
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E BIODIVERSIDADE

**RESPOSTAS ECOFISIOLÓGICAS DE PLANTAS ARBÓREAS DO
CERRADO À GEADA**

ARIADNE CRISTINA DE ANTONIO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Biodiversidade.

Março – 2019

ARIADNE CRISTINA DE ANTONIO

**RESPOSTAS ECOFISIOLÓGICAS DE PLANTAS ARBÓREAS DO
CERRADO À GEADA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências
do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Ecologia e Biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr Davi Rodrigo Rossatto

Rio Claro
Março 2019

A635r

Antonio, Ariadne Cristina De

Respostas ecofisiológicas de plantas arbóreas do cerrado à geada / Ariadne Cristina De Antonio. -- Rio Claro, 2019

90 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Davi Rodrigo Rossatto

1. Savanas brasileiras. 2. Geada. 3. Atributos morfo-fisiológicos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Respostas ecofisiológicas de plantas arbóreas do cerrado à geada

AUTORA: ARIADNE CRISTINA DE ANTONIO

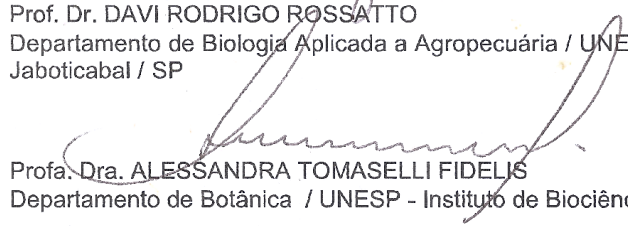
ORIENTADOR: DAVI RODRIGO ROSSATTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ECOLOGIA E BIODIVERSIDADE, área: Biodiversidade pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. DAVI RODRIGO ROSSATTO

Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária / UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Jaboticabal / SP



Profa. Dra. ALESSANDRA TOMASELLI FIDELIS

Departamento de Botânica / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Profa. Dra. MARINA CORREA SCALON

Post Doctoral Researcher - Environmental Change Institute, School of Geography and the Environment / University of Oxford

Rio Claro, 25 de março de 2019

Dedicatória

Dedico aos meus pais Meire e Edson...

“É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo do mais importante: Nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível. A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”

Chico Xavier

Sumário

Agradecimentos.....	i
Resumo geral.....	1
Abstract.....	3
Introdução geral.....	6
Objetivos gerais.....	12
Referências.....	14
Capítulo I.....	19
Estratégias morfológicas de proteção e respostas de rebrota em espécies arbóreas do cerrado após ocorrência de geada	
Introdução	20
Materiais e métodos.....	23
<i>Área de estudo.....</i>	<i>23</i>
<i>Seleção de espécies.....</i>	<i>24</i>
<i>Características de proteção de gemas e espessura casca.....</i>	<i>25</i>
<i>Respostas de rebrota após a ocorrência de geada.....</i>	<i>26</i>
<i>Análises estatísticas.....</i>	<i>27</i>
Resultados	27
<i>Grau de proteção das gemas e espessura da casca.....</i>	<i>27</i>
<i>Estratégias de rebrota das espécies após ocorrência da geada.....</i>	<i>29</i>
Discussão.....	32
<i>Proteção de gemas e espessura de casca.....</i>	<i>32</i>
<i>Respostas de rebrota.....</i>	<i>34</i>
<i>Implicações para a dinâmica da vegetação.....</i>	<i>35</i>
Conclusão.....	37
Referências.....	37

Material Suplementar	44
Capítulo II	45
Características morfo-fisiológicas foliares em espécies arbóreas do cerrado afetadas e não afetadas por baixas temperaturas	
Introdução	46
Materiais e métodos	49
<i>Área de estudo</i>	49
<i>Seleção de espécies</i>	49
<i>Atributos morfológicos foliares</i>	50
<i>Atributos fisiológicos foliares</i>	51
<i>Análises estatísticas</i>	53
Resultados	54
<i>Atributos morfológicos</i>	54
<i>Respostas fisiológicas</i>	54
<i>Padrões funcionais de espécies afetadas e não afetadas</i>	56
Discussão	57
<i>Diferenças entre os atributos morfológicos</i>	57
<i>Respostas fisiológicas a baixas temperaturas</i>	58
<i>Separação funcional entre espécies afetadas e não afetadas</i>	60
Conclusão	61
Referências	61
Material Suplementar	65
Capítulo III	66
Are fire protection strategies important under lower temperatures? An analysis of bud protection and bark properties in Neotropical savanna trees	
Summary	67

Introduction	68
Materials and Methods	71
<i>Study site</i>	71
<i>Species selection</i>	72
<i>Describing bud protection and branch bark properties</i>	72
<i>Exposing branches to low temperatures</i>	73
<i>Statistical analysis</i>	73
Results	74
<i>Bud protection</i>	74
<i>Bark properties</i>	74
<i>Bark properties and temperature variation</i>	76
Discussion	77
<i>Degree of bud protection and bark properties</i>	77
<i>Bark properties and low temperatures</i>	78
References	80
Supplementary data	85
Conclusão geral	90

Agradecimentos

Diferente de grande parte da sociedade em que vivemos, sou extremamente privilegiada. Por isso agradeço a cada um que me ajudou e ajuda a construir o meu caminho. Hoje posso reescrever estes agradecimentos com uma sensação de gratidão muito maior....

Antes eu havia agradecido aos meus pais por tudo o que fizeram por mim, hoje também agradeço pelo simples fato de existirem. Sempre soube da importância de vocês na minha vida, nesta última semana aprendi que meu amor por vocês nem sequer pode ser mensurado. Mãe (Meire) obrigada por estar aqui, por sua força e por não desistir, cuidaria de você por quanto tempo fosse necessário, mas não vejo a hora de te ver gritando comigo por ter deixado o chinelo no caminho. Pai (Edson) obrigada por ser a rocha da nossa família, por não nos deixar afundar e por sempre ser aquele que nos levanta. Em poucos dias aprendemos a viver um dia de cada vez e a comemorar cada pequena conquista. Amo vocês!

Minha família, cada um de vocês é uma parte de mim, como sou grata por tê-los em minha vida. Meus tios, Neno, Marisa, Isméria, Júnior e Dani, vocês também fazem parte das minhas conquistas. E posso dizer que sem vocês passar por tudo isso teria sido impossível. Como sou grata pela família que tenho. Só posso dizer: obrigada, obrigada, obrigada! Meus primos, Yohan, Beatriz, Maria Clara e Mariane vocês são meus amores e muito mais do que primos, são meus irmãos, estarei sempre por perto para cuidar de vocês. Meu avô (Honório), obrigada por ser o melhor avô que eu poderia ter. Meus avós, Janete, Leonice e Wilson que já não fazem mais parte deste plano, sei que olham por mim!

Á você Rogério, obrigada! Nestes anos crescemos juntos e você foi minha força para seguir em frente. Obrigada por acreditar mais em mim do que eu mesma e por ser meu companheiro de vida. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis e por me apoiar quando tudo parecia estar desmoronando. Eu te amo.

Ao Davi, agradeço por aceitar uma estranha como orientada. Obrigada por realmente ser um orientador, pelas viagens e por tudo que me ensinou nestes dois anos. E mais do que isso, obrigada por entender o momento que estou passando. Sou grata por tudo!

Aos meus amigos, os de infância, adolescência e juventude. Aos que passaram e aos que permanecem, meu muito obrigada! Vocês fizeram meu caminho mais feliz. Raquelis obrigada pelas estadias, risadas e parceria durante todos esses anos. Brubs obrigada pela ajuda em campo, pelos almoços e por toda força. Vocês duas são amigas que levarei para vida toda e mesmo distante cuidaram de mim. Aislan e Giovanna, mesmo de longe são os melhores, quantas risadas de doer a barriga! Obrigada, vocês me levam de volta ao tempo em que a vida era mais leve. Laís, minha primeira melhor amiga, obrigada pela preocupação e por estar ao meu lado.

Agradeço ao Bruno (Sushi) pelas coletas, risadas e por toda ajuda. Bianca (Tutu), futura mestre, obrigada pela ajuda e parceria nas coletas, Davi vai ter que te aturar agora! Ao Marinho e sua família, agradeço pela hospitalidade em Brasília e por toda ajuda com os materiais para o experimento, ainda te devo um rádio!

Professor Osmar, obrigada por me aceitar no Herbário e ser um dos melhores professores que já tive o prazer de assistir aula. Professora Veridiana, obrigada pelas sugestões, pelo estágio docência e por toda ajuda.

Rosana Kolb por nos emprestar o laboratório e pelas boas risadas em Assis.

Bill Hoffmann graças a você existe esta dissertação.

Giselda Durigan, Natashi e Mário, obrigada pelas dicas no início do projeto e companhia no meu primeiro campo em Águas de Santa Bárbara.

Agradeço a CAPES pelo fomento desta dissertação.

A cada um que cruzou meu caminho, obrigada! Chegou ao fim, mas é só o começo. Espero que cada um de vocês possa me suportar por mais muitos anos. Nestes dois anos aprendi que a vida é rápida e quando resolve nos fazer crescer faz com maestria. Gratidão a vida!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo geral

O Cerrado pode estar exposto a diversos distúrbios naturais moduladores, entre eles a geada. Este é um fenômeno capaz de afetar a distribuição e seleção de características de tolerância e sobrevivência das espécies nestas vegetações. Deste modo, o presente estudo pretendeu compreender os efeitos causados pela geada em espécies afetadas e não afetadas por este fenômeno, assim como quantificar características morfo-fisiológicas que possam explicar as respostas de rebrota a baixas temperaturas. As pesquisas foram realizadas em três locais distintos: em Águas de Santa Bárbara - SP na Estação Ecológica de Águas de Santa Bárbara – EecSB (acometida em 2016 por seis episódios de geada entre os meses de junho e agosto) (Capítulo I); Assis - SP na Estação Ecológica de Assis –EEA que foi acometida por eventos de geada no mesmo ano (Capítulo I e II) e na Reserva Ecológica do IBGE em Brasília – DF (Capítulo III). No segundo capítulo as coletas e experimentos foram realizados na EEA e no câmpus da Unesp. No capítulo I e II foram avaliados indivíduos de espécies previamente selecionadas após a ocorrência da geada, com o intuito de analisar os efeitos da mesma na mortalidade de indivíduos e ramos de espécies arbóreas consideradas como afetadas pelo fenômeno; também foi verificado se o espécime teve rebrote a partir do solo ou do caule/ramos e o grau de proteção das gemas, além disso, realizamos análises de respostas morfo-fisiológicas por meio da avaliação de atributos foliares, como, espessura da folha; área foliar; dimensões foliares; área foliar específica e respostas fotossintéticas (razão $F_v:F_m$). No capítulo III analisamos se os atributos relacionados a proteção ao fogo são importantes para proteger ramos das espécies lenhosas do cerrado contra as baixas temperaturas: quantificamos a posição das gemas e analisamos se a espessura e a densidade da casca atuam como isolantes térmicos. No capítulo I encontramos que as posições das gemas diferiram entre as espécies afetadas e não

afetadas, e as espécies afetadas apresentaram diferentes respostas de rebrota de seus ramos. No capítulo II os parâmetros morfológicos não demonstraram grande influência sobre as divisões das espécies entre afetadas e não afetadas, sendo as respostas fotossintéticas a baixas temperaturas o fator que separou os grupos que haviam sido previamente determinados. As espécies afetadas e não afetadas responderam ao tratamento a baixas temperaturas como o esperado, sendo que as espécies afetadas apresentaram grandes declínios nos valores de $F_v:F_m$ a baixas temperaturas. No capítulo III não foram encontradas diferenças na espessura da camada de casca interna e espécies com casca mais densa apresentaram maior variação de temperatura, porém a variação de temperatura foi positivamente relacionada com a densidade da casca. Conclui-se então que existem diferenças morfológicas e fisiológicas entre espécies afetadas e não afetadas, mostrando que a geada pode afetar aspectos da vegetação de cerrado podendo atuar em conjunto com outros moduladores da fisionomia savânica.

Palavras – chave: Savanas brasileiras, geada, atributos morfo-fisiológicos.

Abstract

The Cerrado can be exposed to several natural disturbances, being frost one of them. Frost is a phenomenon that can affect the distribution and selects tolerance and survival characteristics of species occurring in these vegetations. This study aimed to understand the effects caused by frost on the biomass of frost affected and non-affected tree species, and to quantify morpho-physiological characteristics that may explain the regrowth responses after the exposition to low temperatures. Data collection was carried out in three different locations: the first chapter was developed in Águas de Santa Bárbara- SP at the Ecological Station of Águas de Santa Bárbara – EecSB, which was affected in 2016 by six episodes of frost between the months of June and August; data for first and second chapter were collected in Assis – SP at the Ecological Station of Assis –EEA, which was also affected by frost events in the same year. The chapter III was conducted at the IBGE Ecological Reserve in Brasília – DF. In the chapter II the collections and experiments were carried out in Assis in the EEA and in Unesp campus. In chapter I and II, individuals from preselected species were evaluated to analyze the effects of frost on the branch mortality of tree species considered to be affected by the phenomenon; additionally it was verified whether the specimen had regrowth from the soil or the stem / branches and the degree of protection of the buds. We performed analyzes of morpho-physiological responses through the evaluation of leaf attributes, such as leaf thickness; leaf area; leaf dimensions; specific leaf area and photosynthetic responses (Fv:Fm). In chapter III, we analyzed whether the attributes related to fire protection are important to protect branches of the woody species of the cerrado against temperature variations. We quantify the position of the buds and analyze if the thickness and the density of the bark act as thermal insulation. In the first chapter we found that the bud position differed between the two functional groups and the affected species showed different regrowth responses. In chapter II, the morphological parameters did

not show great influence on the separation of the species between affected and non-affected, being the photosynthetic responses at low temperatures the most important factor separating the groups. The affected and non-affected species responded to the treatment at low temperatures as expected, and the affected species showed large declines in the $F_v:F_m$ values under lower temperatures. In chapter III, the temperature variation was positively related to the bark density, but no differences were found in the inner bark thickness, and species with more density bark presented higher temperature variation. We concluded that there are morphological and physiological differences between affected and non-affected species showing that frost can affect aspects of Cerrado vegetation acting in conjunction with other modulators of the savanna physiognomy.

Keywords: Brazilian savanna, frost, morphological and physiological attributes.

Introdução geral

As savanas tropicais cobrem uma grande extensão da superfície terrestre, ocupando mais da metade da área da África e da Austrália, 45% da América do Sul e 10% da Índia e do Sudeste Asiático (Cole 1986; Scholes & Archer 1997). Ocorrem desde o nível do mar até altitudes acima de 1.300m, com uma variedade de temperaturas variando em função da altitude e latitude de cada local (Goedert 2008). A vegetação é caracterizada por uma cobertura contínua de gramíneas, e variável cobertura lenhosa, no qual formas de vida contrastantes são codominantes (Parr *et al.* 2014). As savanas podem ser incluídas na definição de biomas herbáceos tropicais, conhecidos como TGBs (Tropical Grass Biomes) (Parr *et al.* 2014). Os TGBs compreendem diversas fisionomias vegetacionais, desde formações abertas com pouca ou quase nenhuma cobertura de dossel até savanas de dossel denso com até 80% de cobertura lenhosa, diferindo de outras vegetações pela presença de gramíneas C4 e frequente presença do fogo (Parr *et al.* 2014).

Os TGB's constituem ambientes extremamente dinâmicos e heterogêneos em termos espaciais e temporais. O padrão espacial de distribuição da vegetação savânica e das características das plantas para sobrevivência resulta da atuação interativa de diversas variáveis, conhecidas como fatores determinantes. Diversos autores elencaram estes determinantes citando como principais: o clima (padrões sazonais de precipitação), devido ao fato do bioma estar sujeito a uma seca anual regular; as condições edáficas e geomorfológicas; a herbivoria e o fogo; que por meio de interações complexas e dinâmicas moldam seus componentes florísticos (Scholes & Archer 1997; Lehmann *et al.* 2011, 2014; e Hoffmann *et al.* 2012).

O Cerrado em sua grande diversidade fisionômica é o principal representante dos TGBs no continente Sul Americano (Parr *et al.* 2014). Ocupa uma grande extensão

do país e apresenta diversas fisionomias, em que predominam as formações savânicas (também conhecidas como cerrado típico) (Oliveira-Filho & Ratter 2002). A savana brasileira é considerada o segundo maior bioma brasileiro e ocorre em uma faixa latitudinal de 3°N a 24°S, essencialmente sob climas tropicais, porém sendo capaz de ocorrer em regiões ao sul do trópico de Capricórnio, sob clima sub-tropical (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 2006). É reconhecida como a savana mais rica do mundo em termos de espécies vegetais, e é classificado como um dos “hotspots” para conservação da biodiversidade mundial, isso devido à grande diversidade biológica que abriga e ao processo de degradação que vem sofrendo (Myers *et al.* 2000; Klink & Machado 2005).

Como uma típica savana tropical, o Cerrado tem regimes de fogo recorrentes o qual é importante para estruturar a comunidade em termos de espécies, e que selecionou características ecofisiológicas para sobrevivência sob estes aspectos (Franco 2004). Entretanto, além deste determinante, quando ocorrente em regiões sub-tropicais o Cerrado pode estar exposto a geadas, tornando-se esse um fator que afeta sua distribuição e que seleciona características de tolerância e sobrevivência de suas espécies vegetais (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 2006). A geada é geograficamente restrita a altas elevações e ao extremo sul do bioma; geadas de pequena intensidade, porém, ocorrem quase anualmente no Paraná e São Paulo (limites sul de distribuição do cerrado); ao contrário, geadas severas tem recorrência média de 25 anos (Brando & Durigan 2005).

A geada é um fenômeno meteorológico que ocorre em temperaturas abaixo de 0°C (Sakai & Larcher 1987; Kalma *et al.* 1992; Lambers *et al.* 2008). Segundo Inouye (2000), o termo geada pode representar tanto a formação de cristais de gelo (chamado de hoarfrost em inglês) que podem recobrir as plantas e o solo, como também os efeitos que temperaturas abaixo do ponto de congelamento (frost) podem ter sobre os seres

vivos. Para que isso aconteça, ao invés da umidade existente no ar se condensar sob a forma líquida, ela passa diretamente do estado de vapor ao de cristais de gelo, constituindo o orvalho congelado. Sob certas condições, quando o ar está muito seco e o vento muito frio, os efeitos da geada sobre os organismos vivos podem ocorrer sem a formação de sinal visível: fenômeno este conhecido por geada negra. Tais eventos são dependentes da temperatura, da umidade do ar e da duração da temperatura de congelamento (Inouye 2000; Demarchi & Piroli 2015).

As geadas podem não ter efeitos tão graves como outros eventos climáticos, tais como a seca, tempestades violentas de vento ou longos invernos, porém a longo prazo podem ter efeitos ecológicos significativos em comunidades vegetais (Sakai & Larcher 1987; Inouye 2000). Em muitos casos, pode haver uma clara relação entre o grau em que as plantas são afetadas e a sua distribuição geográfica (Hoffmann *et al.* 2019); e em uma escala temporal menor pode ser demonstrando a limitação no crescimento e reprodução das plantas (Burke *et al.* 1976; Silberbauer- Gottsberger *et al.* 1977; Inouye 2000).

As baixas temperaturas podem causar dois efeitos distintos nos organismos vegetais: resfriamento e congelamento. No caso do resfriamento, os organismos são expostos a temperaturas suficientemente baixas para causar injúria, porém, não fria o bastante para congelar (Taiz & Zeiger 2006; Begon *et al.* 2007). Lesões ocasionadas pelo resfriamento podem ocorrer em plantas de climas temperados e tropicais, porém, este tipo de dano por resfriamento é principalmente um problema em áreas tropicais, pois as espécies dessas regiões são mais vulneráveis a temperaturas de apenas alguns graus abaixo do ponto de congelamento (Sakai & Larcher 1987). Ao ser afetada pelo resfriamento, a primeira resposta das plantas é a murcha das folhas com aparecimento de manchas (Kalma *et al.* 1992). No congelamento ocorre o processo de solidificação de

água e formação de gelo em solução aquosa. Nos tecidos vegetais, o congelamento da água ocorre a temperaturas inferiores a 0°C, ou seja, quando a temperatura atinge este ponto, danos ocorrem a partir da formação de cristais de gelo (Sakai & Larcher 1987; Kalma *et al.* 1992; Whitecross *et al.* 2012).

As células vegetais sobrevivem ao congelamento somente se os cristais de gelo formados não forem grandes o suficiente para causar dano mecânico nas células, pois as membranas de cloroplasto podem ser danificadas durante o congelamento e descongelamento, o que pode resultar em uma inativação da fotossíntese. Assim, o dano de congelamento causado pela formação de cristais dentro das estruturas celulares normalmente pode resultar em maior proporção de mortalidade tecidual, devido à maior gravidade desse tipo de perturbação, por isso, em um evento de geada, o grau de dano sofrido pela planta afetada é influenciado pelo nível em que as temperaturas abaixam e o tempo de exposição a mesma (Sakai & Larcher 1987; Ehlert & Hinch 2008; Whitecross *et al.* 2012).

