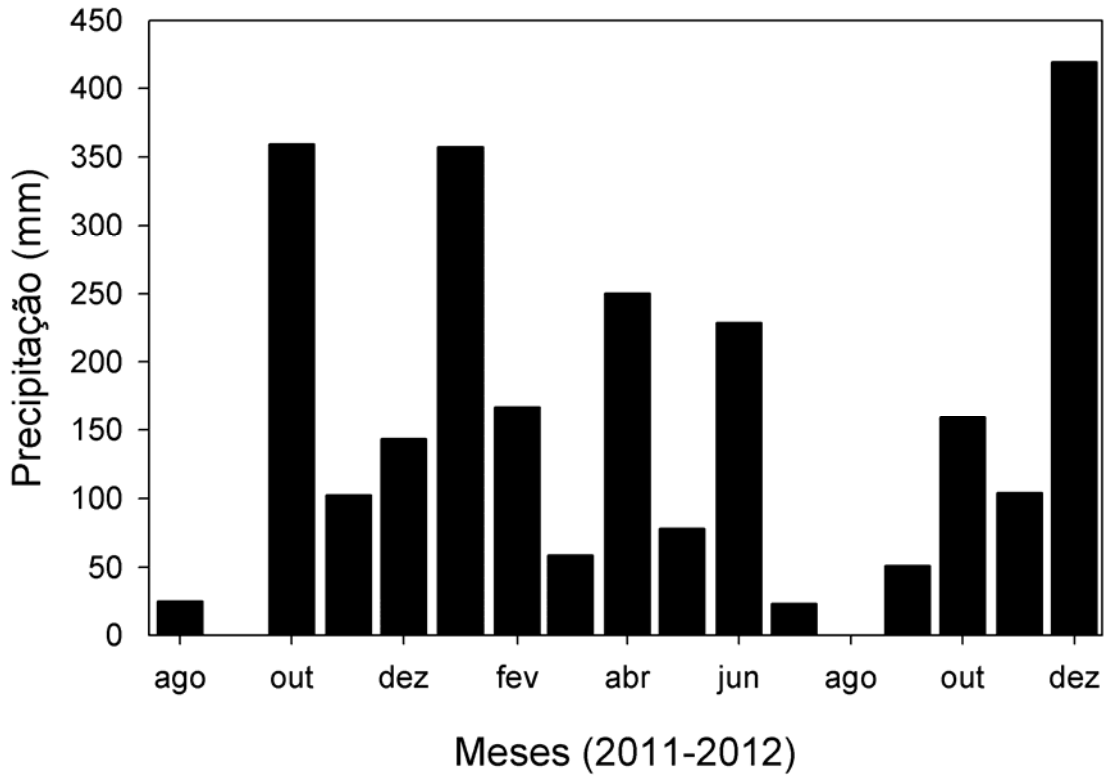

Precipitação (mm)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
ago
out
dez
fev
abr
jun
ago
out
dez
Meses (2011-2012)

