



LUCAS RODRIGUES ROSADO

**PHENOTYPIC PLASTICITY AND NONSTRUCTURAL
CARBOHYDRATES IN ANNUAL GROWTH RINGS OF THE
AUSTRALIAN RED CEDAR CLONES IN CONTRASTING
ENVIROMENTS**

**LAVRAS - MG
2019**

LUCAS RODRIGUES ROSADO

**PHENOTYPIC PLASTICITY AND NONSTRUCTURAL CARBOHYDRATES IN
ANNUAL GROWTH RINGS OF THE AUSTRALIAN RED CEDAR CLONES IN
CONTRASTING ENVIROMENTS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Flávia Maria Avelar Gonçalves
Orientadora

Prof. Dr. Lucas Amaral de Melo
Coorientador

**LAVRAS - MG
2019**

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

Rosado, Lucas Rodrigues.

Phenotypic plasticity and nonstructural carbohydrates in annual growth rings of the australian red cedar clones in contrasting environments / Lucas Rodrigues Rosado. - 2019.

63 p. : il.

Orientadora: Flávia Maria Avelar Gonçalves.

Coorientador: Lucas Amaral de Melo.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. *Toona ciliata*. 2. Déficit hídrico. 3. Resiliência ambiental. I. Gonçalves, Flávia Maria Avelar. II. Melo, Lucas Amaral de. III. Título.

LUCAS RODRIGUES ROSADO

**PHENOTYPIC PLASTICITY AND NONSTRUCTURAL CARBOHYDRATES IN
ANNUAL GROWTH RINGS OF THE AUSTRALIAN RED CEDAR CLONES IN
CONTRASTING ENVIROMENTS**

**PLASTICIDADE FENOTÍPICA E CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS NOS
ANÉIS DE CRESCIMENTO DE CLONES DE CEDRO AUSTRALIANO EM
AMBIENTES CONTRASTANTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADO em 16 de setembro de 2019.

| | |
|---|--------|
| Prof. Dr. Lucas Amaral de Melo | UFLA |
| Dra. Kamila Rezende Dázio de Souza | UNIFAL |
| Prof. Dr. Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori | UFLA |
| Prof. Dr. Otávio Camargo Campoe | UFLA |

Profa. Dra. Flávia Maria Avelar Gonçalves
Orientadora

Prof. Dr. Lucas Amaral de Melo
Coorientador

**LAVRAS - MG
2019**

AGRADECIMENTOS

Em especial, ao professor Sebastião Carlos da Silva Rosado e a Bárbara Amâncio que, de forma direta, contribuíram com os conhecimentos e no percurso para produzir esse trabalho.

A minha orientadora, Dra. Flávia Maria Avelar Gonçalves, pela orientação, ensinamentos, convivência e amizade durante o meu doutoramento. E, também, aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da UFLA (PPGMP -UFLA) pelo conhecimento compartilhado.

À Universidade Federal de Lavras, o PPGMP - UFLA, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) à empresa Bela Vista Florestal, pelos suportes intelectual, administrativo, financeiro e estrutural para o desenvolvimento de pesquisas.

Em especial, para a minha família: Ivonilde, Sebastião, Bárbara, Isabel, Sara, Endrigo e Ramon, por estarem sempre ao meu lado e me darem forças para continuar no caminho acadêmico.

Obrigado, aos membros da banca, Dr. Lucas Amaral de Melo, Dra. Kamila Rezende Dázio de Souza, Dr. Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori, Dr. Otávio Camargo Campoe, pelas críticas, sugestões e correções que me ajudaram a melhorar esta tese.

Aos professores do departamento de Engenharia Florestal e de Biologia da UFLA, Paulo Hein, Ana Carolina e Donizete, que cederam os laboratórios e me ensinaram alguns passos na Dendrocronologia e na utilização do NIR.

Aos amigos do grupo Melhoramento de Plantas Perenes, pela convivência, amizade e conhecimento compartilhado. Em especial, à Juliana, e aos floresteiros Heloísa, Tacio e Vitor que cresceram junto comigo no conhecimento sobre melhoramento de plantas. Ao Luiz e Ana Clara que participaram do projeto relacionando carboidratos não estruturais e crescimento do cedro australiano.

A todos meus amigos, do GEN e de Lavras, pela amizade e convivência participando de forma direta e indireta neste trabalho.

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

RESUMO GERAL

As reservas dos carboidratos não estruturais (CNE) nas plantas são associadas ao seu crescimento e mecanismos de resiliência, quando expostas aos estresses ambientais, principalmente ao déficit hídrico do solo. Assim, objetivou-se, neste trabalho, estudar a influência dos conteúdos de CNE presentes no tronco na sobrevivência, crescimento e plasticidade fenotípica para taxa de incremento de área seccional (IAS), bem como fornecer suporte para as seleções de genótipos de árvores mais resilientes, quando estas se deparam com secas mais severas e ou prolongadas. Os CNE avaliados (amido, sacarose, açúcares redutores, açúcares solúveis totais e CNE total) e o IAS foram estimados nos anéis anuais de crescimento do tronco, em discos de madeira retirados a 1,3 m do nível do solo. Foram estudados dez clones (fd, fe, hf, md, mi, xd, xe, xf, xg, xi) de *Toona ciliata* M. Roem. var. *australis* (cedro australiano), com sete anos de idade e cultivados em dois sítios com condições de estresse hídrico contrastantes. Ambos os sítios se localizam no estado de Minas Gerais, sendo que os com menor e maior níveis de estresse hídrico se localizam em Campo Belo (CBL) e Cana Brava (CNB), respectivamente. As estimativas dos conteúdos de CNE foram realizadas por modelos multivariados, gerados pela aplicação da técnica de espectroscopia do infravermelho próximo (NIR). A regressão de mínimos quadrados parciais foi utilizada para associar a quantidade de CNE, obtidos por análises laboratoriais convencionais, com as assinaturas espectrais do NIR. As validações desses modelos foram feitas em um conjunto externo de dados e estas evidenciaram a aplicação satisfatória dos modelos ajustados para estimar os conteúdos de CNE nos anéis de crescimento dos dez clones mencionados. As larguras dos anéis de crescimento de cada clone foram medidas e transformadas em IAS. Os efeitos médios dos clones e as suas plasticidades fenotípicas foram estimados por meio de modelos de regressões aleatórias e as correlações entre os parâmetros desses modelos foram analisadas pelos coeficientes da correlação de Pearson. Foram estimadas correlações altas e significativas de 0,96 e 0,97, entre a média de conteúdos de CNE total e a plasticidade fenotípica do IAS em CBL e CNB, respectivamente. A plasticidade fenotípica para IAS, quando correlacionada com a taxa de acúmulo de sacarose, foi alta e significativa apenas em CBL ($r = 0,82$), e quando correlacionada com a taxa de acúmulo de CNE total foi positiva e significativa ($r = 0,72$) para CBL e negativa e significativa ($r = -0,99$) para CNB. No ambiente mais estressante, a sobrevivência dos clones é inversamente correlacionada com os valores médios de açúcares redutores ($r = -0,90$) e das taxas de acúmulo de amido ($r = -0,91$), açúcares redutores ($r = -0,66$) e CNE total ($r = -0,99$), sugerindo que a depleção desses CNE foi necessária para a manutenção da vida das árvores. A maior performance e plasticidade fenotípica do clone “xd”, verificadas ao longo do tempo de estudo, mostraram que, dentre todos os clones estudados, este é o que se apresentou com maior resiliência, em ambas as condições de estresse.

Palavras-chave: *Toona ciliata*. Déficit hídrico. Resiliência ambiental. Regressão aleatória. NIR.