Autores como Silberbauer-Gottsberger *et al.* (1977), Vuono *et al.* (1982), Filgueiras & Pereira (1987) e Brando & Durigan (2005) relataram os efeitos ecológicos das geadas em vegetações de cerrado típico no estado de São Paulo e Distrito Federal. Silberbauer-Gottsberger *et al.* (1977) e Brando & Durigan (2005) demonstraram a existência de espécies arbóreas típicas de cerrado que toleram a geada, tais como: *Ouratea spectabilis* (Mart. ex Engl.) Engl, *Styrax camporum* Pohl, entre outras; assim como a existência de espécies sensíveis, que tem folhas mortas e parte de sua biomassa aérea perdida, como: *Miconia albicans* (Sw.) Steud, *Vochysia tucanorum* Mart. e *Dimorphandra mollis* Benth. Para Eiten (1972), a vegetação de Cerrado teria sua ocorrência restrita às áreas onde as geadas são ausentes ou são extremamente raras, desta maneira, regiões mais frias em que as geadas tendem a ser mais frequente, o

cerrado típico seria substituído por formações campestres. Entende-se então que a ocorrência restrita do Cerrado ao Sul do Brasil possa ser devido às temperaturas mais baixas e às geadas mais severas, talvez por isso a savana brasileira encontre no Paraná o seu limite de ocorrência ao sul, com pequenas manchas ocorrentes nesta região (Roderjan *et al.* 2002).

Apesar destas importantes conclusões ecológicas, faz-se necessário conhecer os mecanismos de tolerância e resistência das plantas para podermos entender como elas respondem a este fenômeno. Na literatura constam inúmeros exemplos dos efeitos causados pela geada em espécies cultivadas, entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos deste fenômeno meteorológico sobre as vegetações naturais (Barbosa *et al.* 1993).

No ano de 2016 algumas regiões de cerrado do estado de São Paulo foram acometidas pela geada, dentre estas estão os municípios de Águas de Santa Bárbara e Assis. Na Estação Ecológica de Águas de Santa Bárbara, as temperaturas foram acompanhadas por uma estação meteorológica, sendo possível analisar quais foram às temperaturas mínimas alcançadas (Hoffmann *et al.* 2019). Em um dia de ocorrência da geada, as temperaturas do ar a 1 metro de altura do solo começaram a cair rapidamente após as 18:00, com o valor de zero sendo atingido entre a 01:00 e as 03:00 da madrugada (Figura 1). As menores temperaturas atingidas estiveram entre -1 e -3°C, sendo as plantas expostas a temperaturas abaixo de zero por um período entre duas a três horas (Figura 1).

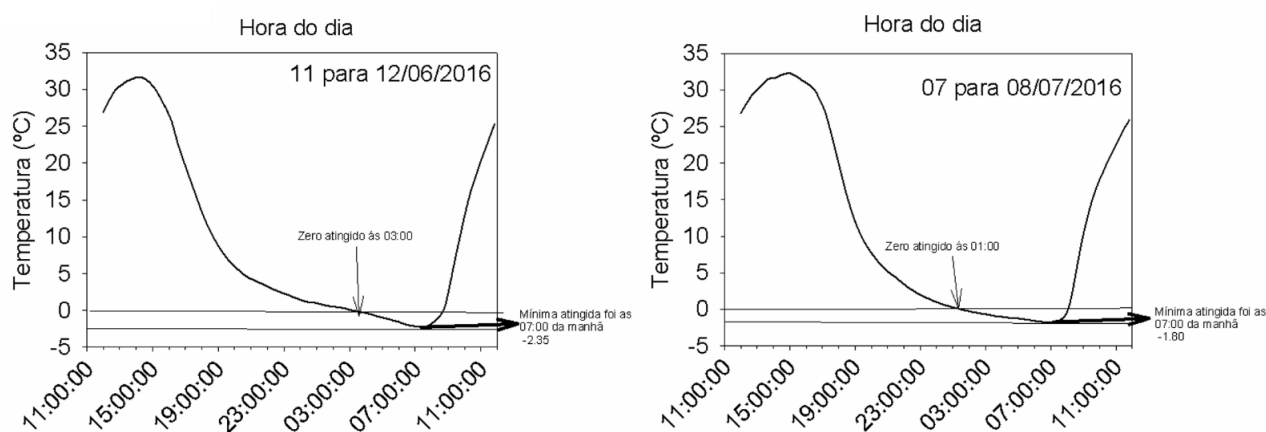


Figura 1. Variação da temperatura do ar a 1 metro de altura em dois dias onde a geada foi ocorrente (junho e julho de 2016) na Estação Ecológica de Águas de Santa Bárbara.

A ocorrência destes fenômenos de queda de temperatura apresentados na Figura 1 ocasionaram a morte de ramos secundários e folhas, e até mesmo de toda a parte aérea, de muitas espécies na localidade em questão. Na figura 2 as imagens foram feitas um ano após a geada e pode-se observar que as copas de muitos indivíduos foram danificadas (Figura 2).

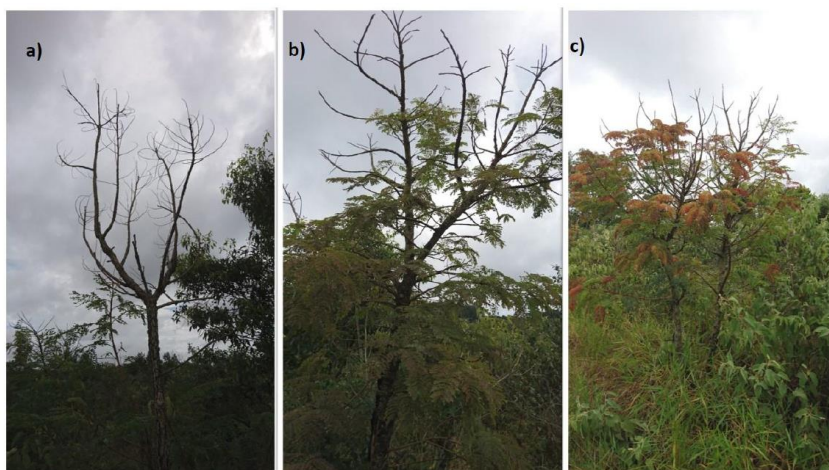


Figura 2. Espécies da Estação Ecológica de Águas de Santa Bárbara afetadas pela geada. a) indivíduo de *Dimorphandra mollis* que apresentou mortalidade de toda parte aérea; b) indivíduo de *Dimorphandra mollis* com ramos mortos, porém rebrotando e c) indivíduo de *Stryphnodendron rotundifolium* com a parte aérea danificada e novos ramos brotando.

Objetivos gerais

Devido às observações reportadas anteriormente, o presente estudo tem como objetivo compreender os efeitos causados na biomassa de espécies afetadas pela geada, assim como quantificar características morfo-fisiológicas que possam explicar as respostas de rebrota e tolerância à baixas temperaturas nas espécies afetadas e não afetadas pelas geadas.

Partindo do princípio que a geada possa ser um fator determinante do cerrado típico nas regiões mais ao sul de sua distribuição e em regiões de altitude, portanto moldando sua fisionomia e selecionando características ecofisiológicas, esperamos que a geada afete a biomassa e a estrutura das plantas do cerrado típico e que os atributos já conhecidos para proteção ao fogo, como proteção de gemas e espessura da casca, auxiliem as espécies não afetadas pela geada a não sofrer graves danos, e àquelas que são sensíveis a rebrotar.

A hipótese principal de trabalho é a seguinte: esperamos que atributos de espécies lenhosas ligados a persistência sob regimes de fogo também possam ser essenciais para sobrevivência e persistência sob eventos de geada. Especificamente, as espécies não afetadas e as afetadas pela geada apresentariam diferenças no conjunto de estratégias ecofisiológicas adotadas para persistirem no sistema.

Esta dissertação está dividida em três capítulos:

Capítulo 1: Neste capítulo analisamos aspectos relacionados à proteção de gemas e as respostas de rebrotas de plantas afetadas após a ocorrência da geada, testando a hipótese de que espécies afetadas pela geada apresentem gemas pouco protegidas em seus ramos, ao contrário, espécies que não sofrem mortalidade da parte aérea apresentam gemas totalmente protegidas. Além disso, analisamos as respostas de rebrota em ramos das espécies afetadas.

Capítulo 2: Neste estudo analisamos atributos morfológicos e fisiológicos foliares de espécies afetadas e não afetadas pela geada para determinar se a tolerância a este fator é causada por diferenças em atributos foliares. Esperamos que espécies não afetadas pelas geadas mantenham seu desempenho fotossintético a baixas temperaturas por possuírem estratégias morfológicas que protegem o sistema fotossintético contra baixas temperaturas. Temos como hipótese que temperaturas abaixo de 5°C irão afetar drasticamente o desempenho fotossintético de espécies afetadas pela geada. Também testamos se as espécies possuem padrões semelhantes de atributos foliares que explicam sua capacidade foliar de tolerar/não tolerar baixas temperaturas.

Capítulo 3: Neste capítulo analisamos se atributos relacionados à proteção ao fogo são importantes para proteger ramos das espécies lenhosas do cerrado contra variações de temperaturas quando resfriadas. Pretendemos encontrar uma relação positiva entre a espessura da casca e o grau de proteção das gemas e encontrar uma relação positiva entre a densidade da casca e a variação da temperatura interna do tecido, o que significaria que as espécies com casca menos densa apresentariam menor variação de temperatura nos tecidos de seus ramos; portanto estariam protegidas contra baixas temperaturas.

Referências

- Barbosa, L.M., Barbosa, J.M., Bedinelli, C., Asperti, L.M., Belasque, E.F. & Batista, E.A. (1993). Efeitos de geadas em mudas de espécies arbóreas de mata ciliar utilizadas em ensaios de campo. *Acta bot. Bras.*, 7, 95-105.
- Begon, M; Harper, J.L. & Townsend, C.R. (2007). *Ecologia: de Indivíduos a Ecossistemas*. Artmed. Porto Alegre. p.752.
- Brando, P.M. & Durigan, G. (2005). Changes in Cerrado Vegetation after Disturbance by Frost (São Paulo State, Brazil). *Plant Ecol.*, 175, 205–215.
- Carvalho, C.P. *Influência de baixas temperaturas no crescimento, conteúdo de carboidratos e aclimatização da bromélia endêmica Nidularium minutum Mez. cultivada in vitro*. 2012. 119f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2012.
- Charles-dominique, T., Beckett, H., Midgley, G.F. & Bond, W.J. (2015). Bud protection: A key trait for species sorting in a forest-savanna mosaic. *New Phytol.*, 207, 1052–1060.
- Cole, M.M. *The savannas: biogeography and geobotany*. Academic Press. XVII, Londres, p. 438, 1986.
- Coutinho, L.M. (2002). *O Bioma Cerrado*. In: Klein, A.L. Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois. UNESP, Imprensa Oficial do Estado, São Paulo, 77-91.
- Craine, J. M., Froehle, J., Tilman, D.G., Wedin, D.A. & Chapin, F.S. (2001). The relationships among root and leaf traits of 76 grassland species and relative abundance along fertility and disturbance gradients. *Oikos*, 93, 274-285.
- Demarchi, J. C. & Piroli, E. L. (2015). Análise dos efeitos de geadas na cobertura vegetal do município de Cândido Mota – SP, Brasil, por meio de índices de vegetação. *Bol. Goia. Geogr.* (Online), 35, 554-573.
- Eiten, G. (1972). The Cerrado Vegetation of Brazil. *Bot. Rev.*, 38, 201-327.

- Filgueiras, T.S. & Pereira, B.A.S. (1987). Efeito de uma geada sobre a flora do cerrado na Reserva Ecológica do IBGE, DF-Brasil. *Cadernos de Geociências*, 2, 67–70.
- Franco, A. C. (2004). *Estratégias funcionais de plantas lenhosas das savanas do Brasil central: relação ao déficit hídrico e ao regime luminoso*. In: Cabrera H. M. Fisiología ecológica en plantas: Mecanismos y Respuestas a Estrés en los Ecosistemas., p.173 - 188, Chile, 2004.
- Goedert, W.J., Wagner, E. & Barcellos, A.O. (2008). *Savanas Tropicais: dimensão, histórico e perspectivas*. In: Faleiro, F.G. & Neto, A.L.F. (Eds.). Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais. Planaltina, DF. Embrapa Cerrados, 49-80.
- Gottsberger, G. & Silberbauer-Gottsberger, I. (2006). *Life in the Cerrado*. v. I. Origin, Structure, Dynamics and Plant Use. Reta, Ulm.
- Guedes, D. M. (1993). *Resistência das árvores do cerrado ao fogo: papel da casca como isolante térmico*. Brasília. Dissertação (Mestrado), Universidade Brasília, Instituto de Biociências.
- Hoffmann, W. A., Geiger, E.L., Gotsch, S.G., Rossatto, D.R., Silva, L.C.R., Lau, O.L., Haridasan, M. & Franco, A.C. (2012). Ecological thresholds at the savanna-forest boundary: how plant traits, resources and fire govern the distribution of tropical biomes. *Ecol. lett.*, 15, 759-768.
- Hoffmann W.A., Flake S.W., Abreu R.C.R., Pilon N.A., Rossatto D.R. & Durigan G.D. (2019) Rare Frost Events Reinforce the Distribution of Tropical Biomes. *J. Ecol.* 107,468–477. doi: 10.1111/1365 - 2745.13047
- Holdo, R. M. (2006). Elephant herbivory, frost damage and topkill in Kalahari sand woodland savanna trees. *J. Veg. Sci.* 17, 509-518.
- Inouye, D.W. (2000). The ecological and evolutionary significance of frost in the context

- of climate change. *Ecol. Lett.* 3, 457-463.
- Kalma, J.D., Laughlin, G.P., Caprio, J. M. & Hamer, P. J. C. (1992). *Advances in Bioclimatology 2: The Bioclimatology of Frost Its Occurrence, Impact and Protection*. Springer-Verlag, 158.
- Klink, C. A. & Machado, R. B. (2005). Conservation of the brazilian Cerrado. *Conserv. Biol.*, 19, 707-713.
- Lambers, H., Pons, T.L. & Chapin, F.S. (2008). *Plant Physiological Ecology*. 2º edição.
- Lehmann, C. E., Archibald, S.A., Hoffmann, W.A. & Bond, W.J. (2011).Deciphering the distribution of the savanna biome. *New Phytol.*, 191, 197-209.
- Lehmann C.E.R., Anderson M.T., Sankaran M., Higgins S.I., Archibald S., Hoffmann W.A., Hanan N.P., Williams R.J., Fensham R.J., Felfili J., Hutley L.B., Ratnam J.,⁴ San Jose J., Montes R., Franklin D., Russell-Smith J., Ryan C.M., Durigan G., Hiernaux P., Haidar R., Bowman D.M.J.S. & Bond W.J. (2014) Savanna Vegetation-Fire-Climate Relationships Differ Among Continents. *Science*, 343, 548. doi: 10.1126/science.1247355
- Maurin, O., Davies, J., Burrows, J.E., Daru. B.H., Yessoufou¹, K., Muasya, A.M., van der Bank, M. & Bond.W.J. (2014).Savanna fire and the origins of the ‘underground forests’ of Africa. *New Phytol.* 204, 201-214.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B. & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858.
- Oliveira-Filho A. T. & Ratter, J. A (2002). *Vegetation physiognomies and woody flora of the Cerrado Biome*. In: Oliveira, P. S. & Marquis, R. J. The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a Neotropical savanna. p. 91-120 Columbia University Press, New York.
- Parr, C. L., Lehmann,C.E.R, Bond,W.J., Hoffmann,W.A. & Andersen, A.N. (2014).

- Tropical grassy biomes: misunderstood, neglected, and under threat. *Trends Ecol. & Evol.*, 29, 205-213
- Ribeiro, S. C., Fehrmann, L., Soares, C.P.B., Jacovine, L.A.G., Kleinn, C. & Gaspar, R.O. (2011). Above-and belowground biomass in a Brazilian Cerrado. *Forest Ecol. Manag.*, 262, 491-499.
- Rizza, F., Pagani, D., Stanca, A.M. & Cattivelli, L. (2001). Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats. *Plant Breed.*, 120, 389-396.
- Roderjan, C. V., Galvão, F., Kuniyoshi, Y.S. & Hatschbach, G.G. (2002). As unidades fitogeográficas do estado do paran , brasil. *Ciência & Ambiente*, 24, 5–92.
- Sakai, A. & Larcher, W. (1987). *Frost Survival of Plants: Responses and Adaptation to Freezing Stress*. Ecological Studies, 62. Springer-Verlag, New York, 1987.
- Scholes, R. J. & Archer, S. R. (1977). Tree-grass interactions in savannas. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28, 517–44.
- Silberbauer-Gottsberger, I., Morawetz, W. & Gottsberger, G. (1977). Frost damage of cerrado plants in Botucatu, Brazil, as related to the geographical distribution of the species. *Biotropica*, 9, 253–261.
- Silva, A.L.L., Oliveira, Y., Alcantara, G.B., Santos, M. & Quoirin, M. (2009). Tolerância ao resfriamento e congelamento de folhas de eucalipto. *Biociências*, 17, 86-90, dez.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2006). *Fisiologia Vegetal*. Artmed. 3ed. Porto Alegre.
- Vuono Y.S., Barbosa, L.M., Batista, E.A. & Gurgel Filho, O.A. (1982). Efeitos biológicos da geada na vegetação do cerrado. *Silvicultura em São Paulo* 16, 545–547.

Whitecross, M.A., Archibald, S. & Witkowski, E.T.F. (2012). Do freeze events create a demographic bottleneck for *Colophospermum mopane*? *South African J. Bot.*, 83, 9–18.

CAPÍTULO I

Estratégias morfológicas de proteção e respostas de rebrota em espécies arbóreas do cerrado após ocorrência de geada



Introdução

Nas savanas tropicais, distúrbios naturais como o fogo e a herbivoria são os principais determinantes da estrutura e composição dos diferentes tipos de vegetações (Miranda *et al.* 1993; Hoffmann 1998; Midgley *et al.* 2010; Enright *et al.* 2011; Archibald 2016). Entretanto, nenhum destes determina a composição e densidade de árvores na savana de maneira isolada: há um efeito sinérgico também com a disponibilidade de nutrientes e o estresse hídrico (Frost *et al.*, 1985). Nestes ambientes, características morfofisiológicas envolvendo estratégias de resistência, regeneração ou sobrevivência para lidar com a presença de fogo e herbivoria, as quais levam a perda da biomassa aérea, são comuns (Coutinho 2002; Miranda *et al.* 2002). Estas adaptações podem variar desde gemas protegidas (Charles-Dominique *et al.* 2015); casca espessa que atua como isolante térmico dos tecidos vivos; rebrotas vigorosas; sistemas subterrâneos desenvolvidos (Gignoux *et al.* 1997; Hoffmann & Moreira 2002; Hoffmann *et al.* 2009) e folhas escleromórficas com cutículas e parênquimas espessos, que permitem altas taxas de fotossíntese para aumentar produtividade e crescimento (Bieras & Sajo 2009).

Nestes ambientes são encontradas plantas denominadas germinadoras, que são mortas pela passagem do fogo e que dependem do recrutamento de sementes para persistir, e aquelas consideradas rebrotadoras, as quais rebrotam a partir de gemas protegidas das altas temperaturas causadas pela passagem do fogo (Bond & van Wilgen 1996; Vesk & Westoby 2004; Enright *et al.* 2011). A rebrota pode ser aérea (ramos), basal ou subterrânea, e a capacidade de rebrota pode ser considerado um dos atributos funcionais mais importantes para plantas em sistemas com distúrbio de origem pirógena (Hoffmann *et al.* 2012; Clarke *et al.* 2013; Schubert *et al.* 2016). Para as respostas de rebrota pós-distúrbio, alguns tecidos são importantes como, os tecidos meristemáticos (gemas ou tecidos que dão origem às mesmas), bem como o câmbio vascular,

responsável por formar o xilema e floema secundários (Appezato-da-Glória & Carmello-Guerreiro 2006), sendo assim a posição e a localização das gemas são importantes para a sobrevivência e rebrota após um distúrbio (Clarke *et al.* 2013).

As savanas podem estar expostas a outros fenômenos, como as geadas, que podem desempenhar um papel relativamente importante na dinâmica e na manutenção desta vegetação (Childes & Walker 1987; Brando & Durigan 2005; Holdo 2006; Chafota & Owen-Smith 2009; Finckh 2016; Muller *et al.* 2016; Hoffmann *et al.* 2019). A geada é um evento que afeta as vegetações em momentos particulares, especialmente durante o inverno, possuindo intensidades e frequências específicas (Frost *et al.* 1985). No Brasil, a geada é geograficamente restrita a altas elevações e ao extremo sul da região de ocorrência das savanas brasileiras (Dias 1992). Entretanto, em pesquisas realizadas na África do Sul, foi possível observar que apesar da curta duração, esses eventos de geada tiveram um grande impacto sobre a flora de regiões savânicas em que espécies herbáceas foram queimadas e morreram devido a ação da geada (Finckh 2016).