Figura 4

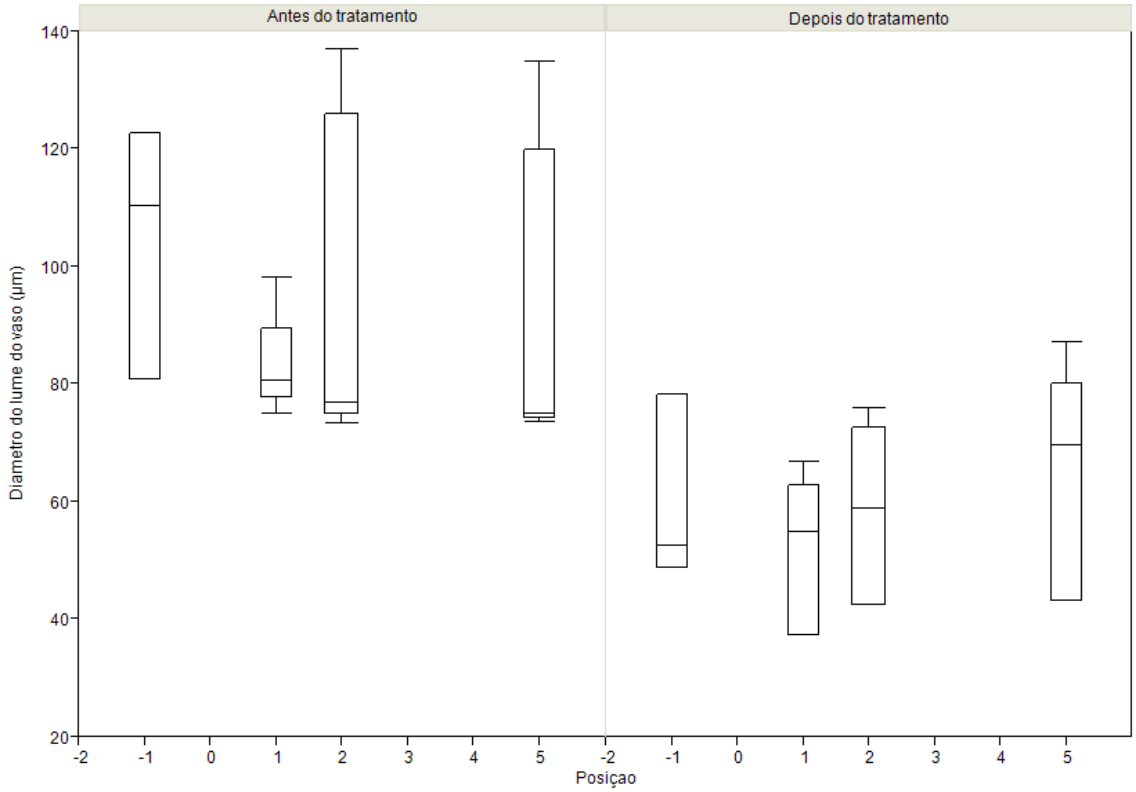

Antes do tratamento
Depois do tratamento
Diametro do lume do vaso (µm)
140
120
100
80
60
40
20
-2
-1
0
1
2
3
4
5
Posiçao

Figura 5

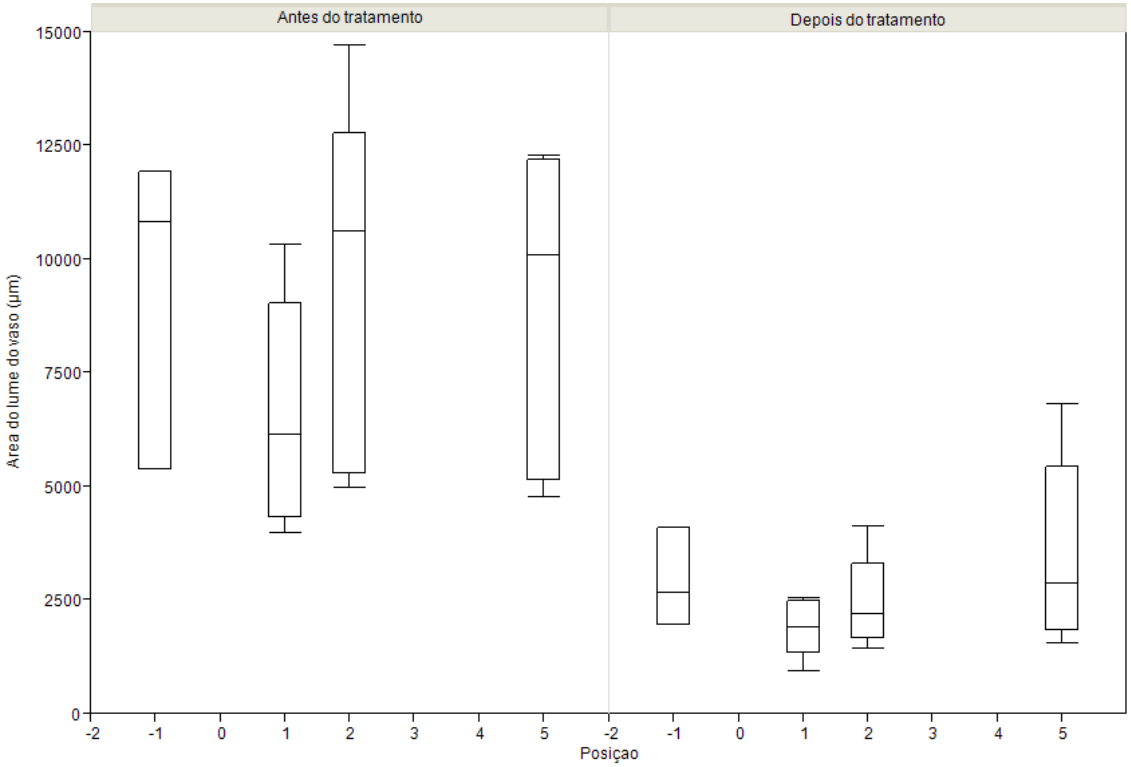
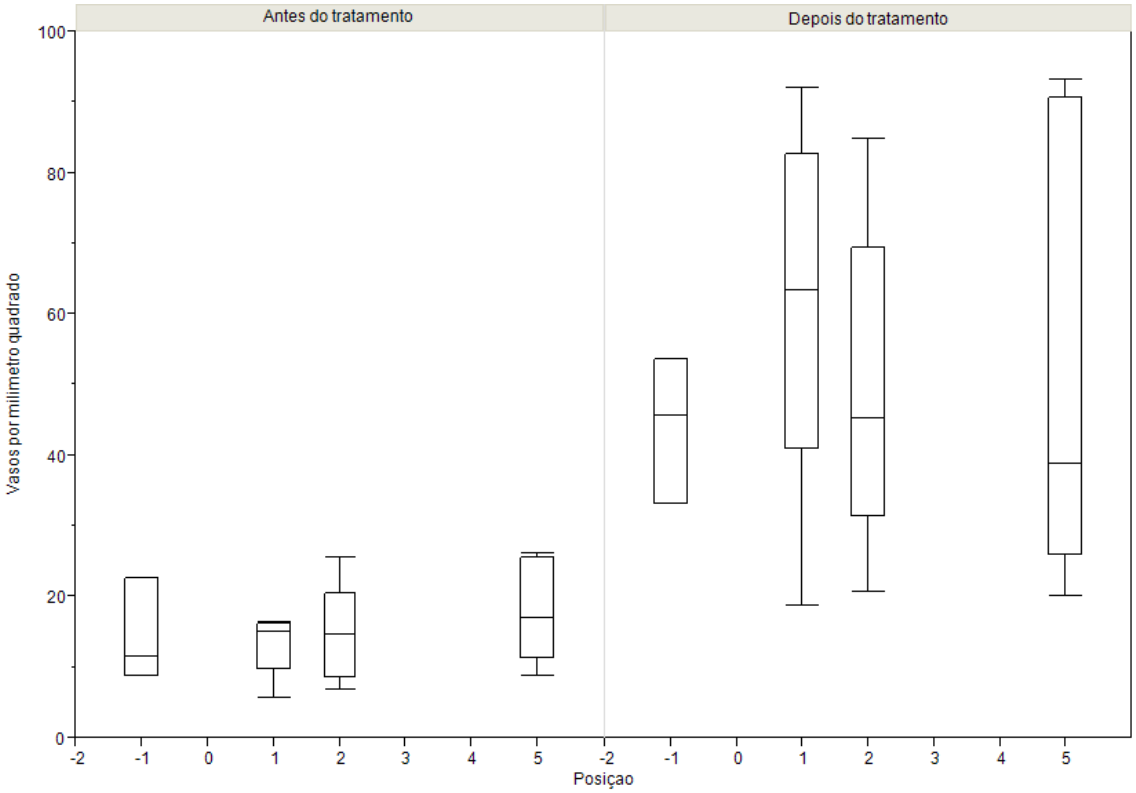