GENERAL ABSTRACT

Nonstructural carbohydrate (NSC) reserves are associated with plant growth and their resilience mechanisms when exposed to environmental stresses, especially to the soil water deficit. Thus, the objective of this study was to evaluate the influence of the contents of NSC in the trunk on the survival, growth, and phenotypic plasticity regarding the increase rate of the sectional area (ISA), as well as to support the selection of more resilient genotypes when subjected to more severe or prolonged drought periods. The evaluated NSC (starch, sucrose, reducing sugars, total soluble sugars, and total NSC) and the ISA were estimated in the annual trunk growth rings in wood discs removed at 1.3 m from the ground level. A total of ten clones (fd, fe, hf, md, mi, xd, xe, xf, xg, xi) from *Toona ciliata* M. Roem. var. *australis* (Australian cedar), with seven years of age and obtained from two sites with contrasting water stress conditions, were studied. Both sites are in the state of Minas Gerais, in the municipalities of Campo Belo (CBL) and Cana Brava (CNB), presenting lower and higher levels of water stress, respectively. The NSC contents were estimated using multivariate models generated by the near-infrared spectroscopy (NIR) technique. Partial least squares regression was used to associate the amount of NSC obtained by conventional laboratory analysis with the NIR spectral signatures. These models were validated in an external data set, which demonstrated the satisfactory application of the adjusted models to estimate the NSC contents in the growth rings of the ten clones. The width of the growth ring of each clone was measured and transformed into ISA. The average effects of the clones and their phenotypic plasticity were estimated using random regression models, while the correlations between the model parameters were analyzed by Pearson correlation coefficients. The high and significant correlations of 0.96 and 0.97 were obtained for the mean total NSC content and the phenotypic plasticity of ISA in CBL and CNB, respectively. When correlated with the sucrose accumulation rate, the phenotypic plasticity for ISA was high and significant only in CBL ($r=0.82$), and when correlated with the total NSC accumulation rate, it was positive and significant ($r=0.72$) for CBL and negative and significant ($r=-0.99$) for CNB. Clone survival is inversely correlated with the mean values of reducing sugars ($r=-0.90$) and the accumulation rates of starch ($r=-0.91$), reducing sugars ($r=-0.66$), and total NSC ($r=-0.99$), suggesting that the depletion of these NSC was necessary to maintain life. The highest performance and phenotypic plasticity of clone “xd”, verified over the study period, showed that, among all studied clones, this one was the most resilient in both stress conditions.

Keywords: *Toona ciliata*. Water deficit. Environmental resilience. Random Regression. NIR.

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| | PRIMEIRA PARTE | 9 |
| 1 | INTRODUÇÃO GERAL | 9 |
| | REFERÊNCIAS | 12 |
| | SEGUNDA PARTE - ARTIGOS | 14 |
| | ARTIGO 1 - NEAR INFRARED SPECTROSCOPY: RAPID AND ACCURATE ANALYTICAL TOOL FOR PREDICTION OF NON-STRUCTURAL CARBOHYDRATES IN WOOD | 14 |
| 1 | INTRODUCTION | 16 |
| 2 | MATERIAL AND METHODS | 17 |
| 3 | RESULTS AND DISCUSSION | 19 |
| 4 | CONCLUSIONS | 28 |
| | REFERENCES | 30 |
| | ARTIGO 2 - PLASTICIDADE FENOTÍPICA E CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS NOS ANÉIS DE CRESCIMENTO DE CLONES DE CEDRO AUSTRALIANO EM AMBIENTES CONTRASTANTES | 33 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 35 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 37 |
| 2.1 | Locais de estudo e atividades de amostragem | 37 |
| 2.2 | Quantificações dos conteúdos de carboidratos não estruturais | 38 |
| 2.3 | Medições dos anéis de crescimento | 38 |
| 2.4 | Análises estatísticas | 39 |
| 2.4.1 | Modelo de regressão aleatória | 39 |
| 2.4.2 | Informações genéticas | 40 |
| 2.4.3 | Correlações entre interceptos e inclinações | 40 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 42 |
| 3.1 | Análises descritivas | 42 |
| 3.2 | Análises dos modelos de regressão | 45 |
| 3.3 | Correlações entre interceptos e inclinações | 49 |
| 4 | CONCLUSÃO | 55 |
| | REFERÊNCIAS | 56 |
| | ANEXO A - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES | 61 |

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

As mudanças climáticas, provocadas pelo aumento nas emissões de gases de efeito estufa, podem alterar o metabolismo das plantas, gerar incertezas sobre a funcionalidade dos ecossistemas florestais e impor restrições na produtividade florestal (ALLEN et al., 2010; CLARK, CLARK, OBERBAUER, 2010; DUSENGE, DUARTE, WAY, 2019).

O aumento na taxa de mortalidade das plantas, como consequência dos estresses térmicos e das secas mais prolongadas e severas, já é observado em várias regiões da terra (ALLEN et al., 2010; KLEIN, HARTMANN, 2018). Porém, o atual nível de compreensão desse fenômeno, ainda não permite estabelecer a dinâmica futura da vegetação, nessas condições alteradas do ambiente (HARTMANN et al., 2018). Essa lacuna no conhecimento despertou um grande interesse entre os pesquisadores e, no final da última década, ocorreram debates interessantes sobre os mecanismos envolvidos nos casos de mortalidade de árvores (BRESHEARS et al., 2009; LEUZINGE et al., 2009; ADAMS et al., 2009; SALA, 2009; SALA, 2010).

Entretanto, para atenuar essas mencionadas incertezas, deve-se considerar que as sucessivas alterações no clima, ocorridas no passado, e suas consequentes pressões sobre as plantas são contextualizadas como as precursoras dos processos evolutivos e, consequentemente, das variações genéticas entre e dentro de populações de plantas (RAPP; WENDEL, 2005). Também, deve-se considerar que é a partir dessas variações que as plantas expressam as suas diferenças na sensibilidade e na resposta aos estresses ambientais e, como consequência, surgem as oportunidades para se conhecer as capacidades de genótipos distintos de plantas para superar os obstáculos impostos por tais estresses, principalmente dos decorrentes de secas mais intensas e ou prolongadas (BECKLIN et al., 2016).

Dentre os mecanismos fisiológicos que provocam a mortalidade das plantas, em decorrência de secas, pode-se destacar a privação de carbono e a falha hidráulica. A primeira causa ocorre quando a duração da seca é suficientemente longa para reduzir a fotossíntese e esgotar as reservas de carbono e, consequentemente, a manutenção do metabolismo. De forma não excludentes, a falha hidráulica ocorre quando a intensidade da seca atinge um nível limiar de dessecação, antes mesmo que haja a privação de carbono (McDOWELL et al., 2008).

Pesquisas recentes demonstraram que à medida que a tensão da coluna de água do xilema aumenta em decorrência da seca, os açúcares tornam-se fundamentalmente

importantes na osmorregulação, bem como na manutenção do fluxo de água no xilema (SECCHI e ZWIENIECKI, 2011). A base teórica para a referida manutenção surgiu na concepção de que a despolimerização do amido armazenado nas células do parênquima gera os açúcares que são responsáveis pela reparação do embolismo nos vasos xilemáticos (NARDINI et al., 2011). Posteriormente, SECCHI e ZWIENIECKI (2012), tornaram essa teoria mais robusta ao evidenciar a capacidade das plantas em perceber a embolia e que a concentração de sacarose é o estímulo que permite às plantas desencadear o processo de resposta biológica para contornar o referido dano.

Várias outras pesquisas subsequentes reafirmaram que a tolerância dos indivíduos ao déficit hídrico é dependente da disponibilidade de carboidratos não estruturais (CNE) e que as depleções de suas quantidades podem ser mensuradas e associadas aos níveis de déficit hídrico sofrido pelas plantas (MITCHELL et al., 2012; DIETZE et al., 2014, O'BREIN et al., 2014; SEVANTO et al., 2014, NARDINI et al., 2017; DAI, WANG, WAN, 2018; BLACKMAN et al., 2019; TRIFILÒ et al., 2019).

A plasticidade fenotípica, conceituada por Bradshaw (1965) como sendo a capacidade de um mesmo genótipo em produzir diferentes fenótipos em resposta à variação ambiental, é de importância fundamental no processo de melhoramento genético da resistência à seca, uma vez que a variação genética nas respostas de plasticidade pode predizer o grau de vulnerabilidade de espécies e populações sob o efeito das mudanças climáticas (KELLY, 2019).

Nas espécies arbóreas, os anéis de crescimento são importantes para fornecer informações do passado das árvores, indicando como as respostas nas características anatômicas da madeira estão relacionadas com os estresses abióticos ocorridos ao longo de suas vidas (MONTWÉ et al., 2016). Assim, considerando as variações entre plantas para expressar as suas diferenças na sensibilidade e na resposta aos estresses ambientais, pode-se conjecturar que as variações nos padrões de crescimento radial do fuste, mensuráveis anualmente nos anéis de crescimento, podem estar relacionadas com as variações na dinâmica de armazenamento de amido e na sua posterior conversão em açúcares. Complementarmente, o conhecimento da magnitude dessa relação propiciará a formulação de bases estratégicas para o melhoramento genético da resistência/resiliência das árvores, quando estas se deparam com secas mais severas e ou prolongadas.