Whitecross *et al.* (2012) e Hoffmann *et al.* (2019) argumentaram sobre a possibilidade das geadas imporem um gargalo demográfico, similar ao que é observado para ambientes propensos ao fogo ou com presença de herbívoros, que pode impedir que os indivíduos de espécies lenhosas atinjam tamanhos de adultos, em casos onde a perturbação é suficientemente frequente. Desta maneira, poderia existir também uma "armadilha de congelamento" semelhante à "armadilha de fogo" (ciclos repetidos de perda e rebrota de biomassa) (Bond & Midgley 2001; Grady & Hoffmann 2012; Hoffmann *et al.* 2019); onde na ocorrência da geada as espécies seriam mantidas em um estado suprimido onde há ciclos repetidos de perda de biomassa e rebrota. A geada deve compartilhar características importantes com danos causados por incêndios e herbívoros e, portanto, pode reforçar a dinâmica imposta pelos mesmos (Hoffmann *et al.*, 2019).

Adicionalmente, Rutherford *et al.* (2006) reporta em seu estudo que algumas plantas da savana sul africana apresentam estratégias para lidar com baixas temperaturas por deciduidade durante o evento de baixa temperatura, ou perdendo folhas antes das temperaturas baixarem o suficiente, para evitar o congelamento. As estratégias para lidar com altas temperaturas podem ser consideradas essenciais para processos de sobrevivência/resistência a baixas temperaturas, como já demonstrado para plantas que conseguem sobreviver sob climas onde as baixas temperaturas são comuns como em ambientes temperados (Craine *et al.* 2001; Holdo 2006).

No ano de 2016 ocorreram eventos drásticos de geada na região sudeste do Brasil, especialmente em áreas de cerrado no município de Assis e Águas de Santa Bárbara (Hoffmann *et al.* 2019). Apesar de informações básicas de respostas de plantas do cerrado a geada terem sido relatadas por Brando & Durigan (2005), aspectos detalhados das respostas funcionais não são conhecidos. Assim surgem os questionamentos: a geada pode ocasionar mortalidade dos ramos, afetando características da rebrota? Este fator é dependente da espessura da casca e grau de proteção das gemas? Como as plantas afetadas respondem a este fator?

Neste estudo, analisamos aspectos relacionados à proteção de gemas e a rebrota de ramos em plantas afetadas e não afetadas pela geada. Esperamos que espécies afetadas pela geada apresentem gemas pouco protegidas em seus ramos, ao contrário, espécies que não sofrem mortalidade da parte aérea apresentam gemas totalmente protegidas. Além disso, as espécies não afetadas possuiriam casca mais espessa para proteção do câmbio vascular, enquanto as afetadas teriam cascas mais finas acarretando a mortalidade dos ramos. As espécies afetadas teriam rebrotas dependentes do tamanho do diâmetro do tronco e dos ramos principais, podendo apresentar rebrote somente do

tronco, solo ou ramos onde as gemas teriam maior proteção e menor contato direto com a geada.

Materiais e Métodos

Área de estudo

O presente estudo foi realizado em duas Estações Ecológicas do estado de São Paulo: a Estação Ecológica de Águas de Santa Bárbara (EEcSB) e a Estação Ecológica de Assis (EEA).

A EEcSB possui 2700 ha, está localizada no município de Águas de Santa Bárbara – SP; encontra-se entre as coordenadas geográficas 22°46' a 22°41' S e 49°16' a 49°10' O. As parcelas em que foram realizadas a coleta de dados deste estudo fazem parte de um projeto maior de manejo de fogo (ver Abreu *et al.* 2017), assim, realizamos coletas em parcelas controle (parcelas sem o manejo de fogo) para segurança de que os danos observados eram provenientes somente dos efeitos da geada. A EEcSB é ocupada, quase em sua totalidade, por vegetação de Cerrado com predominância de fisionomias abertas em que as árvores são esparsas e pequenas. É uma região de clima Cfa (quente e úmido com inverno seco) segundo a classificação de Köppen, podendo sofrer geadas esporádicas, que podem ser severas (Melo & Durigan 2011). No ano de 2016, ocorreram alguns episódios de geada nos meses de junho, julho e agosto, atingindo temperaturas de cerca de - 2°C (Hoffmann *et al.* 2019).

A EEA ocupa terras do município de Assis - SP, situado na região sudoeste do estado de São Paulo, entre as coordenadas 22° 33' a 22°38'S, 50° 21 a 50°24'O. Trata-se de uma zona de transição climática entre os tipos Cwa e Cfa, com estação seca entre maio e setembro e estação chuvosa entre outubro e abril. Com área de 1.760,64 ha, a EEA, preserva predominantemente vegetação de cerrado lato sensu, com uma amostra significativa do bioma Cerrado nas áreas limítrofes da face sul da sua área de domínio

(ICMBIO 2010). No mesmo ano de 2016, também ocorreram períodos de geada em que apesar de atualmente a vegetação da estação estar se modificando para um cerrado (Pinheiro & Durigan 2009) algumas espécies foram afetadas em áreas que permanecem abertas (observações pessoais).

Seleção de espécies

Baseando-se na literatura a respeito do efeito das geadas em plantas arbóreas de cerrado típico (Silberbauer-Gottsberger *et al.* 1977; Brando & Durigan, 2005), e observações em campo, selecionamos 15 espécies de árvores para este estudo (Tabela 1). Nos trabalhos citados o efeito causado pela geada foi verificado a partir da classificação de graus de dano (ex: afetadas moderadamente, pouco afetadas, muito afetadas), estando o grau relacionado a mortalidade de folhas e ramos nos indivíduos. Consideramos espécies não afetadas aquelas que não apresentaram nenhum sinal de queima/mortalidade de folhas e ramos após a ocorrência da geada. Em contrapartida, as afetadas foram aquelas que apresentaram mortalidade de ramos e de folhas logo após a geada. Em Águas de Santa Bárbara foram coletadas e analisadas 12 espécies, e em Assis somente duas espécies, sendo elas *Xylopia aromatica* e *Vochysia tucanorum*.

Tabela 1. Espécies escolhidas para o estudo, divididas em espécies que não foram afetadas pela geada e espécies que foram muito afetadas e suas respectivas famílias.

Famílias	Espécies	Grupos funcionais
Primulaceae	<i>Myrsine umbellata</i> Mart.	Não afetada
Asteraceae	<i>Gochmatia polymorpha</i> (Less.) Cabrera	Não afetada
Styracaceae	<i>Styrax camporum</i> Pohl	Não afetada
Vochysiaceae	<i>Qualea multiflora</i> Mart.	Não afetada
Peracaceae	<i>Pera glabrata</i> (Schott) Poepp. ex Baill.	Não afetada
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum pelleterianum</i> A.St.-Hil.	Não afetada
Ochnaceae	<i>Ouratea spectabilis</i> (Mart. ex Engl.) Engl.	Não afetada
Leguminosae	<i>Dimorphandra mollis</i> Benth.	Afetada
Leguminosae	<i>Stryphnodendron rotundifolium</i> Mart.	Afetada
Lamiaceae	<i>Aegiphila verticillata</i> Vell.	Afetada
Ebenaceae	<i>Diospyros burchellii</i> Hiern	Afetada
Primulaceae	<i>Myrsine guianensis</i> (Aubl.) Kuntze	Afetada
Melastomataceae	<i>Miconia albicans</i> (Sw.) Steud.	Afetada
Vochysiaceae	<i>Vochysia tucanorum</i> Mart.	Afetada
Annonaceae	<i>Xylopia aromatica</i> (Lam.) Mart.	Afetada

Características de proteção de gemas e espessura casca

Para avaliar as diferentes estratégias de recuperação/sobrevivência entre os dois grupos funcionais (afetadas e não afetadas) foi avaliada a posição das gemas nos ramos de acordo com metodologia apresentada por Burrows *et al.* (2010) e também aplicada por Charles-Dominique *et al.* (2015) em que é utilizada uma escala semi-quantitativa que demonstra a posição das gemas nos ramos da seguinte maneira:

0: gemas na superfície da casca;

1: gemas que emergem da superfície do caule, mas com o meristema sob a superfície da casca;

2: gemas na base de depressões profundamente estreitas na casca;

3: gemas completamente cobertas por casca.

Foram coletados ramos das espécies afetadas e não afetadas em três de agosto de 2017 nas diferentes áreas de estudo. Os ramos foram levados para o laboratório e então cortados ao meio com uma tesoura de poda. Para avaliação da posição das gemas e espessura da casca, foram coletados ramos grossos, médios e finos, sempre avaliando a parte central dos ramos para posição das gemas e espessura da casca, nunca coletando ramos muito jovens. As gemas foram fotografadas com auxílio da lupa Coleman com aumento (1x). A espessura da casca interna e externa dos ramos foi mensurada com um paquímetro digital (Vonder, 150 mm, resolução de 0,01 mm) e com auxílio do software gratuito Image J para quantificar quanto de tecido isolante (súber) existe em ramos de diferentes tamanhos, para medição das espessuras foi utilizado aumento de 0,7x. O termo casca aqui empregado consiste em todos os tecidos externos ao câmbio vascular (Esau 1967; Niklas 1999). Neste trabalho consideramos casca externa a parte morta da casca e casca interna a parte viva. As hastes amostradas do grupo das não afetadas tiveram um diâmetro médio de aproximadamente $7,44 \pm 0,123$ cm e do grupo das afetadas diâmetro médio de $6,31 \pm 1,72$ cm.

Respostas de rebrota após a ocorrência de geada

Foram avaliados os efeitos da geada na mortalidade de indivíduos e ramos em espécies arbóreas do cerrado consideradas como afetadas pelo fenômeno (Tabela 1). Foram amostrados 30 indivíduos por espécie de maneira aleatória na área de coleta, e que possuíam diversos diâmetros. Esses indivíduos foram marcados e tiveram mensuradas a altura (m) e o diâmetro (cm) a 30 cm do solo com fita diamétrica. Se o indivíduo apresentou mortalidade do caule, foram medidas a altura do indivíduo morto e do rebrote, assim como diâmetro do caule da parte morta e do rebrote. Para analisar a

frequência da localização da rebrota os diâmetros medidos foram agrupados em classes de $>$ e <5 cm, sendo avaliado se rebrotavam do tronco (TR), ramos (RM) ou solo (SL).

Análises estatísticas

Todos os dados foram testados quanto às premissas de normalidade e homogeneidade de variâncias, sendo transformado por $\log_{10}$ quando essas premissas não foram atingidas. Os dados de proteção de gema foram analisados por um histograma demonstrando a distribuição de frequências para cada tipo de estratégia. Para analisar as diferenças entre as espessuras da casca dentre os grupos das espécies afetadas e não afetadas, foi realizado Test t de student, comparando as médias dos dois grupos em espessura interna e externa utilizando o software Sigma Plot 11.0.

Resultados

Grau de proteção das gemas e espessura da casca

Quando analisamos e classificamos as gemas de acordo com a sua posição, observamos que as espécies classificadas como afetadas (Figura 1a) não apresentaram gemas na posição 3 (maior proteção da casca). Já as não afetadas pela geada, não apresentaram gemas na posição 0 (Figura 1b), ou seja, posição em que as gemas estariam mais desprotegidas. Na Figura 2, espécies afetadas e não afetadas tem suas gemas representadas, 3 espécies afetadas foram classificadas como 0 (*Dimorphandra mollis*, *Diospyros burchellii* e *Stryphnodendron rotundifolium*). Os dois grupos apresentaram 3 espécies pouco protegidas (posição 1) (Figura 2) e as não afetadas apresentaram 2 espécies classificadas em posição totalmente protegida (posição 3), sendo elas *Styrax camporum* e *Erythroxylum pelleterianum*.

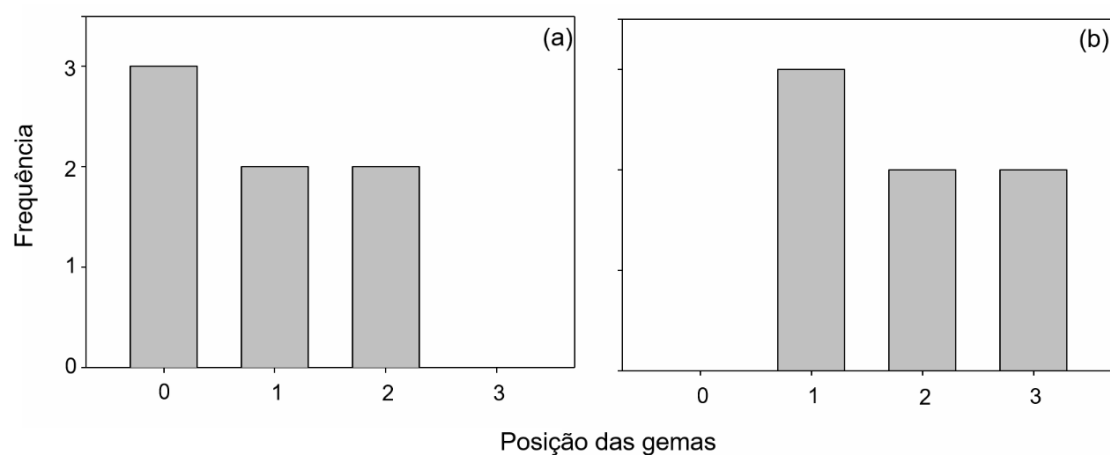


Figura 1. Histogramas mostrando a frequência com que as posições das gemas (0,1,2 e 3) foram classificadas nas espécies dos dois grupos funcionais: afetadas (a) e não afetadas (b) pela geada.

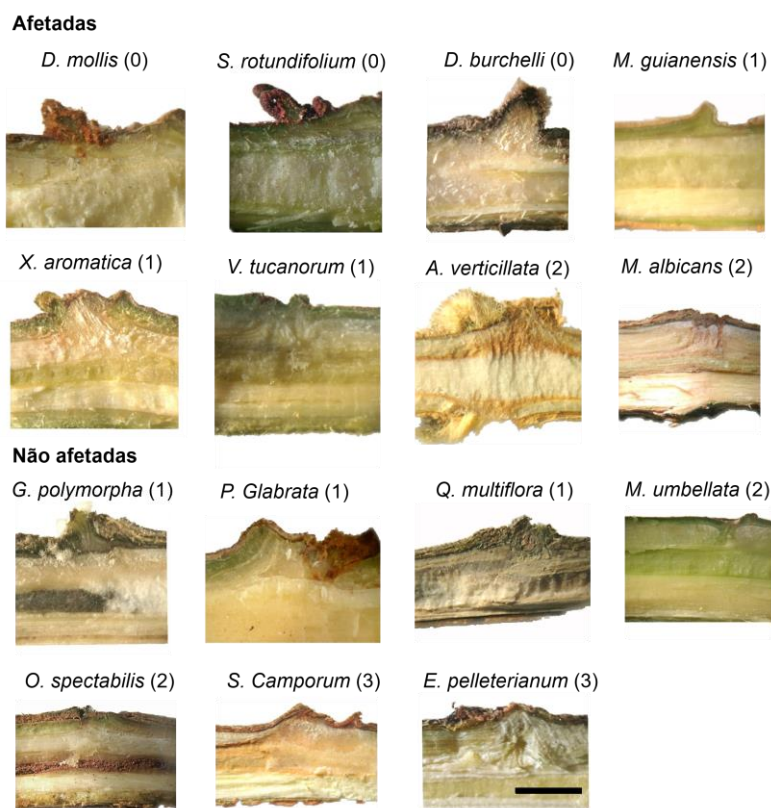


Figura 2. Gemas das espécies afetadas e não afetadas com suas respectivas classificações de acordo com o sistema semi-quantitativo adotado. Entre parênteses aparecem os números de acordo com a classificação (0,1,2 e 3). Aumento lupa Coleman 1x (10:1).

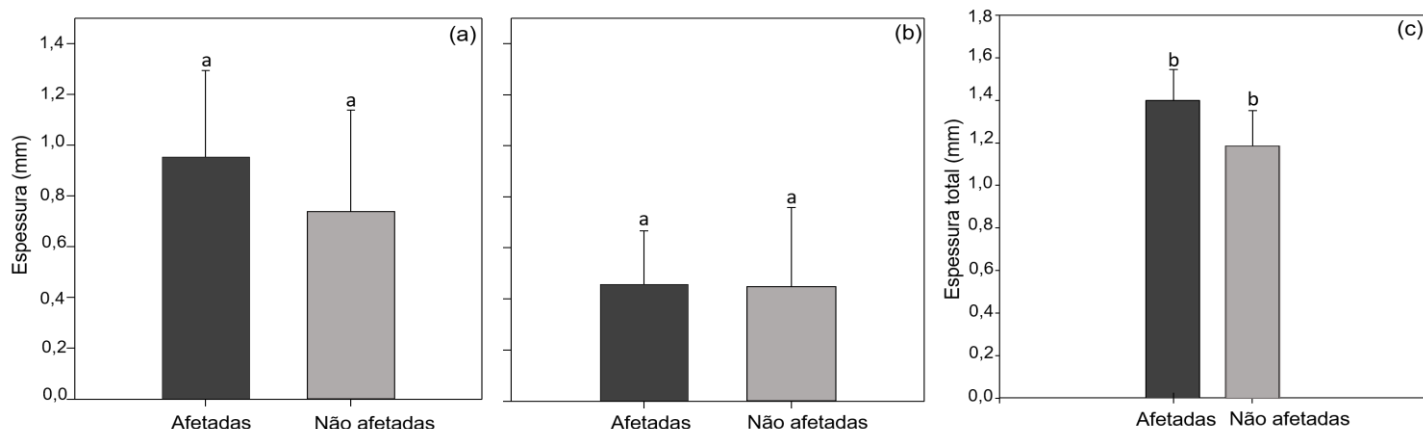


Figura 3. Valores médios para espessura da (a) casca interna (Teste t Student $t = 0,08$; $P = 0,94$), (b) externa (Teste t Student $t = 1,13$; $P = 0,28$) e (c) espessura total (Teste t Student $t = -0,85$; $P = 0,41$) em espécies afetadas e não afetadas. Barras indicam erro padrão da média.

As diferenças entre as espessuras absolutas da casca interna e externa não foram significativas ($t = 0,08$ $P = 0,94$ e $t = 1,13$, $P = 0,28$) (Figura 3a-b) com uma tendência de a casca ser mais espessa nas afetadas. A média da espessura total da casca (Figura 3c) foi ligeiramente maior para as espécies afetadas, porém não houveram diferenças estatísticas significativas ($t = -0,85$, $P = 0,41$).

Estratégias de rebrota das espécies após ocorrência da geada

A maioria das espécies (afetadas) rebrotou do tronco, principalmente quando o diâmetro a 30 cm do solo foi < 5 cm (Figura 4). Nas plantas com diâmetros > 5 cm ocorreram rebrotas do tronco, porém aumentaram as ocorrências de rebrota a partir dos ramos (Figura 4). *A. verticillata* com diâmetros < 5 cm apresentam rebrota principalmente do tronco; entretanto *D. mollis* e *D. burchellii*, independentemente do tamanho do diâmetro, rebrotam em maior parte do tronco (Figura 4a-c). No caso de *M. guianensis* não foi registrado diâmetro > 5 cm dentre os espécimes medidos e sua rebrota ocorreu principalmente do tronco (Figura 4e). Já *X. aromatica* apresentou

rebrotar principalmente do tronco salvo duas exceções em que foi registrado rebrota dos ramos juntamente com rebrota do tronco nos indivíduos de maior porte (Figura 4h).

M. albicans foi a única espécie que tem a rebrota do solo principalmente em plantas com diâmetros < 5cm (Figura 4). *S. rotundifolium* é a única espécie que apresenta duas respostas dependendo do diâmetro do seu tronco (Figura 4f): em diâmetros < 5cm a rebrota ocorre majoritariamente do tronco, já quando seu diâmetro > 5cm a rebrota acontece nos ramos. No caso de *V. tucanorum* tanto com diâmetro maiores ou menores 5 cm, sua rebrota ocorre a partir dos ramos (Figura 4g).