Antes do tratamento
Depois do tratamento
Area do lume do vaso (µm)
15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
-2
-1
0
1
2
3
4
5
Posiçao

Figura 6


Antes do tratamento
Depois do tratamento
Vasos por milimetro quadrado
100
80
60
40
20
0
-2
-1
0
1
2
3
4
5
Posiçao

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo abordou-se a sazonalidade da atividade cambial e da fenologia vegetativa de *Kielmeyera grandiflora*, a relação existente entre estes dois eventos e a relação destes com fatores climáticos e ambientais. Estudaram-se também os efeitos de anelamento caulinar na estrutura do xilema secundário de *Aegiphila verticillata*. As espécies escolhidas são típicas do Cerrado, um domínio fitogeográfico brasileiro.

A formação de folhas e a atividade cambial são eventos sazonais e anuais em *Kielmeyera grandiflora*. A brotação ocorreu durante o período seco, cerca de um a dois meses antes da reativação do câmbio vascular, que ocorreu no início da estação chuvosa. O câmbio vascular ficou ativo por sete meses. A diferenciação dos tecidos vasculares inicia-se com a reativação do câmbio vascular, e se prolonga por um a dois meses após o término da atividade cambial. O fotoperíodo e a temperatura são melhores sinalizadores para a brotação e para a atividade cambial quando comparados com a precipitação, devido a maior regularidade destes dois fatores ao longo do tempo.

O anelamento do caule principal levou à redução do diâmetro e da área do lúmen dos vasos, bem como ao aumento da densidade de vasos no xilema secundário formado acima do anelamento. Considerando que o anelamento causou a interrupção do fluxo de auxina produzida na copa, os resultados evidenciam que a auxina produzida durante a brotação e o desenvolvimento foliar tem papel importante na regulação da área do lúmen e da densidade de vasos no xilema secundário. Nas porções abaixo do anelamento houve produção irregular de xilema secundário, mostrando a importância da auxina produzida durante a brotação e o desenvolvimento foliar na formação do xilema secundário.

Os vasos de maior diâmetro do lenho inicial foram formados no início da estação chuvosa, concomitantemente com a brotação e com o desenvolvimento foliar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJMAL, S.; IQBAL, M. Annual rhythm of cambial activity in *Streblus asper*. **IAWA Bulletin** *n. s.*, v. 8, n. 3, p. 275-283, 1987.

ALJARO, M. E.; AVILA, G.; HOFFMANN, A.; KUMMEROW, J. The Annual rhythm of cambial activity in two Woody species of the chilean "Matorral". **American Journal of Botany**, v. 59, n. 9, p. 879-885, 1972.