Para testar essas hipóteses, o presente estudo é constituído de dois estudos, sendo que no primeiro, intitulado: "NEAR INFRARED SPECTROSCOPY: RAPID AND ACCURATE ANALYTICAL TOOL FOR PREDICTION OF NON-STRUCTURAL CARBOHYDRATES

IN WOOD” objetivou-se desenvolver modelos no NIR para estimar os conteúdos de amido, sacarose, açúcares redutores, açúcares totais e os CNE totais a partir dos discos de madeira. O alcance desse objetivo deu exequibilidade necessária para a condução do segundo estudo, “ANÁLISE DA PLASTICIDADE FENOTÍPICA E SUA RELAÇÃO COM OS CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIIS NOS ANÉIS DE CRESCIMENTO DE CLONES DE CEDRO AUSTRALIANO”, que foi conduzido em clones replicados e cultivados em dois ambientes contrastantes quanto ao nível de déficit hídrico. Nessa segunda parte, objetivou-se relacionar os CNE com o desempenho e plasticidade fenotípica dos clones de cedro australiano, por meio do incremento da área seccional (IAS) e selecionar genótipos mais resistentes/resilientes quando estes se deparam com secas mais severas e ou prolongadas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, H. D., et al. **Reply to Sala: Temperature sensitivity in drought-induced tree mortality hastens the need to further resolve a physiological model of death.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 106, n. 26, p. E69-E69, 2009.
- ALLEN, C. D., et al. **A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests.** Forest ecology and management, v. 259, n. 4, p. 660-684, 2010.
- BECKLIN, K. M., et al. **Examining plant physiological responses to climate change through an evolutionary lens.** Plant Physiology, v. 172, n. 2, p. 635-649, 2016.
- BLACKMAN, C. J., et al. Drought response strategies and hydraulic traits contribute to mechanistic understanding of plant dry-down to hydraulic failure. Tree physiology, v. 39, n. 6, p. 910-924, 2019.
- BRADSHAW, A. D. **Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants.** In: Advances in genetics. Academic Press, v. 13, p. 115-155, 1965. Doi: [10.1016/S0065-2660\(08\)60048-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60048-6).
- BRESHEARS, D. D., et al. **Tree die-off in response to global change-type drought: mortality insights from a decade of plant water potential measurements.** Frontiers in Ecology and the Environment, v. 7, n. 4, p. 185-189, 2009.
- CLARK, D. B., CLARK, D. A., OBERBAUER, S. F. **Annual wood production in a tropical rain forest in NE Costa Rica linked to climatic variation but not to increasing CO₂.** Global Change Biology, v. 16, n. 2, p. 747-759, 2010.
- DAI, Y., WANG, L., WAN, X. **Relative contributions of hydraulic dysfunction and carbohydrate depletion during tree mortality caused by drought.** AoB PLANTS, v. 10, n. 1, p. plx069, 2018.
- DIETZE, M. C., et al. **Nonstructural Carbon in Woody Plants.** Annual Review of Plant Biology, v. 65, p. 667-687, 2014.
- DUSENGE, M. E., DUARTE, A. G., WAY, D. A. (2019). Plant carbon metabolism and climate change: elevated CO₂ and temperature impacts on photosynthesis, photorespiration and respiration. New Phytologist, v. 221, n. 1, p. 32-49, 2019.
- HARTMANN, H., et al. **Research frontiers for improving our understanding of drought-induced tree and forest mortality.** NewPhytologist, v. 218, n. 1, p. 15-28, 2018.
- KLEIN, T., HARTMANN, H. **Climate change drives tree mortality.** Science, v. 362, n. 6416, p. 758-758, 2018.
- KELLY, M. **Adaptation to climate change through genetic accommodation and assimilation of plastic phenotypes.** Philosophical Transactions of the Royal Society B, v. 374, n. 1768, p. 20180176, 2019.

LEUZINGER, S., et al. **Poor methodology for predicting large-scale tree die-off.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 106, n. 38, p. E106-E106, 2009.

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

MITCHELL P. J., et al. **Drought response strategies define the relative contributions of hydraulic dysfunction and carbohydrate depletion during tree mortality.** New Phytologist, v. 197, n. 3, p. 862-872, 2013.

MONTWÉ, D., et al. **Drought tolerance and growth in populations of a wide-ranging tree species indicate climate change risks for the boreal north.** Global change biology, v. 22, n. 2, p. 806-815, 2016.

NARDINI, A., et al. **Drought Stress and the Recovery from Xylem Embolism in Woody Plants.** Progress in Botany Vol. 79. Springer, Cham, p. 197-231, 2017.

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

O'BRIEN, M. J., et al. **Drought survival of tropical tree seedlings enhanced by non-structural carbohydrate levels.** Nature Climate Change, v. 4, n. 8, p. 710, 2014.

RAPP, R. A., WENDEL, J. F. **Epigenetics and plant evolution.** New Phisiology, v. 168, p. 81-91, 2005.

SALA, A. **Lack of direct evidence for the carbon-starvation hypothesis to explain drought-induced mortality in trees.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 106, n. 26, p. E68-E68, 2009.

SALA, A., PIPER, F., HOCH, G. **Physiological mechanisms of drought-induced tree mortality are far from being resolved.** New Phytologist, v. 186, n. 2, p. 274-281, 2010.

SECCHI, F., ZWIENIECKI, M. A. **Sensing embolism in xylem vessels: the role of sucrose as a trigger for refilling.** Plant, Cell & Environment, v. 34, n. 3, p. 514-524, 2011.

SECCHI, F., ZWIENIECKI, M. A. **Analysis of Xylem Sap from Functional (Nonembolized) and Nonfunctional (Embolized) Vessels of Populus nigra: Chemistry of Refilling.** Plant Physiology, v. 160, n. 2, p. 955-964, 2012.

SEVANTO, S., et al. **How do trees die? A test of the hydraulic failure and carbon starvation hypotheses.** Plant, Cell & Environment, v. 37, n. 1, p. 153-161, 2014.

TRIFILÒ, P., et al. **Hydraulic recovery from xylem embolism in excised branches of twelve woody species: Relationships with parenchyma cells and non-structural carbohydrates.** Plant Physiology and Biochemistry, v. 139, p. 513-520, 2019.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS***ARTIGO 1 - NEAR INFRARED SPECTROSCOPY: RAPID AND ACCURATE
ANALYTICAL TOOL FOR PREDICTION OF NON-STRUCTURAL CARBOHYDRATES IN
WOOD***

Artigo redigido conforme normas da revista CERNE.

NEAR INFRARED SPECTROSCOPY: RAPID AND ACCURATE ANALYTICAL TOOL FOR PREDICTION OF NON-STRUCTURAL CARBOHYDRATES IN WOOD

Lucas Rodrigues Rosado, Luiz Mendes Takarada, Ana Clara Caxito de Araújo, Kamila Rezende Dázio de Souza, Paulo Ricardo Gherardi Hein, Sebastião Carlos da Silva Rosado, Flávia Maria Avelar Gonçalves

Abstract

The non-structural carbon reserves in the various organs of trees are associated with their growth and the mechanism of resilience when exposed to environmental stresses, especially the water deficit. The goal of this study was to develop multivariate models to estimate the amount of non-structural carbohydrates (starch, sucrose, reducing sugars, total sugars and total non-structural carbohydrates) based on near infrared (NIR) spectra measured in solid wood and material reduced to powder. Partial least squares regression was used to associate the amount of non-structural carbohydrates (NSC) obtained by conventional laboratory analysis with NIR spectral signatures. The best predictive models were obtained from the wood reduced to powder. Validity for the NSC prediction in an external set of data presented the following statistics: reducing sugars with $R^2 = 0.91$ and root mean square error (RMSE) of 2.39% dry matter, total sugars ($R^2 = 0.90$, RMSE = 2.57%), total NSC ($R^2 = 0.87$, RMSE = 2.89%), sucrose ($R^2 = 0.82$, RMSE = 0.06%) and starch ($R^2 = 0.80$, RMSE = 1.03%). The ability of models to estimate the NSC concentration in the growth rings and under divergent environmental conditions demonstrates the potential of the NIR tool to study the physiological responses of plants to different environmental stresses.

Key words: Carbohydrate storage, high-throughput phenotyping, resilience to environmental stress, starch, sugar.

1 INTRODUCTION

Non-structural carbons are organic reserves that act in biochemical processes during the growth, development and survival of plants when subjected to stress situations imposed by the environment. These compounds are simple soluble sugars (glucose, fructose and sucrose), starch, lipids, amino acids, fatty acids and alcohols, being the first two the most significant portion of the energy reserves stored in plants (Hoch et al., 2003; Locosselli and Buckeridge, 2017). Thus, the amount of these reserves available to the plant can be used as important indicators of its potential for growth (Quentin et al., 2011) and its ability to survive environmental stresses (McDowell et al., 2011; O'Brien et al., 2014). These facts, associated with the aforementioned relationships between the levels of non-structural carbohydrates (NSC) reserves and the growth and survival of plants, allow us to conjecture that greater genetic gains for growth and resilience to stress can be achieved by breeding.