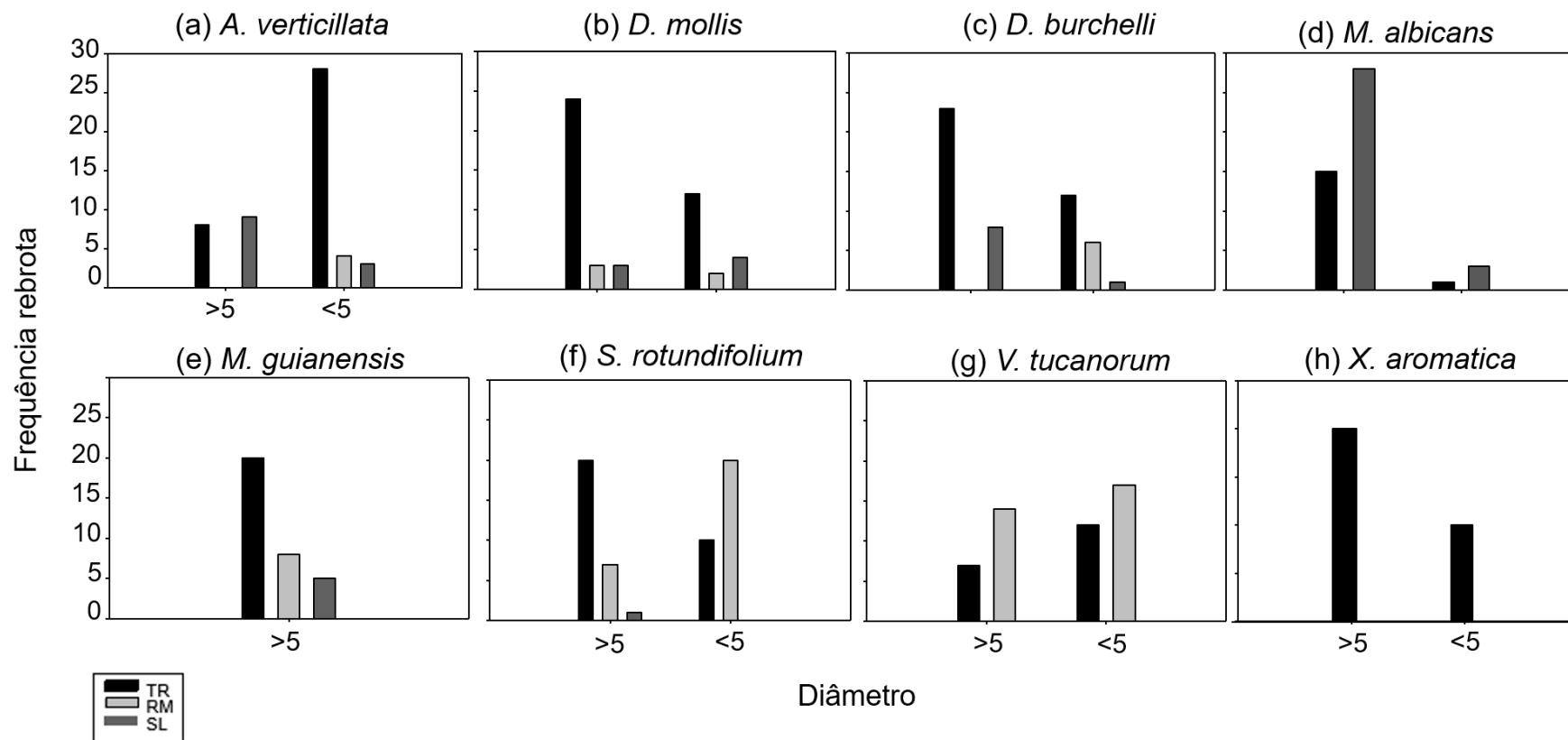


Figura 4. Frequência do local de rebrota das espécies afetadas a partir do diâmetro do tronco, estas medidas foram separadas em <5 (cm) ou >5 (cm), sendo TR (Tronco), RM (Ramos) e SL (Solo).

Discussão

Para avaliar os atributos selecionados neste trabalho, partimos da premissa de quais estratégias eram apresentadas para espécies do cerrado em relação ao fogo e com isso questionamos se estratégias como a proteção das gemas pela espessura da casca ajudaria na sobrevivência das plantas quando expostas as geadas. Nossos resultados demonstram que espécies afetadas e não afetadas divergem quanto a frequência de graus de proteção das gemas, como esperado inicialmente; porém não houve diferença estatística significativa da espessura da casca entre os grupos. Além disso, as espécies afetadas apresentaram diversas estratégias de rebrota.

Proteção de gemas e espessura de casca

Apesar de os dois grupos terem gemas tanto em posições com maior ou menor grau de proteção (Figura 1 e 2), o que pudemos constatar é que o grupo das espécies não afetadas não apresentou nenhuma espécie classificada na posição 0, ou seja, totalmente desprotegida. O mesmo ocorreu para o grupo das espécies que esperávamos teriam todas as gemas desprotegidas, algumas espécies apresentaram maior proteção de gema do que outras, entretanto também não houve nenhuma classificada na posição 3, isto é, totalmente protegidas (Figura 1 e 2). Alguns trabalhos têm demonstrado que espécies que possuem gemas do tipo 2-3 possuem alto grau de proteção para isolamento a altas temperaturas, podendo rebrotar facilmente após a passagem do fogo (Clarke *et al.* 2013; Charles-Dominique *et al.* 2015;). Apesar de algumas espécies não afetadas possuírem gemas do tipo 1, estas poderiam estar protegidas com primórdios foliares espessos e tomentosos, que poderiam isolar a gema das baixas temperaturas ocorrentes durante o fenômeno da geada (Damascos *et al.* 2005). Por exemplo, no trabalho publicado por Charles-Dominique *et al.* (2015), as espécies que possuem melhor desempenho em

ambientes propensos ao fogo, tiveram alta proteção de gemas e alta produção de casca, o que destaca a importância combinada da produção de casca e da localização das gemas para a persistência em ambientes propensos a incêndios.

Espécies resistentes ao fogo dependem da casca grossa para proteger seu sistema hidráulico e o câmbio vascular dos danos causados pelo fogo (Midgley *et al.* 2010, Clarke *et al.* 2013, Hoffmann *et al.* 2009; Lawes *et al.* 2013; Hempson *et al.* 2014; Pausas 2015), o que poderia também acontecer para o caso da geada. Como a posição das gemas de algumas espécies não afetadas pela geada, foram classificadas como desprotegidas (1) (Figura 1 e 2), a espessura da casca poderia ser o atributo que nos mostraria a diferença de estratégias entre os dois grupos, assim, a casca grossa forneceria primariamente proteção para o câmbio vascular, mas também protegeria as gemas do meristema lateral (Pausas 2015). Entretanto, não houve variação de espessura da casca externa entre os dois grupos (Figura 3b).

As espécies afetadas apresentaram média superior da espessura de casca interna (Figura 3a) que é composta por células vivas e tem um papel fundamental no armazenamento de água e fotossintatos (Romero 2014; Pausas 2015), porém sem diferença estatística significativa (Figura 3). Essa maior espessura da casca interna poderia favorecer a rebrota dessas espécies. Mesmo que as diferenças na espessura sejam pequenas, elas podem fornecer uma grande vantagem seletiva para árvores que, por exemplo, vivem sob regimes de fogo de baixa intensidade, aumentando a proteção dos ramos, ou até mesmo sua capacidade de rebrota após um dano (Lawes *et al.* 2011; Pausas 2015; Rosell 2016). Essa maior espessura, era esperada para o grupo das não afetadas, mas pode ser que este grupo possua outros atributos que não foram avaliados, como a densidade da casca, que em junção auxiliem estas espécies a suportarem este tipo de evento.

Respostas de rebrota

A posição das gemas e a espessura da casca podem não explicar sozinhas o porquê algumas espécies são afetadas e outras não, entretanto o que podemos observar é que as espécies dos dois grupos acabam, numa escala temporal maior, sendo tolerantes as geadas, somente com diferença na amplitude de tolerância a este determinado fator, pois as que perdem parte da biomassa aérea a recuperam por rebrota (afetadas) e permanecem no sistema, já aquelas que não sofrem nenhum tipo de dano demonstram tolerar as temperaturas a que foram expostas, ou seja, tem uma maior amplitude de tolerância (lei de Shelford) (Shelford 1911) do que o grupo das afetadas.

A rebrota é um atributo que confere persistência ao nível da planta, permitindo-lhe sobreviver a diversos regimes de perturbação. Para ser capaz de rebrotar após sofrer uma injúria a planta precisa proteger seus meristemas e possuir reservas para auxiliar o crescimento, além da alocação de recursos necessária devido ao *trade off* entre rebrotar ou reproduzir, pois o rebrote após a perda de biomassa, diz respeito à manutenção da geração atual, enquanto que a sementeira diz respeito à produção de futuras gerações. (Bellingham & Sparrow, 2000; Bond & Midgley, 2001).

Analizando as estratégias de rebrotas, verificamos que 1 ano após a geada a altura média dos indivíduos afetados caiu de 2,15 m para 1,36 m (Tabela S1). No trabalho de Brando & Durigan (2005) foram analisados os indivíduos do estrato superior e inferior de uma área de cerrado típico, sendo que a altura média dos indivíduos classificados no estrato superior caiu de 2,84 m para 0,99 m e do estrato inferior de 1,22 m para 0,68 m, o estrato superior recuperou 85% de sua cobertura original e 79% de sua altura anterior após 11 meses da ocorrência do fenômeno. Como observado por Filgueiras & Pereira (1987) e Brando & Durigan (2005), a comunidade

como um todo nos dois estudos recuperou rapidamente sua estrutura anterior através da rápida rebrota, no nosso caso a um nível de espécies pudemos observar o mesmo.

Segundo Clarke *et al.* (2013), espécies com proteção baixa e intermediária são propensas a brotar da base, fato que é demonstrado quando analisamos os casos de *S. rotundifolium*, *Dimorphandra mollis* e *Diospyros burchelli* (Tabela 2, Figura 4). Espécies que não possuem proteção das gemas apresentaram rebrote principalmente do tronco, pois, a geada muitas vezes não afeta o indivíduo por inteiro como o fogo, principalmente a parte basal do tronco, que seria então uma zona fora de dano dependendo do diâmetro e altura da espécie. Assim, certamente em razão de grande parte dos ramos terem sido afetados pela geada e suas gemas que poderiam auxiliar na rebrota não serem mais funcionais, a rebrota ocorreu em maior parte do tronco.

Vochsia tucanorum, possui proteção em grau 1, (Tabela 2, Figura 4) porém a maior parte da sua rebrota acontece a partir dos ramos, independente do diâmetro do tronco, o que também pode estar ligado a arquitetura e estrutura da sua copa que bem é formada e com maior quantidade de ramificações. Espécies como *D. mollis*, *D. burchelli* e *S. rotundifolium* possuem as gemas dos ramos expostas (Tabela 2, Figura 3), por isso essas espécies podem investir em outro tipo de rebrota que não seja pelas gemas das hastes, rebrotando da parte basal do tronco, exceto quando seus ramos possuem um diâmetro maior em que pode haver proteção do meristema possibilitando rebrote dos ramos. Como no caso de *S. rotundifolium* que em diâmetros <5 cm a rebrota a partir dos ramos tornou-se maior do que do tronco.

Implicações para a dinâmica da vegetação

Sabe-se que há um padrão mundial de aumento de temperatura, que poderia em algumas regiões levar a uma diminuição nos eventos anuais de geada (Rigby e

Porporato 2008). Porém, esses eventos climáticos têm se tornado cada vez mais variáveis, e poderão existir áreas que permanecerão frias o suficiente para que eventos como a geada ocorram frequentemente, expondo as vegetações ao um risco de dano (Inouye 2000; Agrawal *et al.* 2004). Se considerarmos que a geada é um indutor de distribuição das espécies de savanas (Hoffmann *et al.* 2019), mudanças mesmo que pequenas na ocorrência desta perturbação podem ter grandes impactos na estrutura da vegetação do cerrado típico (Brando & Durigan 2005; Holdo 2006, 2007; Whitecross *et al.* 2012). Por isso, devemos investir em estudos que agreguem mais conhecimento sobre os efeitos da geada sob as savanas.

Apesar da geada ser um evento meteorológico geograficamente restrito, sua ação ao longo dos anos em algumas regiões pode ser responsável por manter a fisionomia aberta do cerrado, ou seja, pode reforçar padrões espaciais na cobertura de árvores, porque o impacto da geada é maior quando a cobertura de árvores é menor. Assim em regiões onde as geadas são muito frequentes e opressivas pode ser o limite que as espécies de savana podem suportar (Hoffmann *et al.* 2019). Este pode ser um dos fatores que está mantendo a vegetação de Águas de Santa Bárbara com fisionomia de cerrado típico, pois, apesar de possuírem características que no caso do grupo das não afetadas as façam não sofrer com a geada e no caso das afetadas a conseguir permanecer no sistema por meio de investimento na rebrota, a frequência assídua deste evento faça com que as espécies de cerrado mantenham-se sempre pequenas no caso das lenhosas, dando espaço para espécies herbáceas e contribuindo para a manutenção da fisionomia savânica (Brando & Durigan 2005; Hoffmann *et al.* 2019). Adicionalmente, no caso das espécies afetadas que rebrotam frequentemente, se a geada ocorrer anualmente, algumas não seriam capazes de recuperar sua biomassa e seriam eliminadas do sistema. Ou seja, espécies não afetadas devem possuir mecanismos de resistência e evitação, pois

possuem atributos que reduzem o dano (Ver capítulo 2) e características que reduzem os impactos negativos dos danos (Agrawal *et al.* 2004), enquanto as espécies afetadas são tolerantes por possuírem características que as auxiliam na rebrota para manutenção da espécie no ambiente.

Conclusão

Nesse estudo, demonstramos que as espécies dos dois grupos funcionais de certo modo toleram a geada, entretanto, as espécies do grupo das afetadas são mais sensíveis e sofrem danos, por isso tem como resposta para permanecer no sistema a rebrota a partir de troncos ou ramos, dependendo do tamanho inicial do indivíduo. Como esperado, algumas estratégias diferem entre os grupos, como a posição das gemas, diferente da espessura da casca que não demonstrou diferença significativa entre os dois grupos. Essas características morfológicas permitem explicar as respostas ecológicas relatadas quando há acontecimento da geada.

Referências

- Abreu, R.C.R., Hoffmann, W.A., Vasconcelos, H.L., Pilon, N.A., Rossatto, D.R. & Durigan, G. (2017). The biodiversity cost of carbon sequestration in tropical savana. *Sci. Adv.*, 3, 1-7.
- Agrawal, A.A., Conner, J.K. & Stinchcombe, J.R. (2004). Evolution of plant resistance and tolerance to frost damage. *Ecol. Lett.*, 7, 1199–1208.
- Archibald, S. (2016). Managing the human component of fire regimes: lessons from Africa. *Phil. Trans. R. Soc.* 371. doi: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2015.0346>
- Bellingham, P.J. & Sparrow, A.D. (2000). Resprouting as a life history strategy in woody plant communities. *Oikos*, 89, 409–416.

- Bieras, A.C. & Sajo, M. das G. (2009). Leaf structure of the cerrado (Brazilian savanna) woody plants, *Trees*, 23, 451–471.
- Bond, W.J. & Midgley, J.J. (2001). Ecology of sprouting in woody plants: the persistence niche. *Trends Ecol. Evol.*, 16, 45–51.
- Brando, P.M. & Durigan, G. (2005). Changes in Cerrado Vegetation after Disturbance by Frost (São Paulo State, Brazil). *Plant Ecol.* 175, 205–215.
- Burrows, G.E., Hornby, S.K., Waters, D.A., Bellairs, S.M., Prior, L.D., Bowman, D.M.J.S. 2010. A wide diversity of epicormic structures is present in Myrtaceae species in the northern Australian savanna biome – implications for adaptation to fire. *Aust. J. Bot.* 58, 493–507.
- Chafota, J. & Owen-Smith, N. (2009). Episodic severe damage to canopy trees by elephants: interactions with fire, frost and rain. *J. Trop. Ecol.*, 25, 341.
- Charles-Dominique, T., Beckett, H., Midgley, G.F. & Bond, W.J. (2015). Bud protection: A key trait for species sorting in a forest-savanna mosaic. *New Phytol.*, 207, 1052–1060.
- Childes, S.L. & Walker, B.H. (1987). Ecology and dynamics of the woody vegetation on the Kalahari Sands in Hwange National Park, Zimbabwe. *Vegetatio*, 72, 111–128.
- Clarke, P.J., Lawes, M.J., Midgley, J.J., Lamont, B.B., Ojeda, F., Burrows, G.E., N. J. Enright, N.J. & Knox, K. J. E. (2013). Resprouting as a key functional trait: How buds, protection and resources drive persistence after fire. *New Phytol.*, 197, 19–35.
- Damascos, M.A., Prado, C.H.B.A. & Ronquim, C.C. (2005). Bud composition, branching patterns and leaf phenology in Cerrado woody species. *Ann. Bot.*, 96, 1075–1084.

- Enright, N.J., Fontaine, J.B., Westcott, V.C., Lade, J.C. & Miller, B.P. (2011). Fire interval effects on persistence of resprouter species in Mediterranean-type shrublands. *Plant Ecol.*, 212, 2071–2083.
- Esau, K. (1967). *Plant anatomy*, 2d ed. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Filgueiras T.S. & Pereira B.A.S. (1987). Efeito de uma geada sobre a flora do cerrado na Reserva Ecológica do IBGE, DF - Brasil. *Cadernos de Geociências* 2, 67-70.
- Finckh (2016). Letters Climate refugees going underground – a response to Maurin *et al.* (2014). *New Phytol.* 209, 904–909.
- Frost, P., Medina, E., Menaut, J.-C., Solbrig, O., Swift, M. & Walker, B. (1985). Responses of savannas to stress and disturbance. A Proposal for a collaborative Programme of Research. Report of a Workshop organized in collaboration with The Commission of European Communities (CEC). In: *Biology International*. 87.
- Grady, J.M. & Hoffmann, W. (2012). Caught in a fire trap: Recurring fire creates stable size equilibrium in woody resprouters. *Ecol.*, 93, 2052–2060.
- Hempson, G.P., Midgley, J.J., Lawes, M.J., Vickers, K.J. & Kruger, L.M. (2014). Comparing bark thickness: testing methods with bark – stem data from two South African fire-prone biomes. *J Veg. Sci.* 25, 1247–1256.
- Hoffmann, W.A. (1998). Post-burn reproduction of woody plants in a neotropical savanna the relative importance of sexual and vegetative reproduction. *J. Appl. Ecol.*, 35, 422-433.
- Hoffmann, W.A. & Moreira, A. (2002). The Role of Fire in Population Dynamics of Woody Plants. *The Plant Community*, 159-177.
- Hoffmann, W.A., Adasme, R., Haridasan, M., De Carvalho, M.T., Geiger, E.L. & Pereira, M.A.B.(2009). Tree topkill, not mortality, governs the dynamics of

- savanna-forest boundaries under frequent fire in central Brazil. *Ecology*, 90, 1326–1337.
- Hoffmann, W. A., Geiger, E.L., Gotsch, S.G., Rossatto, D.R., Silva, L.C.R., Lau, O.L., Haridasan, M. & Franco, A.C. (2012). Ecological thresholds at the savanna-forest boundary: how plant traits, resources and fire govern the distribution of tropical biomes. *Ecol. lett.*, 15, 759–768.
- Hoffmann, W.A., Flake, S.W., Abreu, R.C.R., Pilon, N.A.L., Rossatto, D.R. & Durigan, G. (2019). Rare frost events reinforce tropical savanna-forest boundaries. *J. Ecol.*, 1–10.
- Holdo, R.M. (2006). Tree growth in an African woodland savanna affected by disturbance. *J. Veg. Sci.*, 17, 369–378.
- Holdo, R.M. (2007). Elephants, Fire, and Frost Can Determine Community Structure and Composition in Kalahari Woodlands. *Ecol. Appl.*, 17, 558–568.
- ICMBIO. (2010). Plano de manejo da Estação ecológica de Assis, 171.
- Inouye, D.W. (2000). The ecological and evolutionary significance of frost in the context of climate change. *Ecol. Lett.*, 3, 457–463.
- Coutinho, L.M. (2002). *O Bioma Cerrado*. In: Klein, A.L. Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois. UNESP, Imprensa Oficial do Estado, São Paulo, 77–91.
- Lawes, M.J., Adie, H., Russell-Smith, J., Murphy, B. & Midgley, J.J. (2011). How do small savanna trees avoid stem mortality by fire the roles of stem diameter, height and bark thickness. *Ecosphere*, 2, 1–13.
- Lawes, M.J., Midgley, J.J. & Clarke, P.J. (2013). Costs and benefits of relative bark thickness in relation to fire damage: A savanna/forest contrast. *J. Ecol.*, 101, 517–524.