ALONI, R. Differentiation of vascular tissues. **Annual review plant physiology**, v. 38, p. 179-204, 1987.

ALONI, R. The induction of vascular tissue by auxin. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction**. Dordrecht, Boston: Kluwer Academic Publishers, p. 485-506, 2010.

ALONI, R. The role of hormones in controlling vascular differentiation. In: J. FROMM (Ed.). **Cellular Aspects of Wood Formation**. Berlin Heidelberg: Springer, v. 20, p. 99-139, 2013.

ALONI, R. Ecophysiological implications of vascular differentiation and plant evolution. **Trees**, p. 1-16, 2014.

ALONI, R.; SCHWALM, K.; LANGHANS, M.; ULLRICH, C. I. Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in Arabidopsis. **Planta**, V. 216, P. 841–853, 2003.

ALONI, R.; ZIMMERMMAN, M. H. The control of vessel size and density along the plant axis: a new hypothesis. **Differentiation**, v. 24, p. 203-208, 1983.

ANFODILLO, T.; CARRARO, V.; CARRER, M.; FIOR, C.; ROSSI, S. Convergent tapering of xylem conduits in different woody species. **New Phytologist**, v. 169, p. 279-290, 2006.

ANFODILLO, T.; PETIT, G.; CRIVELLARO, A. Axial conduit widening in woody species: a still neglected anatomical pattern. **IAWA Journal**, v. 34, n. 4, p. 352-364, 2013.

BAAS, P.; WERKER, E.; FAHN, A. Some ecological trends in vessel characters. **IAWA bulletin n. s.**, v. 4, n. 2-3, p. 141-159, 1983.

BABA, K.; KARLBERG, A.; SCHMIDT, J.; SCHRADER, J.; HVIDSTEN, T. R.; BAKO, L.; BHALERAO, R. P. Activity–dormancy transition in the cambial meristem involves stage-

specific modulation of auxin response in hybrid aspen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 8, p. 3418-3423, 2011.

BEGUN, S.; NAKABA, S.; ORIBE, Y; KUBO, T.; FUNADA, R. Cambial sensitivity to rising temperatures by natural condition and artificial heating from late winter to early spring in the evergreen conifer *Cryptomeria japonica*. **Trees**, v. 24, n. 1, p. 43-52, 2010.

BENNET, H. S. Science and art preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol metacrilate, glass knives and simple stains. **Stain Technol**, v. 55, p. 71-97, 1976.

BERLETH, T.; MATTSON, J.; HARDTKE, S. Vascular continuity and auxins signals. **Trends in plant science**, v. 5, p. 387-393, 2000.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemstry**. Ames: The Iowa State University Press, 1976.

BORCHERT, R. Climatic periodicity, phenology, and cambial activity in tropical dry forest trees. **IAWA Journal**, v. 20, n. 3, p. 239-247, 1999.

BORCHERT, R. Organismic and environmental controls of bud growth in tropical trees. In: VÍEMONT, J. D.; CRABBÉ, J. (Ed.). **Dormancy in plants: from whole plant behavior to cellular control**. Wallingford: CAB International, p. 87-107, 2000.

BORCHERT, R.; RIVERA, G. Photoperiodic control of seasonal development and dormancy in tropical stem-succulent trees. **Tree Physiology**, v. 21, p. 213-221, 2001.

BRIDGEWATER, S. RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F. Biogeographic patterns, b-diversity and dominance in the cerrado biome of Brazil. **Biodiversity and conservation**, v. 13, p. 2295–2318, 2004.

BUKATSCH, F. Bemerkungen zur doppelfärbung astrablau-safranin. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 8, p. 33-36, 1972.

CADDAH, M. K.; MAYER, J. L. S.; BITTRICH. V.; AMARAL, M. C. E. Species limits in the *Kielmeyera coriacea* complex (Calophyllaceae) – a multidisciplinary approach. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.168, p.101–115, 2012.

CAFFARRA, A.; DONNELLY, A. The ecological significance of phenology in four different tree species: effects of light and temperature on bud burst. **International journal of biometeorology**, v. 55, n. 5, p. 711-721, 2011.

CLARKE, A.; GASTON, K. J. Climate, energy and diversity. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 273, n. 1599, p. 2257-2266, 2006.

CORADIN, V. T. R. **Formação de anéis de crescimento e sazonalidade da atividade cambial de dez espécies lenhosas do cerrado**. 2000. 131 f. Tese (Doutorado em Ecologia), Universidade de Brasília, Brasília, 2000.

COSTA, M. S.; VASCONCELLOS, T. J.; BARROS, C. F.; CALLADO, C. H. Does growth rhythm of a widespread species change in distinct growth sites? **IAWA Journal**, v. 34, n. 4, p. 498-509, 2013.

COUTINHO, L.M. O conceito de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 1, p. 17-24, 1978.