For the quantification of NSC, enzymatic extraction techniques and chromatographic procedures are used (Yemm and Willis, 1954; Miller, 1959). However, the laboratory procedures used to detect and quantify NSC are complex, costly and time-consuming, making it difficult to conduct studies that require evaluations in large numbers of samples. To minimize such situations, it is necessary to use techniques that can provide immediate results, but with precision and accuracy close to those provided by traditional methodologies.

In the field of forest sciences, NIR spectroscopy is a non-destructive technique that has been used to estimate wood properties (Tsuchikawa and Kobori, 2015) because of its precision, speed and effectiveness (Schimleck, 2008). In addition, the technique has the advantage of providing results with high repeatability, requiring minimal sample preparation when compared to traditional analytical methods, and allowing the evaluation of large samples (Viana et al. 2009). The predictions are based on NIR spectral signature, which are related to the composition and the chemical bonds of the analyzed material (Pasquini, 2018).

Few studies have been conducted in forest species tissues to predict non-structural carbohydrates by NIR spectroscopy. Ramirez et al. (2015) adjusted multivariate models for the quantification of NSC in different organs of 82 native trees from different biomes of Canada and Colombia. The authors evaluated the total free sugars, starch and NSC content. Wang et al. (2018) have studied the growth and production of *Picea abies* roots with the supply of non-structural carbohydrates present in the different organs of the trees by means of the NIR spectroscopy. However, the fit of multivariate models to quantify NSC was not explored.

In this context, the present study aimed to develop models to estimate the contents of starch, sucrose, reducing sugars, total sugars and total NSC based on NIR spectral signature recorded from samples of solid wood disc and reduced to powder.

2 MATERIAL AND METHODS

Biological material

Samples of *Toona ciliata* M. Roemer var. *australis* with seven years old of age were collected from the Cana Brava district of João Pinheiro (17°44'33" S; 46°10'21" W) and Campo Belo (20°53'50" S; 45°16'38" W), both in the State of Minas Gerais, Brazil. According to Köppen (1948), the climate of the region of João Pinheiro (JP) is classified as Aw: tropical climate with dry winter. Campo Belo (CB) is classified as Cwa: subtropical, rainy and mesothermal.

Four clones (FE, XB, XD and XE) represented by three individuals were used, being 12 trees per municipality, totalizing 24 sampled trees.

Wood specimens

40 mm thick discs were taken from each tree at a height of 1.30 meters from the ground. These samples were stored in Styrofoam boxes with ice to reduce the enzymatic activity and the possible oxidation of the material.

In the laboratory, the discs were subjected to the microwave for 90 seconds at 600W to denature the enzymes, as described by Popp et al. (1996). Afterwards, they were taken to a forced air circulation oven at 60°C to constant mass for complete removal of the water without altering the starch for thermal degradation. The cross-sectional surfaces of the discs were sanded with 60, 120 and 180 sandpapers, in order to better reveal and individualize the growth rings.

Spectral Acquisition

The Bruker FT-NIR spectrometer (Optik GmbH, Ettlingen, Germany), MPA model, with integrating sphere and interferometer, was used to collect the spectra directly on the cross-sectional face of each disc, positioned at two opposite points of each growth ring, by means of the optical fiber in the range from 12,500 cm^{-1} to 3,500 cm^{-1} with a spectral resolution of 8 cm^{-1} in diffuse reflection mode. Each spectrum represented the average of 16 scans.

After collecting the spectra in the discs, the growth rings were individualized, reducing them to splinters, with the aid of a planer. The splinters were milled in a 40 mesh sieve for particle size classification and the powder was stored in plastic bags and saved in a freezer at -20°C. The powder spectral was acquired through by the integrating sphere with the same features of the disc spectral resolution.

The spectral acquisitions, in the solid wood disc and in powder, were carried out in a heated room (17°C and 60-65% RH) and collected through the software OPUS 7.5.

NSC chemical analysis

Powder aliquots (0.200 g) were taken from each sample for the extraction of sugars (reducing sugars and sucrose). Samples were homogenized in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and then warmed in a water bath at 40°C for 30 minutes. The homogenate was centrifuged at 5,000 g for 10 minutes, and the supernatant was collected. The supernatant was used for sucrose extraction and quantification of reducing sugar. The pellet was resuspended and used for starch extraction (Zanandrea et al., 2010).

For the determination of sucrose, 800 µL micromolecule extract was added to 800 µL 30% KOH (Van Handel, 1968), placed in a water bath at 37°C for 15 minutes and quantified by the Antrona method (Yemm and Willis, 1954)

Reducing sugars were quantified by the Dinitrosalicylic Acid Method (DNS), according to Miller (1959). The total sugars were represented by the sum of the sucrose with the reducing sugars contents.

To determine the starch, the extraction precipitate was resuspended with 8 mL of the 200 mM potassium acetate buffer pH 4.8, 2 mL of 1mg/mL amyloglucosidase enzyme was added and the sample was incubated in a water bath at 40°C for 2 hours. After incubation, the material was centrifuged at 10,000g for 20 minutes, the supernatant was collected and the volume of the material was completed to 15 mL with distilled water. Starch determination was done by the Antrona method (Yemm and Willis, 1954).

The content of total non-structural carbohydrates (total NSC) was determined by summing the total sugars and starch.

The NSC concentrations are expressed as percentage of dry matter (%DM) according to Equation 1.

$$NSC (\%DM) = \frac{NSC (\mu\text{mol glucose}) \times 180 (\text{molecular weight of glucose})}{10^6} \times 100 \quad (1)$$

Multivariate analysis

NIR spectra are subjected to interference from several factors, and therefore, the pretreatment of the data collected in the spectrum is necessary to reduce noise and improve calibration fit and validation of the models to be predicted.

Thus, the spectra used for the calibration of the models to predict the NSC contents were filtered, using only the wave numbers from 9,000 to 4,000 cm^{-1} .

Principal component analyses were performed to detect outliers. After the analysis, outlier detection tests were also carried out, observing leverages x studentized residuals plots, for each NSC content.

Finally, for the analyses, the spectral data were treated by the first derivative of second-degree polynomials using the Savitzky and Golay (1964) algorithm, with 15 smoothing points, since these led to better results when compared to the original spectra.

The selected samples were analyzed by two methods. The first considered all samples with complete cross validation. In the second approach, the samples were divided into two subsets: calibration (66%) and external validation (33%). The selection of samples from each subset was performed using the Kennard-Stone algorithm (Kennard and Stone, 1969).

Partial Least Squares Regression (PLS-R) was applied to associate the variations in the spectra (Matrix X) with the variations in the NSC (Matrix Y). The selection of the best regression models was based on the following criteria: coefficient of determination (R^2), root mean square error (RMSE) and the ratio of performance to deviation (RPD) (Equation 2), where RPD is the ratio of the standard deviation (SD) of the sample to the root mean square error.

$$RPD = \frac{SD}{RMSE} \quad (2)$$

All the statistical analyses were run using the software Chemoface version 1.5 (Nunes et al., 2012).

3 RESULTS AND DISCUSSION

NIR spectra and its pre-treatments

Figure 1 illustrates the near infrared signatures taken from wood disc and powder samples.

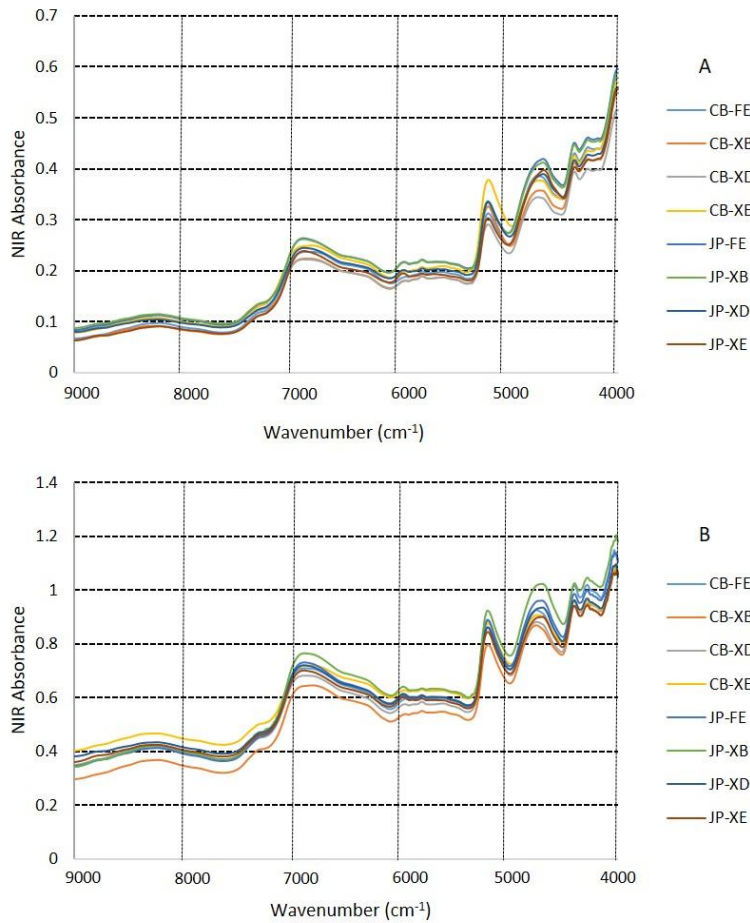


Figure 1. Original NIR spectra collected on powder-reduced material (A) and wood disc (B).