- Melo, A. C., G. Durigan, G. 2011. Plano de Manejo da Estação Ecológica de Santa Bárbara. São Paulo: Instituto Florestal. Disponível em :http://www.iflorestal.sp.gov.br/Plano_de_manejo/eec_santa_barbara/Plano_de_Manejo_EEc_Santa_Barbara.pdf .
- Midgley, J.J., Lawes, M.J. & Chamailí-Jammes, S. (2010). Turner review No. 19. Savanna woody plant dynamics: The role of fire and herbivory, separately and synergistically. *Aust. J. Bot.*, 58, 1–11.
- Miranda, A.C., Miranda, H.S., Fatima, I. De, Dias, O., Miranda, A.C. & Miranda, H.S. (1993). Soil and air temperatures during prescribed cerrado fires in Central Brazil, *J. Trop. Ecol.*, 9, 313–320.
- Miranda, H.S., Bustamante, M.M.C. & Miranda, A.C. (2002). *The Fire Factor*. In: The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna. Oliveira, P.S., Marquis, R.J. (eds.). Columbia University Press, New York, 51-68.
- Muller, K., O'Connor, T.G. & Henschel, J.R. (2016). Impact of a severe frost event in 2014 on woody vegetation within the Nama-Karoo and semi-arid savanna biomes of South Africa. *J. Arid Environ.*, 133, 112–121.
- O'Keefe, K., Nippert, J.B. & Swemmer, A.M. (2016). Savanna Tree Seedlings are Physiologically Tolerant to Nighttime Freeze Events. *Front. Plant Sci.*, 7, 1–13.
- Pausas, J.G. (2015). Bark thickness and fire regime. *Funct. Ecol.*, 29, 315–327.
- Pinheiro, E. da S. & Durigan, G. (2009). Dinâmica espaço-temporal (1962-2006) das fitofisionomias em unidade de conservação do Cerrado no sudeste do Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, 3, 441–454.
- Ratter J.A., Bridgewater S., Ribeiro J.F., Dias T.A.B. & Silva M.R. 2000. Distribuição das espécies lenhosas da fitofisionomia Cerrado sentido restrito nos estados

- compreendidos pelo bioma Cerrado. *Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer*, 5, 5–43
- Rigby, J.R. & Porporato, A. Spring frost risk in a changing climate. (2008). *Geophys. Res. Lett.*, 35, 1-5.
- Romero, C. (2014) *Bark: structure and functional ecology. Bark: Use, Management and Commerce in Africa* (eds A.B. Cunningham, B.M. Campell & M.K. Luckert). The New York Botanical Garden Press, Bronx.
- Rosell, J.A. (2016). Bark thickness across the angiosperms: More than just fire. *New Phytol.*, 211, 90–102.
- Rutherford, M.C., Mucina, L., Lötter, M.C., Bredenkamp, G.J., Smit, J.H.L., Scott-Shaw, C.R., Hoare, D.B., Goodman, P.S., Bezuidenhout, H., Scott, L., Ellis, F., Powrie, L.W., Siebert, F., Mostert, T.H., Henning, B.J., Venter, C.H., Camp, K.G.T., Siebert, S.J., Matthews, W.S., Burrows, J.E., Dobson, L., Van Rooyen, N., Schmidt, E., Winter, P.J.D., Du Preez, P.J., Ward, R.A., Williamson, S., Hurter, P.J.H. (2006). Savanna. In: Mucina, L., Rutherford, M.C. (Eds.), *The Vegetation of South Africa, Lesotho and Swaziland.*: Strelitzia, 19. South African National Biodiversity Institute, Pretoria, 439–489.
- Schubert, A.T., Nano, C.E.M., Clarke, P.J. & Lawes, M.J. (2016). Evidence for bark thickness as a fire-resistance trait from desert to savanna in fire-prone inland Australia. *Plant Ecol.*, 217, 683–696.
- Shelford, V. E. (1911). *Physiological animal geography*. Journal of Morphology, 22: 551-618. Re-editado, in: E. J. Kormondy (ed.) Readings in Ecology. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, E.U.A. (1965). p. 17-20.

- Silberbauer-Gottsberger, I., Morawetz, W. & Gottsberger, G. (1977). Frost damage of cerrado plants in Botucatu, Brazil, as related to the geographical distribution of the species. *Biotropica*, 9, 253–261.
- Vesk, P.A. & Westoby, M. (2004). By plants: the effects of modular organization sprouting. *Society*, 18, 939–945.
- Whitecross, M.A., Archibald, S. & Witkowski, E.T.F. (2012). Do freeze events create a demographic bottleneck for *Colophospermum mopane*. South African. *J. Bot.*, 83, 9–18.

Material suplementar

Tabela S1. Valores médios dos diâmetros de pré- e pós-gelada e altura média pré- e pós-gelada das espécies afetadas.

Espécies	Diâmetro pré-gelada	Diâmetro pós-gelada	Altura pré-gelada	Altura pós-gelada
<i>Aegiphila verticillata</i>	4.45 ± 0.65	2.0±0.29	2.31±0.30	2.42±0.31
<i>Dimorphandra mollis</i>	4.90±1.39	2.17±0.22	2.15±0.47	1.34±0.10
<i>Myrsine guianensis</i>	2.0±0.33	0.71±0.08	1.18±0.18	0.95±0.11
<i>Diospyros burchellii</i>	4.13±1.0	1.21±0.16	1.34±0.23	0.71±0.12
<i>Miconia albicans</i>	2.37±0.46	0.73±0.09	1.80±0.14	1.15±0.10
<i>Vochysia tucanorum</i>	5.50±1.29	1.56±0.01	3.36±0.56	1.77±0.01
<i>Stryphnodendron rotundifolium</i>	4.45±0.65	1.92±0.25	2.28±0.27	1.41±0.15
<i>Xylopia aromatica</i>	3.95±0.88	0.91±0.10	3.07±0.44	1.69±0.23

Capítulo II

Características morfo-fisiológicas foliares em espécies arbóreas do cerrado afetadas e não afetadas por baixas temperaturas



Introdução

O estresse causado pelas baixas temperaturas ambientais pode afetar o desenvolvimento e distribuição das plantas numa série de ecossistemas temperados e tropicais (Sakai & Larcher, 1987). Diferentes espécies ocorrendo em ecossistemas sujeitos à baixa temperatura podem diferir em suas tolerâncias às temperaturas de congelamento: à medida que as temperaturas declinam, com o aumento da latitude e altitude, a tolerância e resistência das plantas a geada e baixas temperaturas tendem a aumentar (Sakai & Larcher 1987; Bannister 2007; Duker *et al.* 2015). No Hemisfério Norte os eventos de geada e as temperaturas mínimas são mais opressivos do que no Hemisfério Sul, em grande parte porque as massas de terra não estão igualmente distribuídas entre os hemisférios e as massas terrestres do sul são protegidas pela alta capacidade de calor específico do mar, resultando em temperaturas menos extremas do que de regiões de clima temperado norte (Bannister 2007). No Hemisfério Sul, ocorrem geadas episódicas de até -10°C (Larcher 1995), em contraste, no Hemisfério Norte as temperaturas mínimas anuais podem oscilar entre -10°C e -40°C (Bannister 2007).

Apesar de não serem tão frequentes, eventos de geada ocorrem em sistemas tropicais, conseguindo afetar espécies e a vegetação especialmente em ambientes savânicos: autores como Whitecross *et al.* (2012), Duker *et al.* (2015), Maurin *et al.* (2014) e Finckh (2016) relataram os efeitos causados pelas geadas nas savanas africanas. Já no Brasil, Eiten (1972) cita a ocorrência de geadas em algumas regiões de cerrado e autores como Silberbauer-Gottsberger *et al.* (1977), Vuono *et al.* (1982), Filgueiras & Pereira (1987), Brando & Durigan (2005) e Hoffmann *et al.* (2019) mencionam as geadas como um fator determinante que pode restringir a distribuição de espécies lenhosas nas savanas brasileiras, por causar danos e mortalidade em algumas delas.

As plantas de regiões temperadas apresentam diferentes estratégias de tolerância e evitação para ajudá-las a superar os impactos dos eventos de congelamento, de forma que podem escapar ao congelamento de seus tecidos, ou até mesmo este pode não ocorrer, sendo tais estratégias dependentes da morfologia foliar adotada (Sakai & Larcher 1987). Espécies que ocorrem em habitats em que há ocorrência de geada podem migrar para outras áreas, em uma escala temporal geológica; entrar em estado de dormência para minimizar os danos, numa escala temporal mais curta ou adotar características fenológicas, morfológicas ou fisiológicas que conferem proteção e/ou tolerância às baixas temperaturas (Lambers *et al.* 2008; Carvalho 2012).

A percepção a baixas temperaturas geralmente leva à diversas mudanças no metabolismo das plantas, que podem incluir alterações desde nível celular, até o nível do indivíduo (Lambers *et al.* 2008; Silva *et al.* 2009; Whitecross *et al.* 2012). Ao nível celular, as espécies normalmente toleraram baixas temperaturas a partir do congelamento da água extracelular, o que impede a formação de gelo dentro das células, já que a água é retirada da célula tornando os solutos mais concentrados no citoplasma (Begon *et al.* 2007; Carvalho 2012). Em termos de órgãos, especialmente as folhas, normalmente as espécies apresentam uma morfologia foliar específica, com folhas espessas e que possuem uma área e forma foliares que diminuem sua exposição às baixas temperaturas (St-Clair *et al.* 2009).

Pouco se sabe sobre as estratégias das espécies vegetais de populações naturais das savanas brasileiras a baixas temperaturas. As informações conhecidas provem de trabalhos como Silberbauer-Gottsberger *et al.* (1977), Vuono *et al.* (1982), Filgueiras & Pereira (1987), Brando & Durigan (2005) e Hoffmann *et al.* (2019) que relatam a partir da observação em campo, quais espécies tiveram danos em suas partes aéreas. A partir destas observações pode-se deduzir que plantas afetadas e não afetadas por baixas

temperaturas ocorrem em ambiente de cerrado típico, observação a qual pressupõe que diferentes estratégias funcionais para sobreviver sob este efeito co-existem neste ambiente.

Para melhor compreendermos os efeitos das baixas temperaturas podemos manipular as temperaturas dos tecidos vivos e compreender mudanças fisiológicas, como por exemplo, a perda de capacidade fotossintética foliar, que pode levar a mortalidade (Rizza *et al.* 2001; Zulini *et al.* 2010). Como método para avaliação do dano ocasionado pelo congelamento, podemos utilizar a análise de fluorescência da clorofila (Baker 1991), empregada com sucesso para detectar os danos ocasionados pelo congelamento (Østrem *et al.* 2018), pois mede o desempenho do aparato fotossintético (PSII) nas plantas, empregando como parâmetro de fluorescência o $F_v:F_m$ que expressa o rendimento quântico máximo de PSII, e pode ser usado como indicador de estresse. Um declínio na relação $F_v:F_m$ é um indicador do dano fotoinibitório; assim valores de $F_v:F_m$ podem demonstrar em que temperatura os danos começam a aparecer dado a presença de um estresse (Baker 1991; Loik & Redar 2003).

Para investigar estratégias de espécies de cerrado típico frente a baixas temperaturas, neste capítulo analisamos e comparamos as características morfológicas foliares e danos do aparato fotossintético entre as espécies afetadas e não afetadas. Baseado nas observações de Brando & Durigan (2005), esperamos que espécies não afetadas pelas geadas mantenham seu desempenho fotossintético a baixas temperaturas, pois possuiriam folhas menores, mais circulares e mais espessas, estratégias morfológicas que protegem o sistema fotossintético contra baixas temperaturas. Esperamos também que temperaturas abaixo de 5°C irão afetar drasticamente o desempenho fotossintético de espécies afetadas pela geada, dado a mortalidade das folhas observada em campo (Ver capítulo 1 desta dissertação). Além disso, testamos se

as espécies possuem padrões semelhantes de atributos foliares que explicam sua capacidade foliar de tolerar/não tolerar baixas temperaturas.

Materiais e métodos

Área de estudo

O presente estudo foi realizado na Estação Ecológica de Assis (EEA) que ocupa terras do município de Assis, situado na região sudoeste do Estado de São Paulo, entre as coordenadas 22° 33'S e 22°38'S a 50° 21' e 50°24'O. Trata-se de uma zona de transição climática entre os tipos Cwa e Cfa, com estação seca ocorrente entre maio e setembro e estação chuvosa entre outubro e abril. Com área de 1.760,64 ha, a EEA preserva predominantemente vegetação de cerrado *lato sensu*, com uma amostra significativa do bioma Cerrado nas áreas limítrofes da face sul de sua área de domínio (ICMBIO 2010). A ocorrência de geadas na área é frequente, sendo relatada na literatura para esta área de estudo (Brando & Durigan 2005). No ano de 2016, ocorreram períodos de geada (observação pessoal).

Seleção de espécies

Baseando-se na literatura do efeito das geadas em plantas arbóreas de cerrado típico (Silberbauer-Gottsberger *et al.* 1977; Brando & Durigan 2005, Hofmann *et al.* 2019), e observações em campo, selecionamos 13 espécies (Tabela 1) que foram caracterizadas pelos autores em não afetadas (6) e afetadas (7) por este fenômeno. Nos trabalhos citados o efeito causado pela geada foi verificado a partir da classificação de graus de dano (ex: afetadas moderadamente, pouco afetadas, muito afetadas, etc), estando o grau relacionado a mortalidade de folhas e ramos nos indivíduos. Nós decidimos considerar espécies não afetadas aquelas que não apresentaram nenhum sinal

de queima/mortalidade de folhas e ramos, e afetadas aquelas que apresentaram mortalidade de ramos e de folhas logo após a geada. Algumas espécies não afetadas deste capítulo diferiram das espécies do mesmo grupo utilizadas no Capítulo I.

Tabela 1. Espécies arbóreas de cerrado típico não afetadas e afetadas pela geada escolhidas para este estudo e suas respectivas famílias.

Famílias	Espécies	Grupos funcionais
Primulaceae	<i>Myrsine umbellata</i> Mart.	Não afetada
Asteraceae	<i>Gochmatia polymorpha</i> (Less.) Cabrera	Não afetada
Malpighiaceae	<i>Byrsonima intermedia</i> A.Juss.	Não afetada
Peracaceae	<i>Pera glabrata</i> (Schott) Poepp. ex Baill.	Não afetada
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum pelleterianum</i> A.St.-Hil.	Não afetada
Ochnaceae	<i>Ouratea spectabilis</i> (Mart. ex Engl.) Engl.	Não afetada
Leguminosae	<i>Dimorphandra mollis</i> Benth.	Afetada
Leguminosae	<i>Stryphnodendron rotundifolium</i> Mart.	Afetada
Lamiaceae	<i>Aegiphila verticillata</i> Vell.	Afetada
Ebenaceae	<i>Diospyros burchellii</i> Hiern	Afetada
Melastomataceae	<i>Miconia albicans</i> (Sw.) Steud.	Afetada
Vochysiaceae	<i>Vochysia tucanorum</i> Mart.	Afetada
Annonaceae	<i>Xylopia aromatica</i> (Lam.) Mart.	Afetada

Atributos morfológicos foliares

Para caracterização dos atributos morfológicos foliares das espécies não afetadas e afetadas, 3 indivíduos de cada espécie foram selecionados na área de estudo. Nestes indivíduos, folhas sadias e totalmente expandidas do 3º ao 4º nó foram coletadas, os indivíduos que tiveram suas folhas coletados eram completamente sadios e sem sinal de danos por geada, tanto das espécies não afetadas como das afetadas. Utilizamos a

classificação afetadas e não afetadas somente como separação funcional, não havendo coleta de indivíduos com rebrota pós-geada. Estas folhas foram coletadas em campo, armazenadas em sacos de papel e processadas logo após a coleta. Foram determinados os seguintes atributos morfológicos foliares:

Espessura da folha, área foliar e dimensões foliares: A espessura foliar (em mm) foi tomada com o auxílio de um paquímetro digital (Vonder, 150 mm, resolução de 0,01 mm). As medidas foram tomadas em uma folha por indivíduo, durante o período da manhã. Esta mesma folha foi utilizada para determinação da área foliar total (em cm².) A área foliar total foi determinada utilizando-se um scanner de mesa de alta resolução (4800 x 9600dpi) e o software gratuito Image J. As determinações das dimensões foliares (largura e comprimento, em mm) foram realizadas nas imagens digitalizadas para obtenção da área foliar, utilizando-se o software gratuito Image J.

Área foliar específica: A área foliar específica (cm²g⁻¹) foi obtida pela razão entre a área da folha (limbo) e a massa seca, obtida após secagem das folhas em estufa, a 70°C por 3 dias, seguida de pesagem em balança de precisão ($\pm 0,0001$ g).

Índice de forma foliar: O índice de forma foliar (IFF) foi obtido a partir da razão entre o comprimento (mm) e a largura (mm) da folha (Martorell & Ezcurra 2007). Quanto mais próximo de 1, mais circular é a folha.

Atributos fisiológicos foliares

A capacidade de resistência foliar a geada (baixas temperaturas) foi determinada através de medidas da fluorescência da clorofila, utilizando um analisador portátil de

fluorescência (MINI-PAM II; Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Para esta análise foram coletadas 5 folhas de 3 indivíduos por espécie no dia 10 de julho de 2018 pela manhã. Essas folhas foram colocadas em sacos plásticos herméticos e levadas ao laboratório de Anatomia e Fisiologia Ecológica de Plantas da Unesp - Assis para triagem. Todos os sacos foram colocados no escuro para aclimação. Cada câmara incubadora (BOD) foi configurada para uma temperatura sendo elas 5°, 0°, -5° e -10°C. As folhas de cada espécie tinham seu Fv:Fm iniciais medidos e então eram acondicionadas uma a uma sob a prateleira da BOD (na ausência de luz) por um período de 6h, tendo depois sua fluorescência mensurada novamente para cálculo do Fv:Fm (Percival & Fraser 2001; Venn *et al.* 2013) (Figura 1), o tratamento foi repetido 3 vezes. Para controle, 3 folhas por espécie foram deixadas em temperatura ambiente (25°C) e no escuro. O Fv:Fm foi mensurado 30 min depois de deixarmos aclimatar no escuro e 6h depois (Figura 1). As medidas iniciais das folhas que foram para o tratamento e das folhas controle não diferiram e foram dentro do esperado para folhas saudáveis (Fv:Fm > 0,795; P > 0.25).

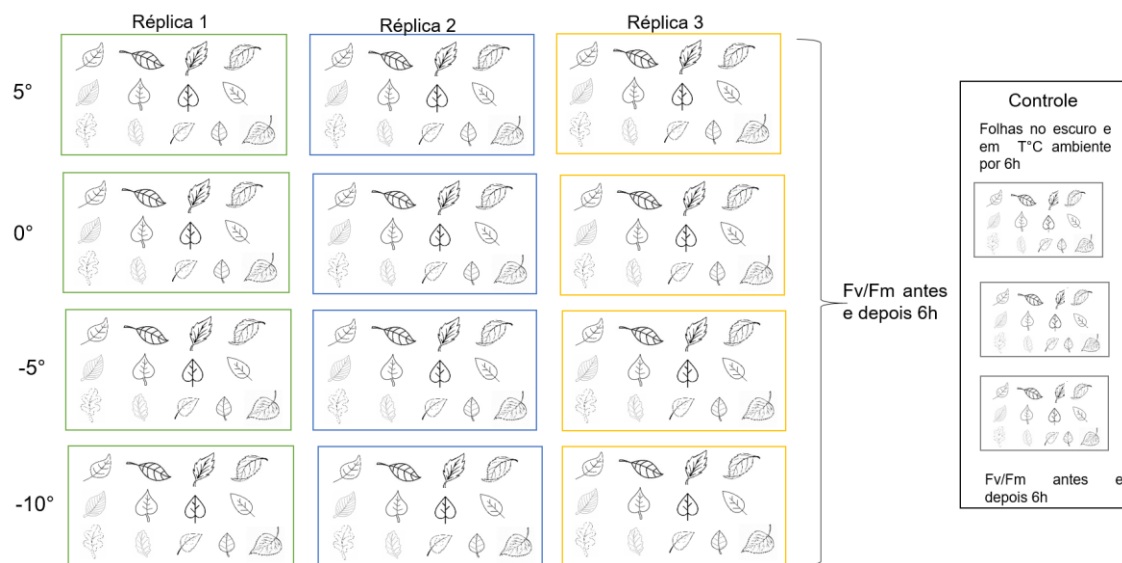


Figura 1. Esquema mostrando como foi realizado o tratamento das folhas para mensuração do Fv:Fm.

Análises estatísticas

Os atributos morfológicos foliares foram comparados utilizando um teste t para amostras independentes. As comparações dos valores de Fv:Fm para os diferentes tratamentos de temperatura (ambiente, 5°, 0° e -5° e -10°C) e para grau de tolerância das espécies (não afetadas e afetadas) foram realizadas através de uma ANOVA Fatorial, seguida de teste de Tukey. Foram calculadas as médias por espécie dos valores de Fv:Fm e separadas por grau de tolerância. Em todos os casos foi adotado um nível de significância de 5%.

Para descrever a síndrome de estratégias foliares das espécies não afetadas e afetadas, uma análise de componentes principais (PCA) foi feita utilizando o software PAST. Os dados referentes aos atributos morfológicos e fisiológicos coletados foram padronizados (transformação z) antes da análise. Foi utilizada a distância Euclidiana associada a matriz de variância-covariância (Gotelli & Ellison 2010).