COUTINHO, L. M. O bioma do cerrado. In: KLEIN, A. L. (Org.). **Eugen Warming e o cerrado brasileiro**. São Paulo: UNESP; Imprensa Oficial do Estado, p. 77-92, 2002.

COUTINHO, L. M. O conceito de bioma. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 13-23, 2006.

CUNHA, A. R.; MARTINS, D. Classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manoel, SP. **Irriga**, v. 14, p. 1-11, 2009.

DAVE, Y. S.; RAO, K. S. Cambial activity in *Mangifera indica* L. Acta botanica academiae scientiarum . hungaricae, v. 28, n. 1-2, p. 73-79, 1982 a.

DAVE, Y. S.; RAO, K. S. Seasonal activity of the vascular cambium in *Gmelina arborea* Roxb. **IAWA Bulletin** *n. s.* v. 3, n. 1, p. 59-65. 1982 b.

DAVIES, P. J. Bound auxin formation in growing stems**. Plant Physiology**, v.57, p. 197-202, 1976.

DESLAURIERS, A.; ROSSI, S.; ANFODILLO, T.; SARACINO, A. Cambial phenology, wood formation and temperature thresholds in two contrasting years at high altitude in southern Italy. **Tree Physiology**, v. 28, p. 863–871 2008.

DESLAURIERS, A.; BEAULIEU, M.; BALDUCCI, L.; GIOVANELLI, A.; GANON, M.; ROSSI, S. Impact of warming and drought on carbon balance related to wood formation in black spruce. **Annals of botany**, v. 114, n. 2, p. 335-345, 2014.

DESHPANDE, B. P; RAJENDRABABU, J. Seasonal changes in the structure of the secondary phloem of Grewia tiliaefolia, a deciduous tree from India. **Annals of botany**, v. 56, n. 1, p. 61-72, 1985.

DIÉ, A.; KITIN, P. KOUAMÉ, F. NG.; BULCKE, J. V. VAN ACKERT, J.; BEECKMAN, H. Fluctuations of cambial activity in relation to precipitation result in annual rings and intra-annual growth zones of xylem and phloem in teak (*Tectona grandis*) in Ivory Coast. **Annals of Botany**, v. 110, p. 861–873, 2012.

DURIGAN, G.; SIQUEIRA, M. F.; FRANCO, G. A. D. C.; CONTIERI, W. A. A flora arbustivo-arbórea do Médio Paranapanema: base para a restauração dos ecossistemas naturais. In: VILAS-BOAS, O.; DURIGAN, G. (Org.). **Pesquisas em conservação e recuperação ambiental no Oeste Paulista: resultados da cooperação Brasil/Japão**. São Paulo: Páginas & Letras, p. 199-239, 2004.

EITEN, G. The cerrado vegetation of Brazil. **The Botanical Review**, v. 38, n. 2, p. 201-341, 1972.

EVERT, R. F. The cambium and seasonal development of the phloem in *Pyrus malus*. **American Journal of Botany**, v. 50, n. 2, p. 149-159, 1963.

EVERT, R. F. **Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development**, 3 edition. New Jersey: John Wiley & Sons INC., 2006, 601 p.

EVERT, R. F.; KOZLOWSKI, T. T.; DAVIS, J. D. Influence of phloem blockage on cambial growth of sugar maple. Influence of phloem blockage on cambial growth of sugar maple. **American Journal of Botany**, v.59, n. 6, p. 632-641, 1972.

FARRAR, J. J.; EVERT, R. F. Ultrastructure of cell division in the fusiform cells of the vascular cambium of *Robina pseudoacacia*. **Trees**, v. 11, p. 203-215, 1997.

FILGUEIRAS, T. S. Herbaceous plant communities. In: OLIVEIRA, P. S. MARQUIS, R. J. (Org.). **The cerrados of Brazil**. New York: Columbia University Press, p. 121-139, 2002.

FOURNIER, L. A. Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas em árboles. **Turrialba**, v. 24, n. 4, p. 422-423, outubro-dezembro de 1974.

FRANCO, A. C.; BUSTAMANTE, M.; CALDAS, L. S.; GOLDSTEIN, G.; MEINZER, F. C.; KOZOVITS, A. R.; RUNDEL, P.; CORADIN, V. T. R. Leaf functional traits of

Neotropical savanna trees in relation to seasonal water deficit. **Trees**, v. 19, n. 3, p. 326-335, 2005.

FRANKENSTEIN, C.; ECKSTEIN, D.; SCHMITT, U. The onset of cambium activity–a matter of agreement? **Dendrochronologia**, v. 23, n. 1, p. 57-62, 2005.

FUKUDA, H. Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. **Annual review of plant biology**, v. 47, n. 1, p. 299-325, 1996.

FUKUDA, H. Tracheary element differentiation. **The plant cell**, v. 38, p. 1147-1156, 1997.