With the spectra of the different types of sample preparation, principal component analyses were performed, removing one outlier from the disc spectrum and two for the powdered material. In addition, a clone of the environment of João Pinheiro drastically reduced the fit of the model for starch analysis. This may have been due to errors in the execution of laboratory protocols. Thus, the spectra along with their reference values were discarded, justifying the N of 147 used for calibration of this characteristic.

Prior to calibration, all spectra were preprocessed by different techniques to eliminate or minimize variability that are not related to the characteristics studied. The best results, which gave the lowest RMSEcv values, were obtained using the Savitzky - Golay first derivative, with different points for each NSC evaluated. The graphs of the treated spectra are shown in Figure 2.

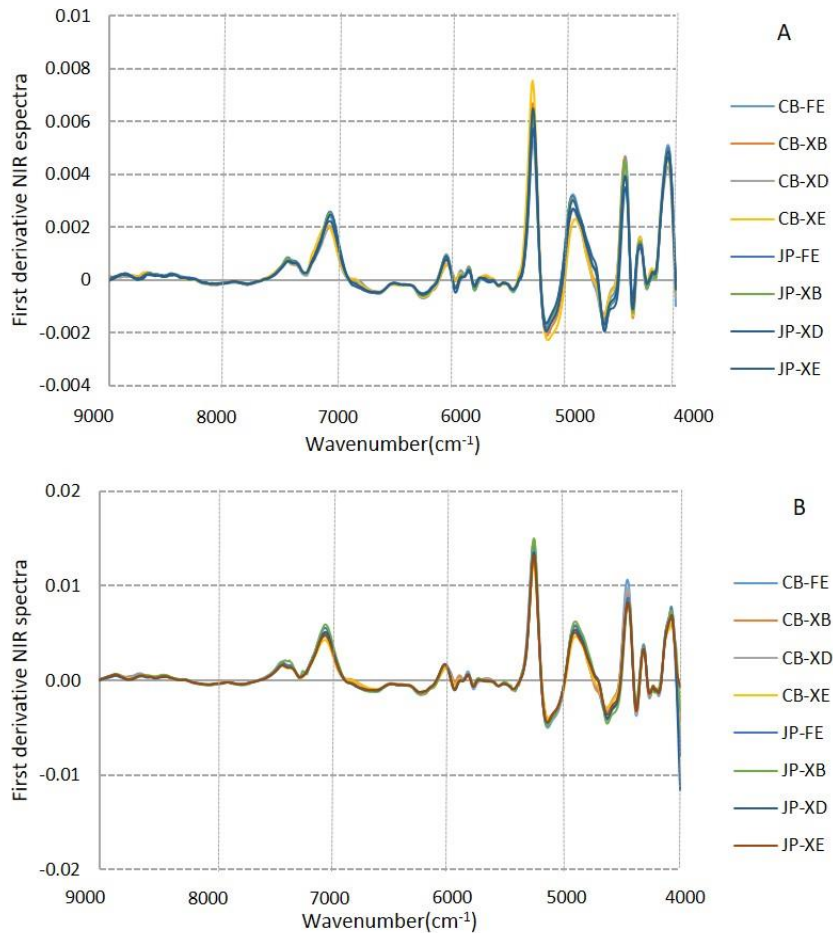


Figure 2. Spectra treated by the first derivative of the NIR collected on powder-reduced material (A) and the wood disc (B).⁻¹

Principal Component Analysis

The principal component analysis of spectra treated by the first derivative (Figure 3) were performed in the two physical forms, disc (1) and powder (2) to distinguish the locations of each material (Figure 3A), the clones present in the study (Figure 3B) and the growth rings (Figure 3C) of each tree sampled. In the disc, two distinct groups were formed for the different localities, but with some similarities between them, a factor that is associated with the different clones used, to the powder two distinct groups were formed, but with similar areas, a factor associated with the growth rings sampled, however the distinction of localities is more evident to the powder. No distinction or grouping was observed for the clones, considering the results obtained, except for the XB clone in the powder sampling. For the growth rings, with some similarities due to the divergent sites, 4 distinct groups were formed: group 1 (rings 1, 2, 3 and 4), group 2 (ring 5), group 3 (ring 6) and group 4 (ring 7). This divergence or grouping is deduced by the presence of active cells in the different types of

wood (adult or juvenile), specific physiological needs in each ring for the non-structural carbohydrates and the flow of these carbohydrates under different water regimes for the repair of the embolized vessels (Deslauriers et al., 2009; Nardini et al., 2011). In the powder, the distinction between localities was more evident than that represented by the spectra collected on the disc. For the clones, there was also more evident grouping and similarities, but for the different growth rings, the grouping is more noticeable in the disc material.

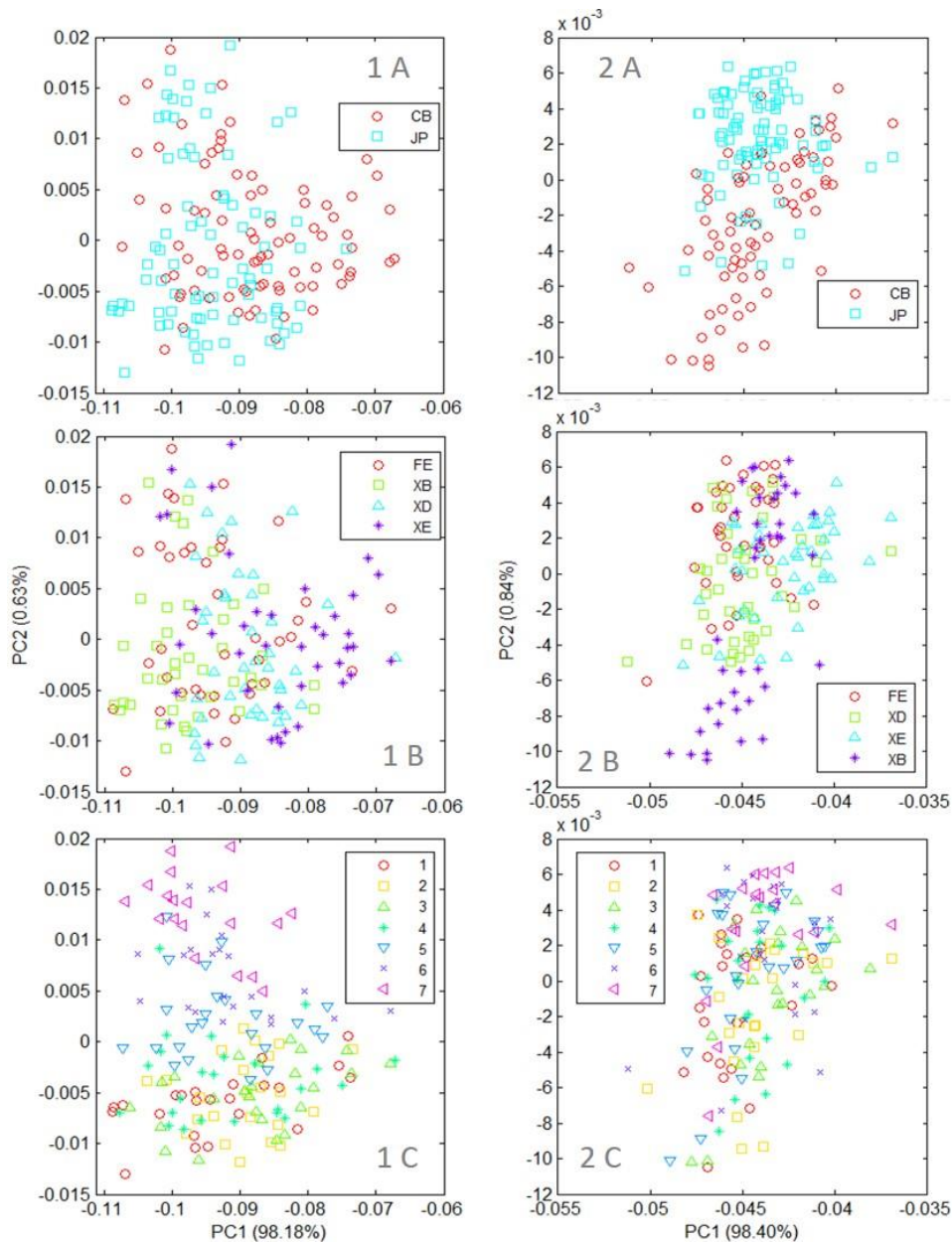


Figure 3. PCA scatter plot for the spectra indicating different localities (A), clones (B), growth rings of each sampled tree (C), Disc (1) and Powder (2); Growth rings: 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7.