Resultados

Atributos morfológicos

Os parâmetros morfológicos não diferiram ($P > 0.05$) entre os grupos de espécies estudadas (Figura 2). A espessura foliar das não afetadas foi 5,8% maior que das afetadas, enquanto o IFF, a AFE e AF foram respectivamente 33,6%, 19,2% e 29% maior do que as não afetadas (Figura 2)

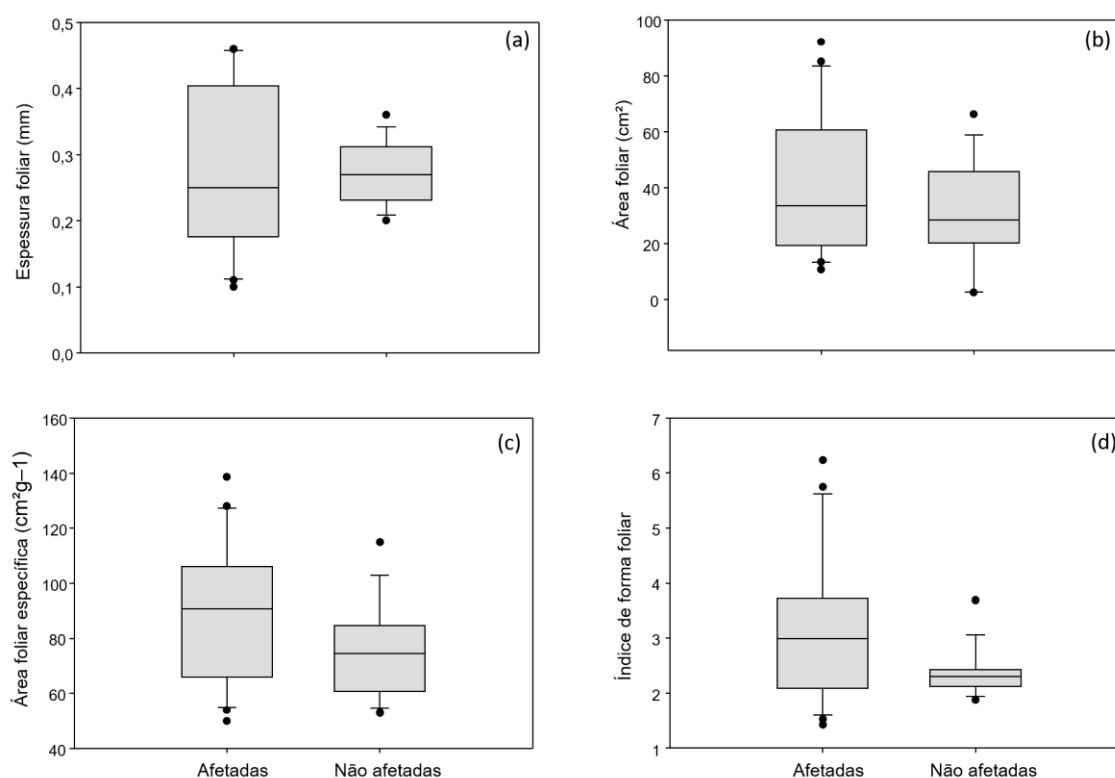


Figura 2. Valores médios para os atributos morfológicos estudados. (a) Espessura foliar; (b) Área foliar; (c) Área foliar específica; (d) Índice de forma foliar. Barras indicam erro padrão (n=15).

Respostas fisiológicas

Foi encontrada interação significativa entre os fatores grau de tolerância e temperatura (Tabela 2) para as espécies estudadas. Desconsiderando-se o efeito da interação entre temperatura e grau de tolerância, o valor médio do Fv:Fm do grupo das afetadas foi de 0,75 e do grupo das não afetadas foi de 0,832. Os resultados de Fv:Fm para as diferentes temperaturas para as espécies não afetadas se mantiveram constantes

ao longo da faixa de temperatura 5 a 0°C, tendo uma leve queda a -10°C (Figura 3). Já as espécies afetadas, tiveram valores de Fv:Fm sempre menores do que as não afetadas para uma mesma temperatura, sendo que a queda foi brusca entre a temperatura de -5 a -10°C (queda de 15%) (Figura 3)

Tabela 2. Resultados da ANOVA fatorial mostrando interação entre o grau de tolerância (afetada x não afetada) e a temperatura de tratamento (5°C, 0°C, -5°C e -10°C).

Efeito	gl	SQ	QM	F	P
Grau tolerância	1	0,865	0,865	203,68	<0,001
Temperatura	3	0,580	0,193	45,540	<0,001
Grau de tolerância x Temperatura*	3	0,198	0,0662	15,577	<0,001*
Resíduos	44	0,187	0,004		
Total	51	1,886	0,037		

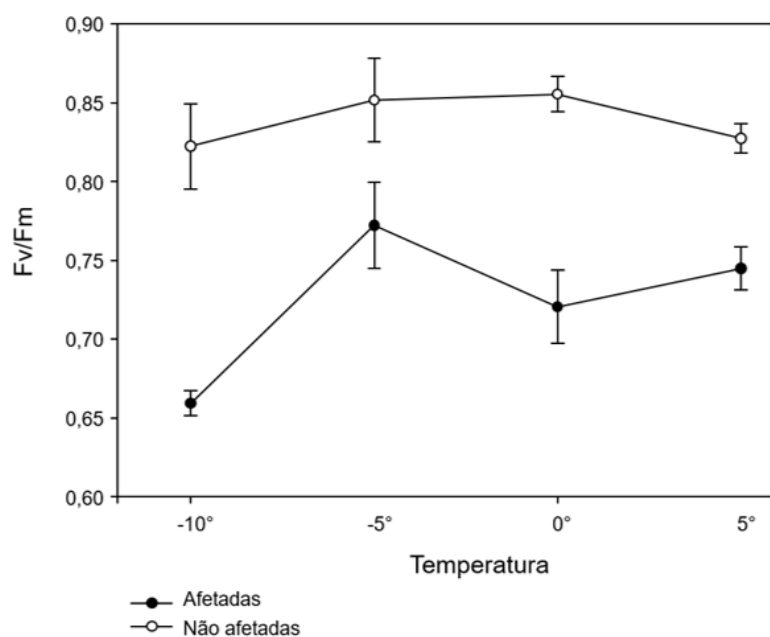


Figura 3. Valores de Fv:Fm de espécies arbóreas afetadas e não afetadas pela geada numa faixa de temperatura de 5 a -10°C.

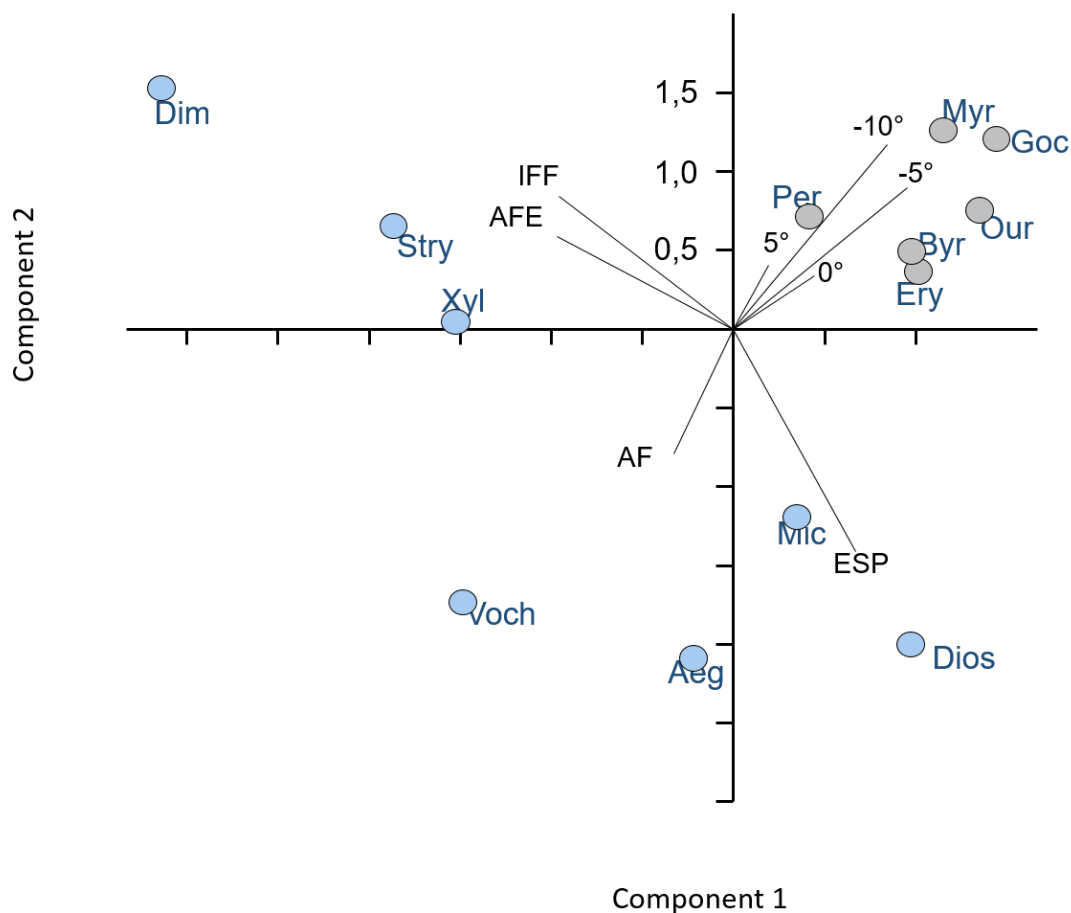


Figura 4. Análise de PCA utilizando 8 atributos foliares mostrando separação espacial das espécies afetadas (cinza claro) e não afetadas (cinza escuro) nos componentes 1 e 2. Dim: *Dimorphandra mollis*; Stry: *Stryphnodendron obovatum*; Xyl: *Xylopia aromatica*; Voch: *Vochysia tucanorum*; Aeg: *Aegiphila verticillata*; Mic: *Miconia albicans*; Dios: *Diospyros burchellii*; Per: *Pera glabrata*; Myr: *Myrsine umbellata*; Goc: *Gochnatia polymorpha*; Our: *Ouratea spectabilis*; Byr: *Byrsonima intermedia* e Ery: *Erythroxylum pelleteniarum*. ESP: espessura foliar; AFE: área foliar específica; AF: área foliar; IFF: índice de forma foliar;

Padrões funcionais de espécies afetadas e não afetadas

A análise de PCA mostrou os dois grupos de graus de tolerância (afetadas e não afetadas) em posições opostas no primeiro eixo do componente principal (Figura 4). O primeiro e segundo eixo do PCA explicaram, respectivamente, 53,17% e 25,25% da

variação nos 8 atributos foliares analisados. O primeiro eixo foi definido principalmente por características foliares ligadas aos valores de Fv:Fm sob as baixas temperaturas estudadas (-5°C e -10°C), de maneira oposta houveram atributos morfológicos, como AFE (-47%) e o índice de forma foliar (-46%) (Tabela S1). Atributos formando o primeiro eixo relacionados a capacidade fotossintética aumentaram da esquerda para a direita e as espécies não afetadas apareceram agrupadas no canto direito superior. Atributos como IFF e AFE aumentaram da direita para esquerda e três espécies afetadas foram influenciadas positivamente por esses atributos (Figura 4). O segundo eixo foi explicado pelas variáveis ligadas ao Fv:Fm a -10° e 5°C, sendo o IFF também importante para este eixo.

Discussão

Diferenças entre os atributos morfológicos

Presumimos que espécies afetadas pela geada possuem um aparato de estratégias morfológicas diferente daquelas que não sofrem danos com a geada. Ao avaliarmos atributos relacionados as folhas, como área foliar (AF), área foliar específica (AFE), índice de forma foliar (IFF) e a espessura da folha, não obtivemos resultados significativos. Apenas uma tendência de valores médios de AF, AFE e o IFF serem superiores nas espécies afetadas, o que não comprovaria nossa hipótese inicial de que espécies não afetadas teriam folhas mais grossas e com menor AFE.

O IFF foi mais próximo de 1 para o grupo das espécies não afetadas, tendo variando entre 2 e 7 para as espécies afetadas. O IFF é analisado entre valores de 1-8, sendo 1 as folhas mais amplas, ou seja, quanto mais próximo de 1 mais amplo o limbo da folha e quanto mais próximo de 8 ou acima deste valor mais estreita a folha (Martorell & Ezcurra 2007). Apesar de não haver diferença significativa na média do

IFF, folhas com maior IFF como no caso das não afetadas teriam maiores chances de sobreviver em ambientes com temperaturas mínimas, pois tenderiam a uma forma que não seria tão afetada por baixas temperatura (St.Clair *et al.* 2009), o que somado ao fato de terem uma menor AF, faria com que a área de exposição fosse menor, diminuindo o dano causado pelo frio (Körner *et al.* 1989).

Respostas fisiológicas a baixas temperaturas

A partir da mensuração da eficiência máxima de uso quântico do fotossistema II, observamos que as espécies não afetadas não sofrem danos no aparato fotossintético, em comparação com as afetadas, que sofrem. O grupo das não afetadas mostrou valores de Fv:Fm mais estáveis em relação aos tratamentos, não apresentando uma diminuição drástica na capacidade fotossintética como o grupo das afetadas, que ao serem colocadas nas temperaturas de 5°, 0°, -5° e -10°C tiveram seu aparato fotossintético danificado. Os valores de Fv:Fm diminuíram rapidamente chegando a valores abaixo de 0,700; o que seria considerado o normal para folhas saudáveis e não estressadas (Ehlert & Hinch 2008). Esses valores mostram que o sistema fotossintético foi danificado, o que poderia levar a consequente morte da folha nas espécies afetadas. Até mesmo no caso do tratamento a 5°C, que não seria uma temperatura que chegaria ao ponto de congelamento das células vegetais (0°C), essas espécies foram sensíveis e tiveram diminuições acentuadas nos seus valores de Fv:Fm. Estes resultados podem demonstrar que estas plantas não possuem mecanismos bioquímicos/fisiológicos para evitar a formação de cristais de gelo dentro de suas células, sendo mortas por temperaturas abaixo de 5°C (Sakai & Larcher 1987, Finckh 2016).

Sabe-se que as espécies do hemisfério norte podem ter resistências máximas de congelamento maiores do que as espécies hemisfério sul (Bannister 2007; Venn *et*

al.2013). Plantas de climas temperados e subtropicais evitam os danos causados pela geada frequentemente a partir da capacidade de se aclimatar a mudanças sazonais na temperatura mínima (Bannister 2007), isto pode ser por meio do super-resfriamento ou pelo acúmulo de várias proteínas e açúcares solúveis que podem diminuir a temperatura de congelamento das soluções dentro das folhas (Sakai & Larcher 1987; Ehlerlert & Hinch, 2008; Duker *et al.* 2015). Outra maneira que algumas espécies apresentam de evitar os danos da geada é o congelamento extracelular, ou seja, formação de gelo na superfície da célula ou entre o protoplasto e a parede celular, isto é, retirada de água da célula devido ao crescimento de cristais de gelo em sua superfície externa (Sakai & Larcher 1987). Tais estratégias são comumente relatadas para espécies de ambientes temperados e polares, no entanto se esses mecanismos a nível celular existem nas plantas do cerrado típico isso deve ainda ser alvo de estudos específicos. Algumas dessas estratégias podem estar sendo utilizadas pelas plantas não afetadas aqui avaliadas, pois os resultados demonstram que as espécies não afetadas têm um declínio no Fv:Fm somente a -10°C.

Durke *et al.* (2015) demonstraram que as espécies do bosque subtropical de Albany (África do Sul) foram particularmente intolerantes ao gelo, com declínios significativos na eficiência fotossintética como resultado da exposição ao congelamento (0°C), enquanto *Crassula muscosa* mostrou declínios importantes de Fv:Fm no tratamento de -10°C. Taschler & Neuner (2004) mostraram que arbustos alpinos tiveram uma resistência ao congelamento também raramente inferior a -10°C. Em Rizza *et al.* (2001) um tratamento de congelamento -10°C em aveia causou uma drástica diminuição no Fv:Fm, sendo este efeito irreversível durante a recuperação a 20/15° C. A temperatura de -10°C parece ser a temperatura limite para aquelas espécies que possuem mecanismos para não apresentar danos sob geadas.

Os dados aqui obtidos permitem demonstrar que as espécies dos dois grupos funcionais são afetadas de maneira diferente ao estresse por baixas temperaturas, fato que está relacionado a tolerância ao congelamento, que é um importante fator na distribuição geográfica das plantas de vegetações naturais (Sakai & Larcher 1987; Ehlerer & Hinch 2008). Atributos de resistência ou tolerância podem evoluir em resposta a qualquer estresse biótico ou abiótico. Atributos de resistência reduzem o nível de dano pelo estressor, enquanto os atributos de tolerância reduzem o impacto negativo de aptidão para uma dada quantidade de estresse (Agrawal *et al.* 2004). Para Taschler & Neuner (2004) sobreviver a geada pode ser mais complexo do que a resistir à geada, uma vez que sobreviver as geadas é co-determinado pelas propriedades que uma espécie possui para evitar os danos causados pela mesma. Por isso, as espécies não afetadas devem possuir mecanismos semelhantes de evitação ao congelamento como as espécies de sistemas temperados.

Separação funcional entre espécies afetadas e não afetadas

A análise de PCA separou claramente os dois grupos funcionais a partir dos parâmetros morfo-fisiológicos estudados: as espécies não afetadas foram posicionadas muito próximas umas das outras ao lado direito-acima do espaço bidimensional, enquanto as espécies afetadas foram posicionadas em regiões diferenciadas. Nossos dados sustentam a classificação feita a priori proposta por Brando & Durigan (2005) feita através de observações no campo. Os grupos funcionais afetadas e não afetadas realmente são distintos, apesar dos parâmetros morfológicos não terem sido tão importantes para esta separação como esperávamos. Os parâmetros que realmente diferenciaram essas espécies em grupos funcionais diferentes foram as respostas de funcionamento do fotossistema a baixas temperaturas.

Conclusão

Os dados aqui apresentados demonstram que não há aparente distinção morfológica entre espécies afetadas e não afetadas pela geada. Contudo, as espécies classificadas como afetadas tem quedas significativas no status do aparato fotossintético quando expostas as baixas temperaturas. A classificação a priori entre afetadas e não afetadas parece ser mais determinada por mecanismos fisiológicos e bioquímicos de proteção do aparato fotossintético do que estratégias morfológicas.

Referências

- Agrawal, A.A., Conner, J.K. & Stinchcombe, J.R. (2004). Evolution of plant resistance and tolerance to frost damage. *Ecol. Lett.*, 7, 1199–1208.
- Bannister, P. (2007). Godley review: A touch of frost? Cold hardiness of plants in the southern hemisphere. *New Zeal. J. Bot.*, 45, 1–33.
- Baker, N.R. (1991). A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiol. Plant*, 81, 563-570.
- Brando, P.M. & Durigan, G. (2005). Changes in Cerrado Vegetation after Disturbance by Frost (São Paulo State, Brazil). *Plant Ecol.*, 175, 205–215.
- Begon, M.; Harper, J. L. & Townsend, C.R. *Ecologia: de Indivíduos a Ecossistemas*. Artmed. Porto Alegre. p.752, 2007.
- Burke, M.J., Gusta, L. V, Quamme, H. Weiser, C.J. & Li, P.H. (1976). Freezing and Injury in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 27, 507–528.
- Duker, R., Cowling, R. M., du Preez, D. R., van der Vyver, M.L., Weatherall-Thomas, C. R. & Potts, A. J. (2015). Community-level assessment of freezing tolerance: Frost dictates the biome boundary between Albany subtropical thicket and Nama-Karoo in South Africa. *J. Biogeogr.*, 42, 167–178.

- Ehlert, B. & Hinch, D.K. (2008). Chlorophyll fluorescence imaging accurately quantifies freezing damage and cold acclimation responses in *Arabidopsis* leaves. *Plant Methods*, 4:12, 1–7. doi:10.1186/1746-4811-4-127, 1–7.
- Eiten, G. 1972. The cerrado vegetation of Brazil. *Bot. Rev.*, 38: 201-341.
- Finckh (2016). Letters: Climate refugees going underground – a response to Maurin *et al.* 2014. *New Phytol.*, 209: 904–909.
- Hoffmann, W.A., Flake, S.W., Abreu, R.C.R., Pilon, N.A.L., Rossatto, D.R. & Durigan, G. (2019). Rare frost events reinforce tropical savanna-forest boundaries. *J. Ecol.*, 1–10.
- ICMbio. (2010). Plano de manejo da Estação ecológica de Assis, 171.
- Inouye, D.W. (2000). The ecological and evolutionary significance of frost in the context of climate change. *Ecol. Lett.*, 3, 457–463.
- Lambers, H., Pons, T.L. & Chapin, F.S. (2008). *Plant Physiological Ecology*. 2° edição.
- Loik, M.E. & Redar, S.P. (2003). Microclimate, freezing tolerance, and cold acclimation along an elevation gradient for seedlings of the Great Basin Desert shrub, *Artemisia tridentata*. *J. Arid Environ.*, 54, 769–782.
- Körner, C., Neumayer M., Menendez-Riedl, S.P., Smeets-Scheel, A. (1989). Functional Morphology of Mountain Plants. *Flora*, 182, 353-383.
- Martorell, C. & Ezcurra, A.E. (2007). The narrow-leaf syndrome : a functional and evolutionary approach to the form of fog-harvesting rosette plants. *Oecologia*, 151, 561–573.
- Maurin, O., Davies, T.J., Burrows, J.E., Daru, B.H., Yessoufou, K., Muasya, A.M., van der Bank, M. & Bond, W.J. (2014). Savanna fire and the origins of the ‘underground forests’ of Africa. *New Phytol.*, 204, 201–214. doi: 10.1111/nph.12936

- Østrem, L., Folkestad, J., Solhaug, K.A. & Brandsæter, L.O. (2018). Frost tolerance, regeneration capacity after frost exposure and high photosystem II efficiency during winter and early spring support high winter survival in *Juncus* spp. *Weed Res.*, 58, 25–34.
- Percival, G.C. & Fraser, G.A. (2001). Measurement of the Salinity and Freezing Tolerance of *Crataegus* Genotypes Using Chlorophyll Fluorescence. *J. Arboric.*, 27, 233–245.
- Rizza, F., Pagani, D., Stanca, A.M., Cattivelli, L. (2001). Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats. *Plant Breed.*, 120, 389–396.
- Sakai, A. & Larcher, W. (1987). *Frost Survival of Plants: Responses and Adaptation to Freezing Stress*. Ecological Studies, 62. Springer-Verlag, New York, 1987.
- Silberbauer-Gottsberger, I., Morawetz, W. & Gottsberger, G. (1977). Frost damage of cerrado plants in Botucatu, Brazil, as related to the geographical distribution of the species. *Biotropica*, 9, 253–261.
- St. Clair, S. B., Monson, S. D., Smith, E. A., Cahill, D. G., & Calder, W. J. (2009). Altered leaf morphology, leaf resource dilution and defense chemistry induction in frost-defoliated aspen (*Populus tremuloides*). *Tree physiology* 29(10), 1259-1268.
- Taschler, D. & Neuner, G. (2004). Summer frost resistance and freezing patterns measured in situ in leaves of major alpine plant growth forms in relation to their upper distribution boundary. *Plant, Cell Environ.*, 27, 737–746.
- Venn, S.E., Morgan, J.W. & Lord, J.M. (2013). Foliar freezing resistance of Australian alpine plants over the growing season. *Austral Ecol.*, 38, 152–161.