GERSANI, M.; SACHS, T. Polarity reorientation in beans expressed by vascular differentiation and polar auxin transport. **Differentiation**, v. 25: p. 205-208, 1984.

GHOUSE, A. K. M.; HASHMI, S. Periodicity of cambium and the formation of xylem and phloem in *Mimusops elengi* L., an evergreen member of tropical India. **Flora**, v. 173, p. 479-487, 1983.

GRIČAR, J.; ČUFAR, K.; OVEN, P.; SCHMITT, U. Differentiation of terminal latewood tracheids in silver fir trees during autumn. **Annals of Botany**, v. 95, n. 6, p. 959-965, 2005.

GRIČAR, J.; ZUPANČIČ, M.; ČUFAR, K.; KOCH, G.; SCHMITT, U. W. E.; OVEN, P. Effect of local heating and cooling on cambial activity and cell differentiation in the stem of Norway spruce (*Picea abies*). **Annals of Botany**, v. 97, n. 6, p. 943-951, 2006.

JACKSON, P. C.; MEINZER, F. C.; BUSTAMANTE, M.; GOLDSTEIN, G.; FRANCO, A.; RUNDEL, P. W.; CALDAS, L.; IGLER, E.; CAUSIN, F. Partitioning of soil water among tree species in a Brazilian Cerrado ecosystem. **Tree physiology**, v. 19, n. 11, p. 717-724, 1999.

JACOBS, W. P. The role of auxin in differentiation of xylem around a wound. **American Journal of Botany**, v. 39, n. 5, p. 301-309, 1952.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-hill, 1940.

KLEE, H.J.; HORSCH, R. B.; HINCHEE, M. A.; HEIN, M. B.; HOFFMANN, N. L. The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants. **Genes & development**, v. 1, p. 86-96, 1987.

KOZLOWSKI, T. T.; KRAMER, P. J.; PALLARDY, S. G. **The physiological ecology of woody plants**. San Diego: Academmic Press, 1991.

KREPKOWSKI, J.; BRÄUNING, A., GEBREKIRSTOS, A.; STROBL, S. Cambial growth dynamics and climatic control of different tree life forms in tropical mountain forest in Ethiopia. **Trees**, v. 25, n. 1, p. 59–70, 2011.

LACHAUD, S; CATESSON, A. M.; BONNEMAIN, J. L. Structure and functions of the vascular cambium. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Series III-Sciences de la Vie**, v. 322, n. 8, p. 633-650, 1999.

LARSON, P. R. Wood formation and the concept of wood quality. **Yale University School Forestry**, v. 74, p. 1-54, 1969.

LEV-YADUN, S.; ALONI, R. Effect of wounding on the relations between vascular rays and vessels in Melia azedarach L. **New phytologist**, v. 124, n. 2, p. 339-344, 1993.

LI, W. F.; DING, Q.; CUI, K. M.; HE, X. Q. Cambium reactivation independent of bud unfolding involves de novo IAA biosynthesis in cambium regions in *Populus tomentosa* Carr. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 6, p. 1827-1836, 2013.

LISI, C. S.; TOMAZELO Fo, M.; BOTOSSO, P. C.; ROIG, F. A. MARIA, V. R. B.; FERREIRA-FEDELE, L.; VOIGT, A. R. A. Tree ring formation, radial increment periodicity, and phenology of tree species from a seasonal semi-deciduous forest in southeast Brazil. **IAWA Journal**, v. 29, n. 2, p. 189–207, 2008.

LJUNG, K.; BHALERAO, R. P.; SANDBERG, G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. **The Plant Journal**, v. 28, n. 4, p. 465-474, 2001.

LU, C. Y.; CHIANG, S. H. T. Seasonal activity of the cambium in the young branch of *Liquidambar formosana* Hance. **Taiwania**, v. 20, n. 1, p. 32-47, 1975.

MARCATI, C. R.; ANGYALOSSY, V.; EVERT, R. F. Seasonal variation in wood formation of *Cedrela fissilis* (Meliaceae). **IAWA Journal**, v. 27, n. 2, p. 199-211, 2006 a.

MARCATI, C. R.; OLIVEIRA, J. S.; MACHADO, S. R. Growth rings in Cerrado woody species: occurrence and anatomical markers). **Biota Neotropica**, v. 6, n. 3, 2006b. Disponível em: < http://www.biotaneotropica.org.br/v61n3/pt/abstract?article+bn00206032006>. Acesso em 01 jun. 2011.

MARCATI, C. R; MILANEZ, C. R. D.; MACHADO, S. R. Seasonal development of secondary xylem and phloem in *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Leguminosae: Caesalpinoideae). **Trees**, v. 22, n. 1, p. 3-12, 2008.

MARCATI, C. R. **Atividade cambial em espécies de cerrado**. 2014. 132 f. Tese (Livre Doccente), Universidade Estadual Paulista, 2014.