Partial Least Squares Regression (PLS-R)

PLS-R of the spectra obtained by the NIR and the reference values produced satisfactory calibration models for all studied NSC (Table 1).

Table 1. Parameters of the PLS-R models according to the type of non-structural carbohydrate in wood discs and powder.

| NSC Models | Starch | | Sucrose | | Reducing sugars | | Total sugars | | Total NSC | |
|---------------------------------------|--------|--------|---------|--------|-----------------|--------|--------------|--------|-----------|--------|
| | Disc | Powder | Disc | Powder | Disc | Powder | Disc | Powder | Disc | Powder |
| Calibration | | | | | | | | | | |
| Number of samples | 97 | 98 | 110 | 107 | 110 | 108 | 110 | 109 | 109 | 105 |
| Number of outliers | 1 | 8 | 6 | 8 | 3 | 6 | 3 | 4 | 4 | 10 |
| LV | 10 | 10 | 12 | 10 | 7 | 10 | 6 | 10 | 7 | 13 |
| Minimum (%DM) | 0.19 | 0.19 | 0.02 | 0.03 | 0.25 | 0.03 | 0.29 | 0.06 | 0.49 | 0.49 |
| Maximum (%DM) | 15.52 | 12.17 | 0.85 | 0.85 | 39.07 | 39.07 | 39.34 | 39.34 | 40.01 | 40.01 |
| Mean (%DM) | 2.45 | 2.06 | 0.22 | 0.23 | 8.28 | 9.38 | 8.49 | 9.83 | 10.87 | 12.25 |
| SD (%DM) | 2.89 | 2.07 | 0.19 | 0.17 | 7.50 | 8.37 | 7.56 | 8.66 | 7.45 | 8.45 |
| R ² c | 0.83 | 0.92 | 0.93 | 0.92 | 0.80 | 0.95 | 0.79 | 0.95 | 0.79 | 0.97 |
| RMSEc (%DM) | 1.18 | 0.57 | 0.05 | 0.05 | 3.38 | 1.85 | 3.41 | 1.91 | 3.41 | 1.50 |
| Validation method Cross Validation | | | | | | | | | | |
| R ² cv | 0.67 | 0.69 | 0.84 | 0.83 | 0.73 | 0.89 | 0.73 | 0.90 | 0.69 | 0.89 |
| RMSEcv (%DM) | 1.66 | 1.16 | 0.07 | 0.07 | 3.86 | 2.72 | 3.90 | 2.78 | 4.18 | 2.77 |
| RPDcv | 1.75 | 1.79 | 2.70 | 2.24 | 2.01 | 3.08 | 1.94 | 3.11 | 1.79 | 3.04 |
| Validation method External Validation | | | | | | | | | | |
| Number of samples | 49 | 46 | 54 | 53 | 55 | 54 | 55 | 55 | 55 | 53 |
| Minimum (%DM) | 0.25 | 0.21 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.44 | 0.06 | 0.49 | 0.53 | 0.91 |
| Maximum (%DM) | 13.82 | 10.98 | 0.58 | 0.76 | 32.50 | 32.50 | 32.69 | 32.69 | 33.71 | 33.71 |
| Mean (%DM) | 1.78 | 1.59 | 0.22 | 0.17 | 11.04 | 9.25 | 11.26 | 9.53 | 12.60 | 10.54 |
| SD (%DM) | 2.59 | 2.14 | 0.14 | 0.17 | 8.71 | 7.94 | 8.75 | 7.97 | 8.29 | 7.83 |
| R ² p | 0.72 | 0.80 | 0.73 | 0.82 | 0.78 | 0.90 | 0.78 | 0.88 | 0.72 | 0.90 |
| RMSEp (%DM) | 1.38 | 1.03 | 0.07 | 0.06 | 4.31 | 2.54 | 4.34 | 2.76 | 4.38 | 2.58 |
| RPDp | 1.88 | 2.08 | 1.93 | 2.24 | 2.01 | 3.13 | 2.02 | 2.88 | 1.89 | 3.03 |
| Bias (%DM) ^a | 0.18 | -0.16 | 0.01 | -0.01 | -1.18 | 0.27 | -1.19 | 0.17 | -0.26 | 0.37 |

^a: mean of the estimated values - means of the measured values; LV: latent variable.

By the descriptive analysis of the mean, maximum, minimum and standard deviation, a high variation between the NSC of samples were observed. This was due to the difference between the two environments studied (Rainfall: Campo Belo - 1,406 mm annually and João Pinheiro - 1,241 mm), climate changes over time, carbohydrate mobility between rings, which marked the annual growth of the *Toona ciliata* and four different clones.

By observing separately, the parameters for the sampling performed on the discs, satisfactory calibration models were found to determine the NSC ($R^2_{cv} > 0.64$). The best model, when observed its validation with external data, was obtained for reducing sugars ($R^2_p = 0.79$ and $RMSE_p = 4.00\%$) and the worst for starch ($R^2_p = 0.71$ and $RMSE_p = 1.02\%$).

The material reduced to powder gave better calibration models compared to the data obtained straight from the disc ($R^2_{cv} > 0.69$). In the external validation, the best models were for reducing sugars ($R^2_p = 0.91$ and $RMSE_p = 2.39\%$) and the worst was again for starch ($R^2_p = 0.80$ and $RMSE_p = 1.03\%$). The parameters of the models found in this study are similar to

those found in the literature, however in different tissues and plant species(Chen et al., 2014; Ramirez et al., 2015; Quentin et al., 2017).

According to the classification of the coefficients of determination and the RPD referred by Saeys et al. (2005), it may be inferred that for the prediction of constituents of NSC, this will quantify approximately the contents of reducing sugars and total sugars. On the other hand, for starch, sucrose and total NSC, it would only be capable of discriminating their contents between highs and lows.

More accurate models were found in the analyses made on wood reduced to powder. According to the classification used, the contents of starch and sucrose can be quantified approximately, the total NSC will be predicted optimally and the reducing sugars and total sugars will be quantified with an excellent prediction.

The difference between the two forms of evaluation can also be observed by bias (Table 1). In general, the bias is greater for the sampling done on the disc, except for the analysis of the contents of starch, where it is smaller.

The collection of spectral signatures with the integrating sphere resulted in better fits when compared to the collection with the optical fiber probe. In addition to the sampling method, the physical structure of the wood must also have influenced this result. Hein et al. (2010) have stated that milled wood provides better results than solid wood on NIR prediction of chemical properties of *Eucalyptus urophylla*.

Figure 4 shows the relationship between the chemical reference values and the NIR-predicted values of the different structures analyzed. In general, the models yielded a satisfactory prediction power for the NSC content.