- Vuono Y.S., Barbosa, L.M., Batista, E.A. & Gurgel Filho, O.A. (1982). Efeitos biológicos da geada na vegetação do cerrado. *Silvicultura em São Paulo* 16, 545–547.
- Whitecross, M.A., Archibald, S. & Witkowski, E.T.F. (2012). Do freeze events create a demographic bottleneck for *Colophospermum mopane*? *South African J. Bot.*, 83, 9–18.
- Zulini, L.U.C.A., Fischer, C. & Bertamini, M. (2010). Chlorophyll fluorescence as a tool for evaluation of viability in freeze-stressed grapevine buds. *Photosynthetica*, 48, 317-319.

Material Suplementar

Tabela S1. Valores das variáveis nos eixos 1,2 e 3 obtidas a partir da análise de PCA.

ESP: Espessura foliar; IFF: Índice de forma foliar; AFE: Área foliar específica; AF: Área foliar.

Variáveis	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3
ESP	0,3247	-0,5702	-0,2375
IFF	-0,4645	0,3408	0,02873
AFE	-0,4686	0,2384	-0,126
AF	-0,1583	-0,3194	0,9183
Fv:Fm 5°	0,0941	0,1639	0,1343
Fv:Fm 0°	0,2137	0,1357	0,06857
Fv:Fm -5°	0,4616	0,3623	0,1528
Fv:Fm -10°	0,4081	0,4726	0,1935

Capítulo III

Are fire protection strategies important under lower temperatures? An analysis of bud protection and bark properties in Neotropical savanna trees



Summary

- The majority of Neotropical savanna species are expected to display protected buds and thicker bark in their branches, which are considered important strategies to either, isolate the internal living tissues over lethal temperatures during fire events, and to promote promptly resprouting after fire. Such strategies may also be important to determine the persistence of savanna species in regions where low temperatures and frost events are recurrent.
- Here we described bud protection and bark strategies of 53 woody species growing in a typical savanna vegetation of central Brazil. In addition, we used an experimental approach exposing branches to 0°C to measure the temperature variation in internal branch tissue and test its relationship with bud protection and bark properties.
- We found that the majority of species (67%) showed medium to high protection against extreme temperatures; however, the degree of bud protection was not clearly related to bark properties, such as bark thickness and density. Bark density is a fundamental trait in determining protection against low temperatures (0°C), since species with low bark density showed the lower temperature variation in their internal branch tissues (21°C), despite the degree of bud protection.
- Bark properties and bud protection are two different (albeit related) strategies to the protection and persistence of savanna trees under extreme environmental temperatures and can explain ecological observations related to savanna trees responses after frost events.

Introduction

The most important plant strategies to persist in fire prone environments are those related to branch properties, which are necessary to isolate tissues and buds from the high temperatures occurring during fire passage (Bond & Midgley 2001; Lawes et al. 2011). The presence of a thick bark is of fundamental importance to insulate tissues such as parenchyma and vascular tissues (Lawes et al. 2011), and protected buds allows plants to promptly resprout and recover their lost biomass after fire (Charles-Dominique et al. 2015). Plant species with thinner bark have higher risk to have their stems and branches dying after being exposed to elevated temperatures (Hoffmann et al. 2009; Charles – Dominique et al. 2015) and, with exposed buds, plants may lose their capacity to resprout, thus having their persistence affected (Lawes et al. 2011; Pausas et al. 2017).

Additionally to bark thickness, bark density is reported as a major determinant of thermal insulation in plants (Van Mantgem & Schwartz 2003; Bauer et al. 2010; Clarke et al. 2013). Experimental approaches showed that bark density can determine the degree of thermal insulation because lower bark density reflects in lower thermal conductivity, consequently leading to a higher thermal insulation capacity (Bauer et al. 2010; Moreschi 2012). Under elevated temperatures, plants with soft bark would have less chance to die in comparison with species with denser bark (Bauer et al. 2010), mainly because their internal branch tissues will be protected against lethal temperatures. Despite much focus has been to the role of bark thickness and density to protect plants against high temperatures, the bark insulating capacity must be of outmost importance under extreme lower temperatures, since thicker and softer bark is also found in woody plants subjected to frost (Van Mantgem & Schwartz 2003; Bannister 2007). Therefore, it is necessary to consider the thermal and structural properties of the

bark, as well strategies for bud protection, to characterize plant survival and recover capacity under extreme high and low temperatures (Kramer 1994).

Similarly to fire, chilling and frost are relatively frequent disturbance that act damaging and killing above-ground plant tissues and organs, such as leaves, branches and stems, especially in the Southern Hemisphere (Bannister 2007). To persist under such conditions, plants subjected to low temperatures can enter dormancy to minimize damage, or display certain morphological and physiological traits that can confer protection and tolerance to this factor (Sakai & Larcher 1987). Frost is an important feature to determine plant functioning and vegetation structure in polar regions (Fernández-Palacios & Nicolás 1995). However, some tropical biomes may also be exposed to frost when occurring at high elevation or at high latitudes in the southern limits of the tropics (Silberbauer-Gottsberger et al. 1977; Vuono et al. 1982; Childes & Walker 1987; Filgueiras & Pereira 1987; Bannister 2007). In tropical plants, frost damage prevail because their tissues and organs are easily injured by chilling (Lyons 1973; Burke et al. 1976) and plants cannot survive temperatures near or below 0°C (Sakai & Larcher 1987). Although not expected, many reports of frost damages in tropical plants can be commonly found in the literature (Silberbauer- Gottsberger et al. 1977; Childes and Walker 1987; Inouye 2000; Brando & Durigan 2005; Hoffmann et al. 2019).

In its wide distribution along the Brazilian territory, the savannas of Brazil (The Cerrado) can be exposed to frost and low temperatures (0-10°C) at high altitudes (Filgueiras & Pereira 1987) and in the southern limit of its distribution (Silberbauer-Gottsberger et al. 1977; Hoffmann et al. 2019). Frost can be considered a recurrent event in southern Brazilian savannas, occurring almost annually, but with a very low intensity. In turn, severe frost events are less frequent, occurring every 25 years on

average (Brando & Durigan 2005; Hoffmann et al. 2019), but affecting a much larger area, and potentially achieving even the savannas in the central region of Brazil (Filgueiras & Pereira 1987). Fire is considered the main driver of plant persistence in savanna environments (Staver et al. 2011), however lower temperatures may reinforce the dynamics imposed by fire, since frost injuries share important features with fire and herbivore damage (Hoffmann et al. 2019), especially concerning the death of internal stem, branch tissues and leaves (Brando & Durigan 2005), which affects plant resprout and growth (Hoffmann et al. 2019).

Evaluating plant traits related to species persistence is important to understand how tropical savanna species will respond under lower temperatures, which would also have consequences to species occurrence and vegetation changes in a geographical scale in a scenario of climatic change (Hoffmann et al. 2019). In this study, we aimed to evaluate the role of bud position and bark properties in 53 woody savanna species experiencing low temperatures. First, we analyzed the frequency of bud protection in savanna tree species and used the degree of bud protection (high, medium, low) to test for differences in bark thickness and density. Secondly, we experimentally evaluated the role of bark thickness and density in insulating internal branches tissues at low temperatures (0°C). We hypothesized that strategies related to persistence under fire, such as thicker and softer bark, are related to higher bud protection and would affect resistance of savanna plants under extreme low temperatures. Specifically, we expected to find a positive relationship between bark thickness and the degree of bud protection, so that species that invest in building thicker barks will also have more protected buds. We also expected to find a positive relationship between bark density and internal tissue temperature variation, meaning that species with softer barks will show lower temperature variation in internal branch tissues.

Materials and Methods

Study site

This study was conducted at the IBGE Ecological Reserve, located 33 km south of Brasília in Central Brazil (15°56'S, 47°53'W). The reserve occurs at an average altitude of 1100m. The predominant soils at the study site are deep well drained Oxisols and the average annual precipitation is approximately 1500 mm, with a pronounced dry season spanning from May to September. Mean monthly temperatures ranges from 19 to 23°C throughout the year. Lower temperatures appear during the dry season, especially during May, June and July (Figure 1), where air temperature can reach as low as 2-9°C (IBGE meteorological station, data from 1980-2014 obtained at <https://recor.org.br/pesquisas-cientificas/estrutura-parapesquisa/estacaometeorologica/>). The last severe frost event in the region was reported by Filgueiras and Pereira (1987), where temperatures in that year dropped below 0°C. In the past 25 years, 21 events of low (2-8°C) temperatures were registered in the area (Figure 1).

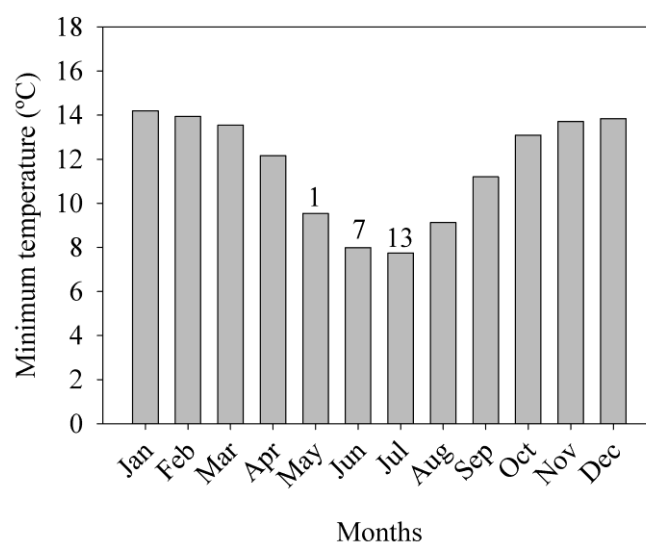


Figure 1. Distribution of average minimum temperatures along the year for a period of 25 years (1980-2014) in the IBGE ecological reserve. Numbers above bars indicate the number of days in which the temperature dropped below 5°C during 1980-2014.

Species selection

In November 2017, during the wet season, we randomly sampled 53 tree species from different families (Supplementary Material, Table S1) occurring at a typical savanna vegetation (cerrado *sensu stricto*), in a radius of 100 m around the coordinate point 15°57'27.77'S and 47°52'51.69''W. Our selection included species with a variety of strategies regarding bud protection and bark thickness.

Describing bud protection and branch bark properties

To describe the degree of bud protection on branches of the studied species, we collected one branch (approximately 40 ± 2.3 cm in length and 2.95 ± 0.3 cm in diameter) from three individuals of each species. The sampled branches were completely healthy, without any signs of fire damage or herbivory and were located at the canopy periphery. Branches collected on the field were stored in black bags and brought to the laboratory, where we used pruning shears to cut branch pieces of 5 cm length. To determine the degree of bud protection we used the semi-quantitative categories proposed by Charles-Dominique et al. (2015): 0 for completely exposed buds; 1 for emerging buds with protected meristem; 2 for buds inside bark depressions; and 3 for buds completely protected. Bud position was checked in transversal cuts of branches on a stereomicroscope at a 0.7x magnification (Bel Photonics, Model SZ-B).

To determine branch bark properties, we cut pieces of branches of similar size and diameter (approximately 5 cm length and 1.8 cm diameter) and measured inner and outer bark thickness using a digital caliper (0.001 mm resolution), following definitions adopted by Hoffmann et al. (2009). After bark thickness determination, a piece of bark was stripped from the branch and its fresh volume was determined in a graduate beaker using the water displacement method (Smith 1954). The sample was oven-dried and

weighed on an analytic scale to calculate bark density (i.e., the ratio of fresh bark volume and bark dry weight, g.cm^{-3}). For this analysis, we used only the outer bark.

Exposing branches to low temperatures

We used a drilling machine (1-millimeter drill bit) to drill a hole in the central part of the branches. In this hole, thermocouples (copper-constantan, T-type thermocouples) were attached and isolated from the exterior to monitor the internal branch temperature. The branches were exposed to ambient temperature (25°C) for 3 hours previously to the experiment start. The initial temperature (T_i) was measured ($24.6 \pm 0.50^{\circ}\text{C}$) before the branches were exposed to $0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ in a BOD chamber (Eletrolab, Model EL202/4LED). After 1 hour in the chamber under low temperature, the final temperature (T_f) reached was recorded (T_f). Temperature (T_i and T_f) was measured using a data logger (Omega, Model HH506RA) and T_f and T_i were used to quantify the degree of temperature change ($\Delta T = T_f - T_i$).

Statistical analysis

To test for differences in bark thickness and density among the distinct bud protection categories we used analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher LSD test. To test for the effects of bud protection in bark properties, and to check the relationship between inner and outer bark thickness and bark density to the degree of bud protection, we performed a Spearman rank order classification test. To determine the effect of inner and outer bark thickness and bark density in the temperature variation we used non-linear regression. For all analyses, differences were considered significant when $\alpha \leq 0.05$. Data was checked for normality and homogeneity of variances, and

$\log_{10}$ transformation was used when necessary. All analysis were performed using R software version 3.4.4 (R Core Team 2018).

Results

Bud protection

From the 53 woody species analyzed, the majority (67.30%) showed medium to high bud protection (categories 2 and 3, Figure 2, Table S1 Supplementary Material). Thirteen species showed buds emerging from the stem surface, i.e. low bud protection (category 1), while only four out of the 53 species showed buds at the bark surface, with completely exposed buds.

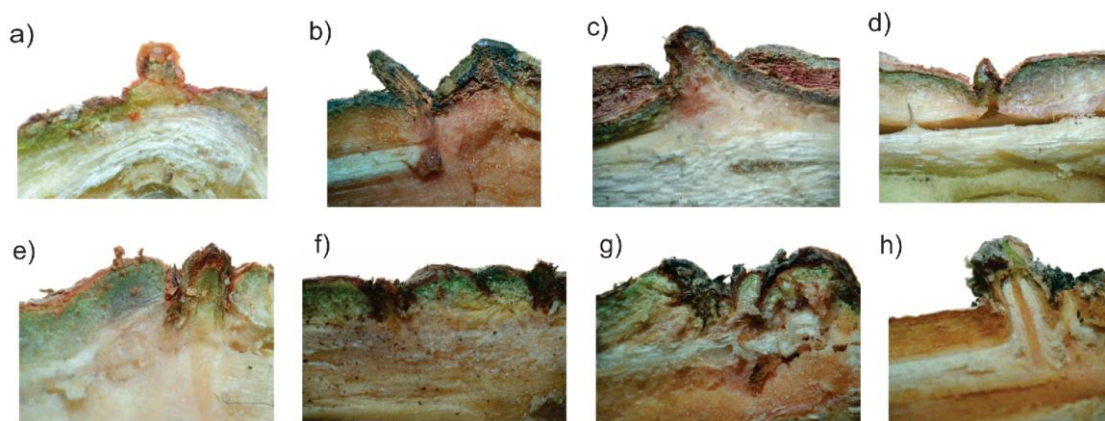


Figure 2. Accessory buds of 8 out of the 53 Cerrado species used in this study (bud protection category): a) *Symplocos rhamnifolia* (0); b) *Miconia ferruginata* (0); c) *Enterolobium gumminiferum* (1); d) *Caryocar brasiliense* (1); e) *Byrsonima coccolobifolia* (2); f) *Byrsonima crassa* (2); g) *Byrsonima verbascifolia* (3) and h) *Erythroxylum suberosum* (3)

Bark properties

We did not find differences in thickness of inner ($F_{3,49} = 1.48$; $P = 0.231$, Figure 3A) or outer ($F_{3,49} = 0.32$; $P = 0.810$) bark layer, according with the bud protection

degree (Figure 3B). However, species with unprotected buds showed higher bark density (F_{3,49} = 3.20; *P* = 0.31; Figure 3C). We did not find any relationship between bud protection and inner (*r* = 0.061; *P* > 0.05) or outer bark thickness (*r* = 0.021; *P* > 0.05; Figure 4). Bark density was also not related to bud protection category (*r* = -0.081; *P* > 0.05; Figure 4).

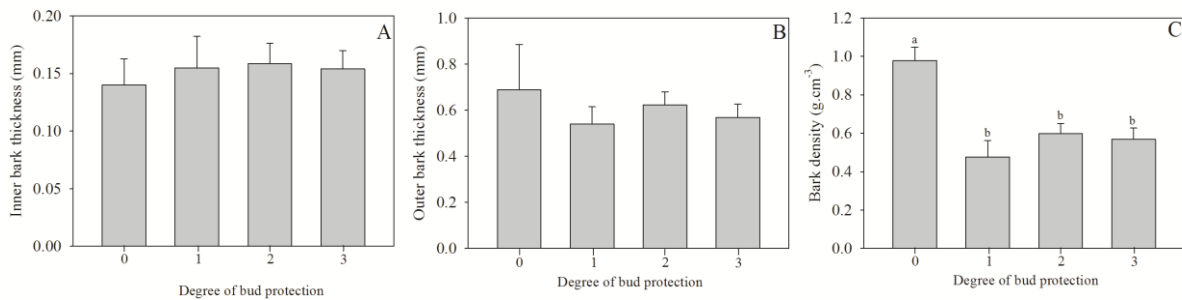


Figure 3. Comparison between species with different bud protection strategies for inner (A) and outer (B) bark thickness, and for bark density (C). Bark protection increases from 0 to 3. Vertical bars indicate standard error (number of species: 0 = 3; 1 = 10; 2 = 21 and 3 = 19). Means denoted by different letter are significantly different according to Fisher LSD test (*P* < 0.05).

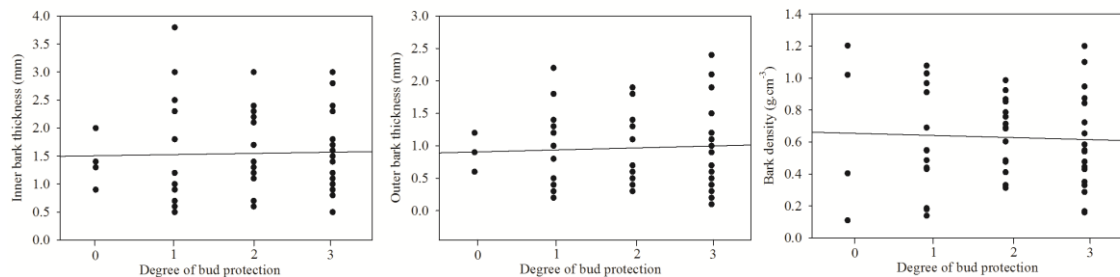


Figure 4. The lack of relationship between the degree of bud protection and measured bark properties in branches of woody species from the Brazilian Cerrado in Brasília – DF.

Bark properties and temperature variation

Branches acclimated to the ambient temperature showed initial temperatures around 25°C, however, after the 1-hour period exposed to 0°C, the temperature variation (ΔT) inside the branches ranged between 21 to 25 °C (Figure 5), with no significant differences between the groups with different bud protection strategies ($F_{3,49} = 1.64$; $P = 0.1922$). While we did not find any significant relationship between temperature variation and inner or outer bark thickness ($r^2 < 0.02$; $P > 0.30$ for all comparisons), temperature variation was positively related with bark density ($r^2 = 0.497$; $P < 0.001$) (i.e., species with denser bark showed higher temperature variation; Figure 5). Even though, plants with different strategies of bud protection showed diverse responses regarding branch temperature variation ($r = -0.085$; $P > 0.05$), three of the four species showing unprotected buds had high bark density and consequently higher temperature variation (Figure 6).