MENDONÇA, F.; DANNI-OLIVEIRA, I. M. **Climatologia: noções básicas e climas do Brasil**. São Paulo: Oficina de Textos, 2007, 206p.

MIRANDA, H. S.; BUSTAMANTE, M. M.; MIRANDA, A. C. The fire fator. In: OLIVEIRA, P. S. MARQUIS, R. J. (Org.) **The cerrados of Brazil**. New York: Columbia University Press, p. 51-68, 2002.

MIRANDA, H. S.; SATO, M. N. Efeitos do fogo na vegetação do cerrado. In: SILVA, S. A. S; MARIA, J. C. F. J. **Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 94-105, 2005.

MORELLATO, L. P. C.; RODRIGUES, R. R.; LEITÃO FILJO, H. F.; JOLY, C. A. Estudo comparativo de espécies arbóreas de floresta de altitude e floresta mesófila semidecídua na Serra do Japi, Jundiaí, São Paulo. **Revista brasileira de botânica**, v. 12, p. 85-98, 1989.

MOTTA, P. E. F.; CURI, I., N.; FRANZMEIER, D P. Relation of soils and geomorphic surfaces in the Brazilian Cerrado. In: Oliveira, P. S. Marquis, R. J. (Org.). **The cerrados of Brazil**. New York: Columbia University Press, p.13-32, 2002.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENTS, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

O'BRIEN, T. P.; McCULLY, M. E. The study of plant structure: principles and selected methods. **Termarcrphy** *PTY*, Melbourne, 1981.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; RATTER, J. A. Vegetation physiognomies and woody flora of the cerrado biome. In: OLIVEIRA, P. S. MARQUIS, R. J. (Org.). **The cerrados of Brazil**. New York: Columbia University Press, p. 91-120, 2002.

OLSON, M. E.; ANFODILLO, T.; ROSELL, J. A.; PETIT, G.; CRIVELLARO, A.; ISNARD, S.; LEÓN-GÓMEZ, C.; ALVARADO-CÁRDENAS, L. O; CASTORENA, M. Universal hydraulics of the flowering plants: vessel diameter scales with stem length across angiosperm lineages, habits and climates. **Ecology letters**, v. 17, n. 8, p. 988-987, 2014.

PIRANI, F. R.; SANCHEZ, M.; PEDRONI, F. Fenologia de uma comunidade arbórea em cerrado sentido restrito, Barra do Garças, MR, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 4, p. 1096 – 1109, 2009.

RAJPUT, K. S.; RAO, K. S. Cambial activity and development of wood in *Acacia nilotica* (L.) Del. growing in different forests of Gujarat State. **Flora**, v. 195, p. 165-171, 2000.

RAJPUT, K. S.; RAO, K. S. Cambial activity and development of xylem in *Tamarindus indica* L. growing in different forests of Gujarat State. **Acta Botanica Hungarica**, v. 43, n. 3-4, p. 379-390, 2001a.

RAJPUT, K. S.; RAO, K. S. Cambial anatomy and annual rhythm of secondary xylem development in the twigs of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) growing in different forests of Gujarat state. **Journal of Sustainable Forestry**, v. 14, n. 2-3, p. 115-127, 2001b.

RAO, K. S.; RAJPUT, K. S. Seasonal behaviour of vascular cambium in teak (*Tectonia grandis*) growing in moist deciduous and dry deciduous forests. **IAWA Journal**, v. 20, n. 1, p. 85-93, 1999.

RAO, K. S.; RAJPUT, K. S. Relation between seasonal cambial activity, development of xylem and phenology in *Azadirachta indica* growing in different forests of Gujarart State. **Annals of Forest Sciences**, v. 58, n. 6, p. 691-698, 2001.

REATTO, A.; CORREIA, J. R.; SPERA, S. T.; MARTINS, E. S. Solos do bioma Cerrado: aspectos pedológicos. In: Sano, S. M.; Almeida, S. P. de; Ribeiro, J. F. (Org.). **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, v. 1, p. 107-149, 2008.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do bioma cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de; RIBEIRO, J. F. (Org.) **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, v. 1, p. 151-212, 2008.

RIVERA, G.; ELLIOTT, S.; CALDAS, L. S.; NICOLOSSI, G.; CORADIN, V. T.; BORCHERT, R. Increasing day-length induces spring flushing of tropical dry forest trees in the abscence of rain. **Trees**, v. 16, n. 7, p. 445-456, 2002.

ROESER, K. R. Die nadel der schwarzkiefer massenprodukt und kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos,** v. 61, n. 8, p. 33-36, 1972.

ROMANO, C. P; HEIN, M. B; KLEE, H. J. inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. **Genes & development**, v. 5, n. 3, p 438-446, 1991.