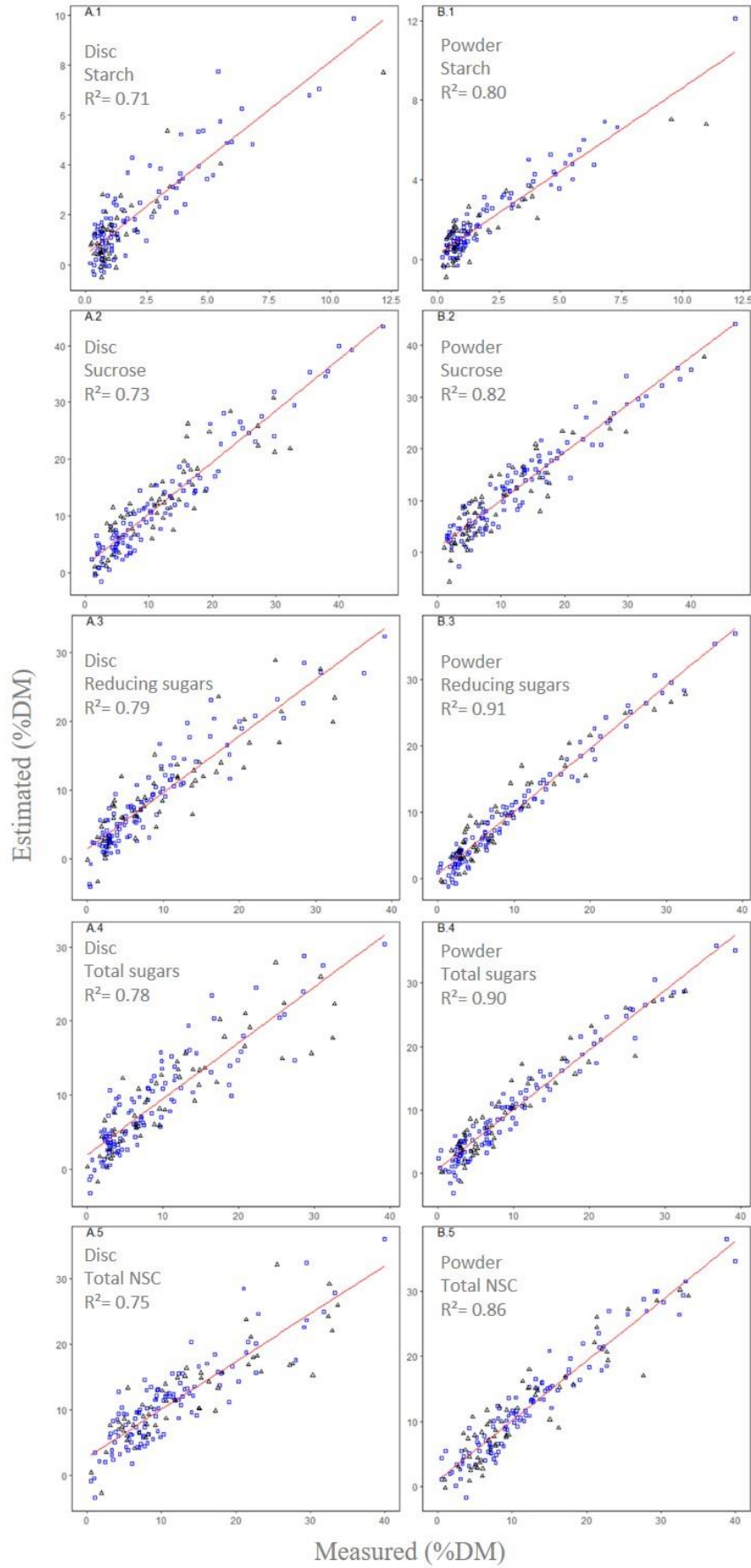


Figure 4. Correlation between the predicted values and the observed values for the contents of starch (1), sucrose (2) reducing sugar, (3) total sugars and (4) and total NSC (5) in *Toona ciliata* wood. Samples for the disc (A) and for the wood reduced to powder (B) are represented to the left and the right, respectively. Legend: \square cross-validation; Δ external validation.

From the partial least squares regression, we constructed the graph of each non-structural carbohydrates from the perspective of the wavelength versus regression coefficients for the disc and for the wood reduced to powder (Figure 5) in order to relate the largest regression coefficients, positive and negative, with the wavenumber where a given NSC is most expressed.

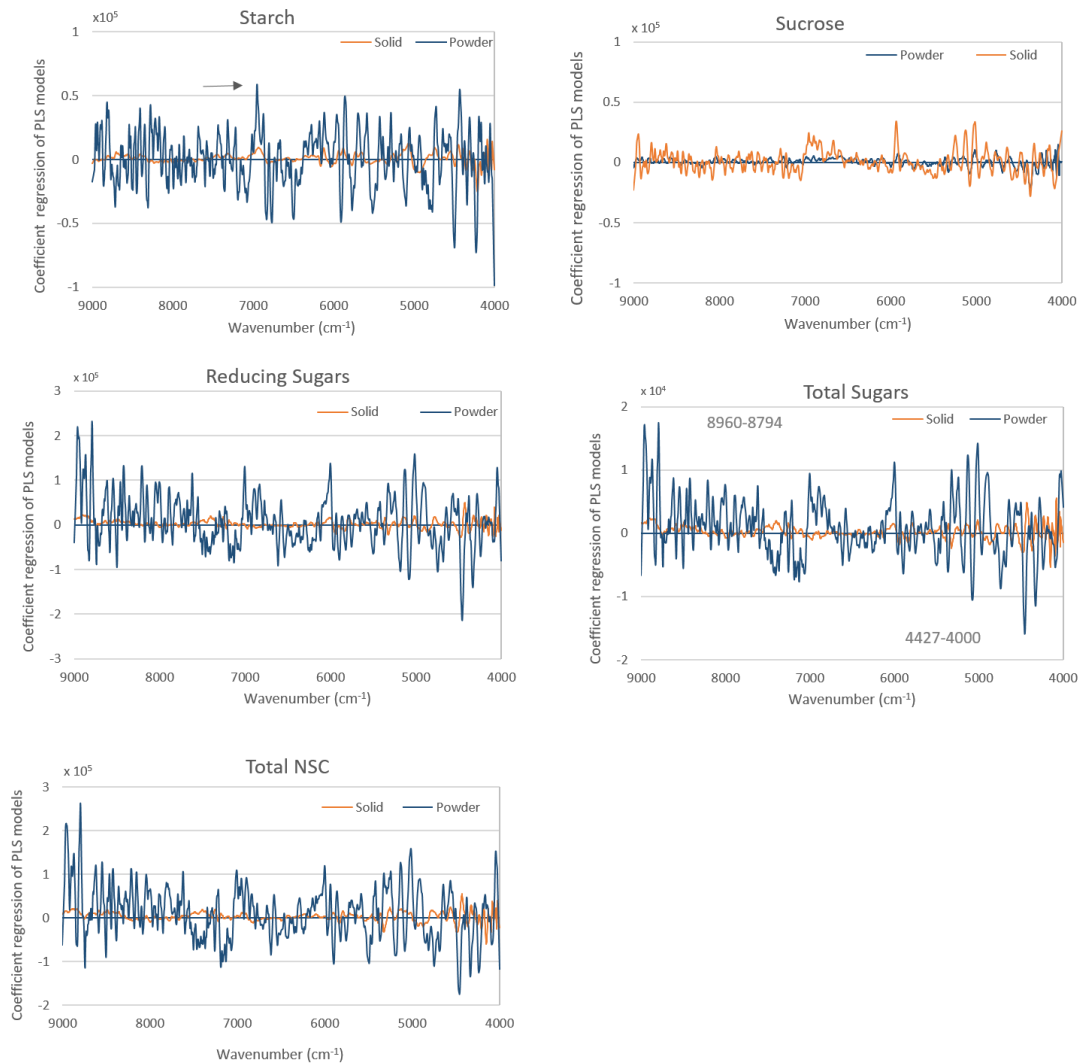


Figure 5. Partial least squares regression coefficients according to wavelengths for the non-structural carbohydrates in the disc and the powder of *Toona ciliata* wood obtained by the optical fiber and the integrating sphere.

The highest coefficients were found for the material reduced to powder, a fact associated with better penetration of the light beam in the spectral acquisition in the integrating sphere. The starch can be measured by the vibrational modes presented in the range of 4,200 to 4,000 cm⁻¹ in the wood reduced to powder, where there was also a peak at 6,954 cm⁻¹. For sucrose, the regression coefficients were not as expressive as the other NSC,

there was also a great variation in the relationship of the coefficients with the wavelength. Reducing sugars can be detected in wavelengths in the order of 4,400-4,000 cm^{-1} in the material reduced to powder there were also high relationships in the bands of 8,964-8,794 cm^{-1} . Total sugars were more present in the wavelength of 4,427-4,076 cm^{-1} , and in the material reduced to powder, there was also significant interference of wavelengths of 5,014 cm^{-1} and 8,960-8,794 cm^{-1} . For total NSC, the spectral range with the highest relationship was 4,458-4,000 cm^{-1} , while in the powder there was also a relationship with the wavelengths of 8,956-8,794 cm^{-1} . These peaks are in accordance with the information provided in Workman and Weyer (2007) and the band assignments in NIR spectra of wood reported in Schwanninger et al. (2011). However, some peak locations differ from those found by Quentin et al. (2017), who reported the most explanatory regression coefficients at wavelengths in the order of 5,180-5,200 cm^{-1} and 5,260-5,270 cm^{-1} for fructose and reducing sugars, respectively. According to Ramirez et al. (2015), the regions where sugars, starch and total carbohydrates were detected are located at wavelengths in the order of 5,747-5,555 cm^{-1} , 4,761-4,347 cm^{-1} and 4,149-4,016 cm^{-1} , respectively.