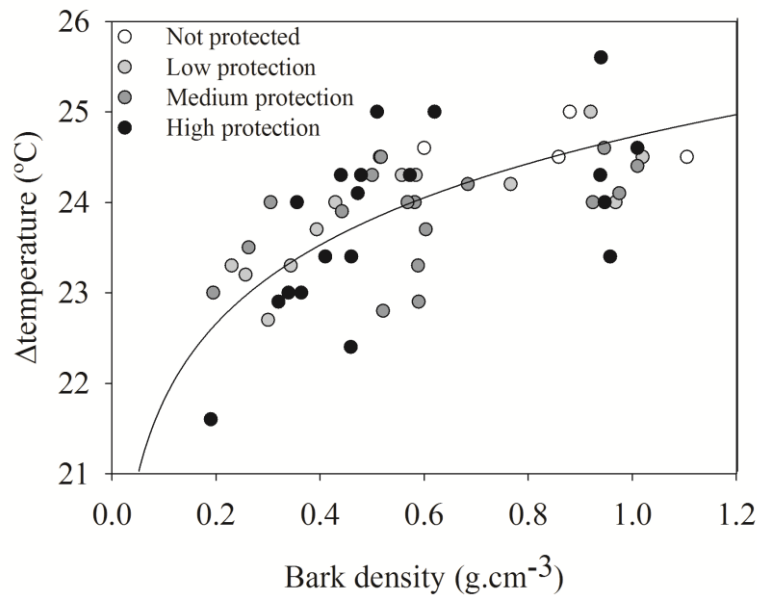


Figure 5. Influence of bark density on thermal insulation of branches ($y = 24.69x^{0.054}$). Each point represents the average value for a studied species. Points with different colors indicate different degree of bud protection. $\Delta\text{temperature} = t_{\text{final}} - t_{\text{initial}}$.

Discussion

The majority of Neotropical savanna woody species studied here show medium to high degree of bud protection. However, contrary to our expectations, bark properties were unrelated to bud position. We found a clear and positive relationship between bark density and the temperature variation of internal branch tissue, which was again unrelated to bud position. Our results suggest that irrespective of bud protection strategy, branch bark density may be the main factor determining the degree of insulation of internal branch tissues at lower temperatures and that bark density and bud protection are complementary strategies to survive and persist, respectively, under disturbances such as fire and frost events.

Degree of bud protection and bark properties

The proportion of species with medium to high bud protection we found (67%) was higher in comparison with a study performed in a savanna community sampled in Africa (42%) (Charles-Dominique et al. 2015). Species with unprotected buds were more commonly found in Africa (20%) than in Brazil (7%). The higher proportion of species showing medium to high bud protection should be related to the fire frequency history of Neotropical savannas, which are reported to be more frequent than in African savannas (Lehmann et al. 2014).

The degree of bud protection at branch level seems to be unrelated to branch bark properties, as we did not find any significant difference, neither a relationship, between inner and outer bark thickness across the different bud protection strategies. In fact, bud protection should be a strategy more important to resprout and recover biomass after fire passage than protect the internal branch tissues (Hoffmann et al. 2009). Resprouting will only occur if branch tissues are not damaged (Palacio et al. 2015), especially the

vascular tissues that are responsible to translocate carbohydrates stored in subterranean systems and provide the energy necessary to vigorously resprout and also the buds (Malason & Trabaud 1987; de Moraes et al. 2016). Only when buds are completely covered by the outer bark (i.e., category 3), a tight relationship between bark thickness and bud protection should be expected, since the extra tissue layer of inner and outer bark should better isolate the buds from external temperatures (Hoffmann et al. 2009; Lawes et al. 2011).

Bark properties and low temperatures

Contradicting our expectations, species with more protected buds did not always show thicker and less dense bark (Figures 3 and 4). Bark thickness and density in branches should be important to protect parenchyma and conductive tissues, which are critical to water and carbohydrates translocation that supply buds and allow them to resprout and develop (Wenger 1953; Del Tredici 2001). The size of a tree or branch are important in determining protection against frost (Whitecross et al. 2012), given size should strongly affect the thermal mass, bark thickness (Rosell 2016) and changes in internal tissue temperature (Hengst & Dawson 1994). However, for a similar branch size among species, we found that bark density should be the most important driver of branch protection under low temperatures in the Cerrado.

Brando & Durigan (2005) found that the Cerrado species *Stryphnodendron* sp. and *Dimorphandra mollis* were the most affected species by frost, showing high branch mortality. Curiously, in our study, these were the two species with the highest internal branch temperature variation and with the denser bark (Table S1, Supplementary material). In contrast, species that did not show branch mortality in Brando & Durigan (2005) study (e.g., *Styrax* sp. and *Erythroxylum* sp.) were considered the most tolerant

species, and our data for bark density confirms this ecological observation, because these species have barks with lower density and lower temperature variation. For instance, differences in bark density could also be related to its nutrient concentration, and Jönsson et al. (2001) reported that P and Mg bark concentrations affect resistance to frost. However, few information is available for nutritional aspects of bark in Neotropical savanna species and more detailed studies should be performed.

Under frost events, adult savanna trees are more exposed to lower temperatures than adult established forest trees, especially because they are short and most of their branches and leaves are 1-2 m above ground level (Hoffmann et al. 2019). If there is no strategy to isolate internal branches tissues, the frost may affect tree survival and may impose a “frost trap”, similarly to the well-studied “fire trap” (Hoffmann et al. 2012). The “frost trap” may maintain plants in a suppressed state through repeated cycles of stem loss and resprouting (Hoffmann et al. 2019). Individual traits, such as high bark density, may confer protection against these low temperatures, insulating the branch tissues against damages. Detailed studies concerning bud position, branch size and bark density in savanna areas where frost is recurrent are necessary to a deeper comprehension of how these traits have been selected in the plant community.

Here, for the first time, we provide important and new information about the role of bark properties in savanna species, showing their role in protecting inner tissues against lower temperatures, a recurrent event in Neotropical savannas at their south limit of distribution. Our results indicate that bark properties and bud protection may be two different (albeit related) strategies to the protection and persistence of savanna trees under extreme environmental temperatures and can explain ecological observations related to savanna trees responses to frost events.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq) grants 301589/2015-1 and 302897/2018-6.

References

- Bannister P. (2007) Godley review: A touch of frost? cold hardiness of plants in the southern hemisphere. *New Zealand Journal of Botany* **45**,1–33.doi: 10.1080/00288250709509700
- Bond W.J., Midgley J.J. (2001) Ecology of sperouting in woody plants: the persistence niche. *Trends in Ecology and Evolution* **16**,45–51.doi: [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)02033-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)02033-4)
- Brando P.M., Durigan G. (2005) Changes in Cerrado Vegetation after Disturbance by Frost (São Paulo State, Brazil). *Plant Ecology* **175**,205–215. doi: <https://doi.org/10.1007/s11258-005-0014-z>
- Burke, M.J., Gusta L.V., Quamme H. A., Weiser C. J., Li P. H. (1976). Freezing and injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology* **27**, 507-528.doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.27.060176.002451>
- Charles-Dominique T., Beckett H., Midgley G.F., Bond W.J. (2015) Bud protection: A key trait for species sorting in a forest-savanna mosaic. *New Phytologist* **207**, 1052–1060. doi: 10.1111/nph.13406
- Charles-Dominique T., Midgley G.F., Bond W.J. (2017) Fire frequency filters species by bark traits in a savanna–forest mosaic. *Journal of Vegetation Science* **28**,728–735. doi: 10.1111/jvs.12528
- Childes S.L., Walker B.H. (1987) Ecology and dynamics of the woody vegetation on

- the Kalahari Sands in Hwange National Park, Zimbabwe. *Vegetatio* **72**, 111–128 .
doi: 10.1007/BF00044841
- Clarke P.J., Lawes M.J., Midgley J.J., Ojeda F., Burrows G.E., Enright N.J., Knox K.J. et al (2013) Resprouting as a key functional trait: How buds, protection and resources drive persistence after fire. *New Phytologist* **197**, 19–35. doi: 10.1111/nph.12001
- Del Tredici, P. (2001). Sprouting in temperate trees: a morphological and ecological review. *The botanical review* **67**, 121-140. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02858075>
- de Moraes M.G., Carvalho M.A.M., Franco A.C., Pollock C.J., Figueiredo-Ribeiro R.C.N. (2016) Fire and drought: soluble carbohydrate storage and survival mechanisms in herbaceous plants from the Cerrado. *Bioscience* **66**, 107–117. doi:10.1093/biosci/biv178
- De Vivo, M., Carmignotto, A. P. (2004). Holocene Vegetation Change and the Mammal Faunas of South America and Africa. *Journal of Biogeography* **31**, 943-957. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2699.2004.01068.x>
- Fernández-Palacios, J.M., Nicolás, J.P. (1995) Altitudinal patterns of vegetation variation on Tenerife. *Journal of Vegetation Science* **6**, 183-190. doi: <https://doi.org/10.2307/3236213>
- Filgueiras T.S. , Pereira B.A.S. (1987) Efeito de uma geada sobre a flora do cerrado na Reserva Ecológica do IBGE, DF - Brasil. *Cadernos de Geociências* **2**, 67-70.
- Hengst G. E., Dawson J. O. (1994). Bark properties and fire resistance of selected tree species from the central hardwood region of North America. *Canadian Journal of Forest Research* **24**, 688-696.
- Hoffmann W. A., Adasme R. , Haridasan M. , De Carvalho M.T., Geiger E.L., Pereira

- M.A.B, Gotsch S.G., Franco, A.C. (2009) Tree topkill, not mortality, governs the dynamics of savanna–forest boundaries under frequent fire in central Brazil. *Ecology* **90**, 1326–1337. doi: <https://doi.org/10.1890/08-0741.1>
- Hoffmann W.A., Geiger E.L., Gotsch S.G., Rossatto D.R., Silva L.C.R, Lau O.L., Haridasan M., Franco A.C. (2012) Ecological thresholds at the savanna-forest boundary: How plant traits, resources and fire govern the distribution of tropical biomes. *Ecology Letters* **15**, 759–768 . doi: 10.1111/j.1461-0248.2012.01789.x
- Hoffmann W.A., Flake S.W., Abreu R.C.R., Pilon N.A., Rossatto D.R., Durigan G.D. (2019) Rare Frost Events Reinforce the Distribution of Tropical Biomes. *Journal of Ecology* **107**, 468–477. doi: 10.1111/1365 - 2745.13047
- Inouye D.W. (2000) The ecological and evolutionary significance of frost in the context of climate change. *Ecology Letters* **3**, 457–463. doi: 10.1046/j.1461-0248.2000.00165.x
- Jönsson A.M., Kivimäenpää M., Stjernquist I., Sutinen S. (2001) Frost hardiness in bark and needles of Norway spruce in southern Sweden. *Trees* **15**, 171–176. doi: 10.1007/s004680100088
- Kramer, K. (1994) A modelling analysis of the effects of climatic warming on the probability of spring frost damage to tree species in The Netherlands and Germany. *Plant Cell and Environment* **17**, 367-377. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1994.tb00305.x>
- Lawes M.J., Richards A., Dathe J., Midgley J.J. (2011) Bark thickness determines fire resistance of selected tree species from fire-prone tropical savanna in north Australia. *Plant Ecology* **212**, 2057–2069 . doi: 10.1007/s11258-011-9954-7
- Lehmann C.E.R., Anderson M.T., Sankaran M., Higgins S.I., Archibald S., Hoffmann W.A., Hanan N.P., Williams R.J., Fensham R.J., Felfili J., Hutley L.B., Ratnam

- J.,4 San Jose J., Montes R., Franklin D., Russell-Smith J., Ryan C.M., Durigan G., Hiernaux P., Haidar R., Bowman D.M.J.S., Bond W.J. (2014) Savanna Vegetation-Fire-Climate Relationships Differ Among Continents. *Science* **343**, 548. doi: 10.1126/science.1247355
- Lyons J. M. (1973). Chilling injury in plants. *Annual review of plant physiology* **24**, 445-466. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.24.060173.002305>
- Malanson G. P., & Trabaud L. (1987). Ordination Analysis of Components of Resilience of *Quercus Coccifera* Garrigue. *Ecology* **68**, 463–472. doi:10.2307/1938451
- Moreschi J.C. *Propriedades da madeira* (2012) Ministério da Educação e do Desporto - setor de ciências agrárias da UFPR- Centro de Ciências Florestais e da Madeira (Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal) 4ª ed. 208.
- Palacio S., Lenz A. , Wipf S., Hoch G., Rixen C. (2015) Bud freezing resistance in alpine shrubs across snow depth gradients. *Environmental and Experimental Botany* **118**, 95-101. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.06.007>
- Pausas J.G. (2017) Letters: Bark thickness and fire regime: another twist. *New Phytologist* **213**, 13–15. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.14277>
- R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rosell J. A. (2016) Bark thickness across the angiosperms: more than just fire. *New Phytologist* **211**, 90-102. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.13889>
- Sakai, A., Larcher, W. (1987) *Frost Survival in Plants*. Ecological Studies. Berlin: Springer-Verlag. **62**, 317. doi: 10.1007/978-3-642-71745-1
- Silberbauer-Gottsberger I., Morawetz W., Gottsberger G. (1977) Frost damage of cerrado plants in Botucatu, Brazil, as related to the geographical distribution of the

- species. *Biotropica* **9**, 253–261 . doi: 10.2307/2388143
- Smith, D. M. (1954) Maximum moisture content method for determining specific gravity of small wood samples. Madison, Wis.: US Dept. of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory.
- Staver A.C., Bond W.J., February E.C. (2011) History matters: tree establishment variability and species turnover in an African savanna. *Ecosphere* **2**, 1-12. doi:10.1890/ES11-00029.1
- Van Mantgem P., Schwartz M. (2003) Bark heat resistance of small trees in Californian mixed conifer forests: Testing some model assumptions. *Forest Ecology and Management* **178**, 341–352 . doi: 10.1016/S0378-1127(02)00554-6
- Vuono Y.S., Barbosa L.M., Batista E.A. & Gurgel Filho O.A. (1982) Efeitos biológicos da geada na vegetação do cerrado. *Silvicultura em São Paulo* **16A**, 545–547
- Wenger, K. F. (1953). The sprouting of sweetgum in relation to season of cutting and carbohydrate content. *Plant Physiology*, **28**, 35-49.
- Whitecross M.A., Archibald S., Witkowski E.T.F. (2012) Do freeze events create a demographic bottleneck for *Colophospermum mopane*?. *South African Journal of Botany* **83**, 9–18 . doi: 10.1016/j.sajb.2012.07.008

Supplementary data

Table S1. Values of bud position, branch diameter (cm) and values of internal and external bark thickness (mm) for the studied species in a cerrado area of Brasilia, DF, Brazil.

Family	Species	Bud position	Diameter	Internal thickness	External thickness
Araliaceae	<i>Schefflera macrocarpa</i> (Cham. & Schltdl.) Frodin	2	2.0	0.25	0.12
Apocynaceae	<i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart.	3	1.17	0.24	0.19
	<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	3	1.21	0.12	0.06
	<i>Himatanthus obovatus</i> (Müll.Arg.) Woodson	3	1.27	0.23	0.09
Annonaceae	<i>Annona crassiflora</i> Mart.	2	0.81	0.12	0.12
Asteraceae	<i>Eremanthus glomerulatus</i> Less.	3	1.49	0.11	0.09
	<i>Piptocarpha rotundifolia</i> (Less.) Baker	2	1.04	0.10	0.10
Bignoniaceae	<i>Handroanthus ochraceus</i> (Cham.) Mattos	2	0.95	0.12	0.18
Calophyllaceae	<i>Kielmeyera rubriflora</i> Cambess	3	1.31	0.15	0.05

Celastraceae	<i>Plenckia populnea</i> Reissek	2	1.12	0.23	0.11
	<i>Salacia crassifolia</i> (Mart. ex Schult.) G.Don	1	0.77	0.09	0.03
Connaraceae	<i>Connarus suberosus</i> Planch.	3	1.22	0.12	0.1
Caryocaraceae	<i>Caryocar brasiliense</i> A.St.-Hil.	1	1.38	0.1	0.05
Dilleniaceae	<i>Davilla elliptica</i> A.St.-Hil.	2	0.85	0.07	0.05
Ebenaceae	<i>Diospyros hispida</i> A.DC	1	1.65	0.18	0.08
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum suberosum</i> A.St.-Hil.	3	0.99	0.08	0.24
	<i>Erythroxylum tortuosum</i> Mart.	2	2.06	0.3	0.18
Lamiaceae	<i>Aegiphila verticillata</i> Vell.	2	0.69	0.05	0.05

Leguminosae	<i>Acosmium dasycarpum</i> (Vogel) Yakovlev	2	1.43	0.13	0.14
	<i>Dalbergia miscolobium</i> Benth.				
	<i>Dimorphandra mollis</i> Benth.	3	1.45	0.12	0.21
	<i>Enterolobium gummiferum</i> (Mart.) J.F.Macbr.	0	1.58	0.14	0.06
	<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne	1	1.14	0.07	0.22
	<i>Machaerium opacum</i> Vogel				
	<i>Mimosa clausenii</i> Benth.	2	1.04	0.11	0.07
	<i>Pterodon emarginatus</i> Vogel				
	<i>Sclerolobium paniculatum</i> Vogel	2	1.06	0.14	0.14
	<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	3	1.55	0.18	0.01
		2	1.34	0.06	0.06
Malpighiaceae		0	1.48	0.13	0.06
		1	2.0	0.23	0.18
	<i>Byrsonima crassa</i> Nied.	2	1.16	0.13	0.06
	<i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth	1	1.17	0.14	0.07
	<i>Byrsonima verbascifolia</i> (L.) DC.	3	1.52	0.10	0.12
Malvaceae	<i>Eriotheca pubescens</i> (Mart. & Zucc.) Schott & Endl. DC.	2	1.07	0.17	0.06
Melastomataceae	<i>Acinodendron pohlianum</i> (Cogn.) Kuntze	0	1.0	0.38	0.08
	<i>Miconia albicans</i> (Sw.) Triana	2	1.1	0.06	0.04
	<i>Miconia ferruginata</i> DC.	2	1.36	0.2	0.12

Myrtaceae	<i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O.Berg	3	1.18	0.14	0.12
Nyctaginaceae	<i>Guapira noxia</i> (Netto) Lundell <i>Neea theifera</i> Oerst.	1	1.23	0.06	0.14
Ochnaceae	<i>Ouratea hexasperma</i> (A. St.-Hil.) Baill.	3	1.12	0.3	0.12
Primulaceae	<i>Myrsine guianensis</i> (Aubl.) Kuntze	3	1.21	0.17	0.11
Proteaceae	<i>Roupala montana</i> Aubl.	3	1.15	0.05	0.02
Rubiaceae	<i>Palicourea rigida</i> Kunth	3	1.84	0.28	0.15
	<i>Tocoyena formosa</i> (Cham. & Schltdl.) K.Schum.	3	1.02	0.18	0.03
Sapotaceae	<i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk.	2	1.42	0.22	0.18
Solanaceae	<i>Solanum lycocarpum</i> A.St.-Hil.	2	0.84	0.3	0.03
Styracaceae	<i>Styrax ferrugineus</i> Nees & Mart.	1	0.78	0.06	0.04
Symplocaceae	<i>Symplocos rhamnifolia</i> A.DC.	1	0.57	0.09	0.09

Vochysiaceae	<i>Qualea grandiflora</i> Mart.	2	0.78	0.24	0.13
	<i>Qualea multiflora</i> Mart.	3	1.13	0.16	0.04
	<i>Qualea parviflora</i> Mart.	3	1.08	0.11	0.07
	<i>Vochysia elliptica</i> Mart.	2	1.62	0.21	0.03
	<i>Vochysia tucanorum</i> Mart.	1	1.12	0.21	0.19
	<i>Vochysia thyrsoidea</i> Pohl	1	1.61	0.18	0.13

Conclusão Geral

Os resultados obtidos nessa dissertação demonstram que espécies que não são afetadas pelas geadas apresentam diferentes estratégias daquelas que são afetadas. Apesar de não haverem diferenças morfológicas nas folhas, as espécies tolerantes parecem apresentar mecanismos fisiológicos/bioquímicos que permitem que suas folhas não sofram danos durante a exposição a baixas temperaturas. As principais diferenças foram encontradas em características de ramo e de rebrota com os grupos diferindo no grau de proteção de gemas e nas estratégias de rebrota. Também foi demonstrado que a densidade da casca dos ramos parecer ser uma característica essencial para proteção de gemas e tecidos nas espécies.

Conclui-se então que respostas funcionais específicas estão por trás das observações relatadas na literatura sobre o efeito da geada, e que estas podem interferir no processo de distribuição de espécies quando os eventos de geada se tornarem recorrentes, pois aquelas que sofrem danos terão que alocar mais energia para persistir no sistema a partir do rebrotamento, enquanto aquelas que não são afetadas podem investir mais em reprodução pois já possuem estratégias específicas para tolerar as baixas temperaturas.