ROSSI, S.; DESLAURIERS, A.; ANFODILLO, T.; MORIN, H.; SARACINO, A.; MOTTA, R.; BORGHETTI, M. Conifers in cold environments synchronize maximum growth rate of tree-ring formation with day length. **New phytologist**, v. 170, n. 2, p. 301-310, 2006.

ROSSI, S.; RATHGEBER, C. B.; DESLAURIERS, A. Comparing needle and shoot phenology with xylem development on three conifer species in Italy. **Annals of Forest Science**, v. 66, n. 2, p. 1-8, 2009.

SACHS, T. Integrating cellular and organismic aspects of vascular differentiation. **Plant and Cell Physiology**, v. 41, n. 6, p. 649-656, 2000.

SACHS, T.; COHEN, D. Circular vessels and the control of vascular differentiation in plants. **Differentiation**, v. 21, n. 1-3, p. 22-26, 1982.

SANTOS, M. F.; SERAFIN, H.; SANO, P. T. Fisionomia e composição da vegetação florestal na Serra do Cipó, MG, Brasil. **Acta botanica brasilica**, v. 25, n. 4, p. 793-814, 2011.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. Ames: The Iowa State College Press, 1951.

SCARPELLA, E.; HELARIUTTA, Y. Vascular pattern formation in plant. **Current topics in developmental biology**, v. 91, p. 221-265, 2010.

SILVA, F. A. M. da; ASSAD, E. D.; EVANGELISTA, B. A. Caracterização climática do bioma Cerrado. In: Sano, S. M.; Almeida, S. P. de; Ribeiro, J. F. (Org.). **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, v. 1, p. 69-88, 2008.

SMITH, H. Phytochromes and light signal perception by plants—an emerging synthesis. **Nature**, v. 407, n. 6804, p. 585-591, 2000.

SONSIN, J. O.; GASSON, P.; MACHARO, S. R.; CAUM, C.; MARCATI, C. R. **Atlas da diversidade de madeiras do cerrado paulista**. Botucatu: FEPAF, 2014, 423p.

SPERRY, J. S.; HACKE, U. G.; PITTERMANN, J. Size and function in conifer tracheids and angiosperm vessels. **American journal of botany**, v. 93, n. 10, p. 1490–1500, 2006.

SUZUKI, M.; YODA, K.; SUZUKI, H. Phenological comparison of the onset of vessel formation between ring-porous and diffuse-porous deciduous trees in a Japanese temperate forest. **Iawa Journal**, v. 17, p. 431-444, 1996.

TIME AND DATE. **Time and Date**. http://www.timeanddate.com/sun/brazil/sao-paulo, acessado em 24 de março de 2014.

TROUET, V.; MUKELABAI, M.; VERHEYDEN, A.; BEECKMAN, H. Cambial growth season of brevi-deciduous *Brachystegia spiciformis* trees from South Central Africa restricted to less than four months. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, e47364, 2012.

UGGLA, C.; MORITZ, T.; SANDBERG, G.; SUNDBERG, B.) Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. **Proc Natl Acad Sci**, V. 93, P. 9282–9286, 1996.

VENUGOPAL, N.; KRISHNAMURTHY, K.V., Seasonal production of secondary xylem in the twigs of certain tropical trees. **IAWA Bulletin** n.s., v. 8, n. 1, p. 31-40, 1987.

VENUGOPAL, N.; LIANGKUWANG, M. G. Cambial activity and annual rhythm of xylem production of elephant apple tree (*Dillenia indica* Linn.) in relation to phenology and climatic factor growing in sub-tropical wet forest of northeast India. **Trees**, v. 21, p. 101–110, 2007.

VETTER, R. E.; BOTOSSO, P. C. Remarks on age and growth rate determination of amazonian trees. **IAWA Bulletin** n.s., v 10, n. 2, p. 133-145, 1989.

WANG, K. H.; NOBUCHI, T.; ABDUL AZIM, A. A.; SAHRI, M. H. Seasonal variations in cambial anatomy of plantation-grown Azadirachta excels. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 25, n. 1, p. 111-117, 2013.

WESOŁOWSKI, T.; ROWIŃSKI, P. Timing of bud burst and tree-leaf development in a multispecies temperate forest. **Forest Ecology and Management**, v. 237, n. 1, p. 387-393, 2006.

WILSON, B. F. Effect of girdling on cambial activity in white pine. **Canadian Journal of Botany**, v. 46, n. 2, p. 141-146, 1968.

WORBES, M., How to measure growth dynamics in tropical trees a review. **IAWA Journal**, v 16, n. 4, p. 337-351, 1995.

YÁÑEZ-ESPINOSA, L.; TERRAZAS, T.; LÓPEZ-MATA, L. Integrated analysis of tropical trees growth: a multivariate approach. **Annals of Botany**, v. 98, p. 637 – 645, 2006.

ZIMMERMANN, M. H. **Xylem structure and the ascent of sap**. Berlin: Springer – Verlag, 1983.