Partial least squares regression (PLS-R) analysis was also performed with 100% of the data (Table 2), thus obtaining a model for the quantification of NSC for other individuals.

Table 2. Parameters of the PLS-R models according to the type of NSC in the two sampled forms, in the disc and in the wood reduced to powder with 100% of the data.

| NSC Sampling | Starch | | Sucrose | | Reducing sugars | | Total sugars | | Total NSC | |
|--------------------|--------|--------|---------|--------|------------------|--------|--------------|--------|-----------|--------|
| | Disc | Powder | Disc | Powder | Disc | Powder | Disc | Powder | Disc | Powder |
| Calibration | | | | | | | | | | |
| Number of samples | 140 | 139 | 162 | 160 | 165 | 162 | 165 | 164 | 164 | 162 |
| Number of outliers | 7 | 8 | 6 | 8 | 3 | 6 | 3 | 4 | 3 | 4 |
| LV | 10 | 12 | 12 | 10 | 11 | 12 | 11 | 10 | 10 | 11 |
| Minimum (%DM) | 0.19 | 0.19 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.06 | 0.06 | 0.49 | 0.49 |
| Maximum (%DM) | 12.17 | 12.17 | 0.85 | 0.85 | 39.01 | 39.07 | 39.34 | 30.34 | 40.01 | 40.01 |
| Mean (%DM) | 1.91 | 1.91 | 0.21 | 0.21 | 9.20 | 9.34 | 9.42 | 9.73 | 11.45 | 14.28 |
| SD (%DM) | 2.12 | 2.10 | 0.17 | 0.17 | 8.01 | 8.21 | 8.05 | 8.41 | 7.77 | 9.21 |
| R ² c | 0.80 | 0.90 | 0.91 | 0.91 | 0.85 | 0.95 | 0.85 | 0.93 | 0.83 | 0.95 |
| RMSEc (%DM) | 0.94 | 0.66 | 0.05 | 0.05 | 3.04 | 1.76 | 3.06 | 2.18 | 3.19 | 1.92 |
| Validation method | | | | | Cross-validation | | | | | |
| R ² cv | 0.67 | 0.74 | 0.83 | 0.84 | 0.77 | 0.91 | 0.77 | 0.89 | 0.74 | 0.90 |
| RMSEcv (%DM) | 1.21 | 1.08 | 0.07 | 0.07 | 3.87 | 2.53 | 3.89 | 2.76 | 3.97 | 2.65 |
| RPDcv | 1.74 | 1.76 | 2.44 | 2.50 | 2.07 | 3.25 | 2.07 | 3.04 | 1.96 | 3.47 |

The results show that the PLS-R calibration ($R^2 > 0.82$), and cross-validation ($R^2 > 0.70$) presented satisfactory statistics for the models based on the disc spectra. The models allow the quantification of non-structural carbohydrates in the approximate values, for starch, and good predictions for the rest, considering R^2 . Based on the RPD and the classification

proposed by Saeys et al. (2005), the models will allow the starch to be quantified as high or low content, sucrose will be predicted as approximate values, total sugars and total NSC can be investigated with optimal predictions and, for sucrose, the association of measured values and estimates will be excellent.

These results, as well as the works by Batten et al. (1993), Decruyenaere et al. (2012), Ramirez et al. (2015) and Quentin et al. (2017) demonstrated the great potential of NIR in analyzing non-structural carbohydrates in various tissue types in plants.

Perspectives

This tool becomes more useful with the increasing number of samples to be analyzed, given the decrease in the time and reagents of laboratories demanded, as well as the economy in the workforce. One strategy would be to use the predictions of the NIR by the disc or core, taken from the trees, to group or classify the genotypes with low, medium and high values of NSC. When the number of individuals is smaller, the wood can be ground, which will take a little more time and labor, but it will be possible to quantify the NSC more precisely.

With satisfactory calibrated models for both types of samples, NIR spectroscopic models can be used for studies of *Toona ciliata* and other genera, assisting ecologists, physiologists, and genetic plant breeders to better understand the relationship between NSC with plant growth and mortality under influence of environmental stresses.

4 CONCLUSIONS

The models based on the NIR spectroscopy demonstrated applicability in the quantification of the non-structural carbohydrates in the *Toona ciliata* wood.

All the PLSR multivariate fits for the non-structural carbohydrates were better in the wood powder samples.

The lowest R^2 of the external validation was observed for starch in the two physical forms of samples, $R^2 = 0.71$ for the disc and 0.80 for the powder. The higher values were found for reducing sugars, $R^2 = 0.79$ for the disc and 0.90 for the powder.

The values of RPD followed the trend of R^2 and were lower for starch, 1.87 for the disc and 2.08 for the powder. The largest were for the reducing sugars, 2.13 for the disc and 3.19 for the powder.

The root mean square error (% DM) was lower for sucrose, 0.07% for the disc and 0.06% for the powder. While the largest errors were verified for the total non-structural carbohydrates, in the order of 4.80% for the disc and 2.59% for the powder.

Depending on the sample size, the use of the wood disc for collecting the spectra via optical fiber can be used for the qualitative determination of the samples. For the most precise quantification, wood must be reduced to powder, and the integrating sphere must be used for collecting the spectra.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Federal University of Lavras (Brazil), especially to the Wood Science and Technology Laboratory and Biology Department for supporting the experimental work and to Bela Vista Florestal for providing trees. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, process no. 405085/2016-8). P.R.G. Hein were supported by CNPq (process no. 303675/2017-9) grants.

REFERENCES

- BATTEN, G. D.; BLAKENEY, A. B.; MCGRATH, V.B.; CIAVERELLA, S. Non-structural carbohydrate: Analysis by near infrared reflectance spectroscopy and its importance as an indicator of plant growth. **Plant and Soil**, v. 155, n. 1, p. 243-246, 1993.
- BRUKER, Opus 5.5, Bruker Optik, Ettlingen, Germany. 2005.
- CHEN, S. F.; DANAQ, M. G. C.; SINGH, V.; & BROWN, P. J. Determining sucrose and glucose levels in dual-purpose sorghum stalks by Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 12, p. 2569-2576, 2014.
- DECRUYENAERE, V.; CLÉMENT, C.; AGNEESSENS, R.; LOSSEAU, C.; STILMANT, D. Development of near-infrared spectroscopy calibrations to quantify starch and soluble sugar in the roots of *Rumex obtusifolius*. **Weed research**, v. 52, n. 1, p. 1-5, 2012.
- DESLAURIERS, A.; GIOVANELLI, A.; ROSSI, S.; CASTRO, G.; FRAGNELLI, G.; TRAVERSI, L. Intra-annual cambial activity and carbon availability in stem of poplar. **Tree Physiology**, v. 29, n. 10, p. 1223-1235, 2009.
- HEIN, P. R. G.; LIMA, J. T.; CHAIX, G. Effects of sample preparation on NIR spectroscopic estimation of chemical properties of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake wood. **Holzforschung**. 6 (1): 45-54, 2010.
- HOCH, G.; RITCHER, A.; KORNER, C. Nonstructural carbon compounds in temperate forest trees. **Plant, Cell & Environment**, v. 26, n. 7, p. 1067-1081, 2003.
- KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Technometrics. Comp Aided Design Exp, v. 11, p. 137-148, 1969.
- KÖPPEN, W. **Climatologia**. México. Fundo de Cultura Econômica, 1948.
- LOCOSSELLI, G.; BUCKERIDGE, M.S. Dendrochemistry, a missing link to further understand carbon allocation during growth and decline of trees. **Trees**, v. 31, n. 6, p. 1745-1758, 2017.
- MCDOWELL, N. G.; BEERLING, D. J.; BRESHEARS, D. D.; FISHER, R. A.; RAFFA, K. F.; STITT, M. The interdependence of mechanisms underlying climate-driven vegetation mortality. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 26, n. 10, p. 523-532, 2011.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- NARDINI, A.; GULLO, M. A. Lo; SALLEO, S. Refilling embolized xylem conduits: is it a matter of phloem unloading? **Plant Science**, v. 180, n. 4, p. 604-611, 2011.

NUNES, C. A.; FREITAS, M. P.; PINHEIRO, A. C. M.; BASTOS, S. C. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, 2012.

O'BRIEN, M. J.; LEUZINGER, S.; PHILIPSON, C. D.; TAY, J.; HECTOR, A. Drought survival of tropical tree seedlings enhanced by non-structural carbohydrate levels. **Nature Climate Change**, v. 4, n. 8, p. 710, 2014.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy - A mature analytical technique with new perspectives - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1026, p. 8-36, 2018.

POPP, M.; LIED, W.; MEYER, A. J.; RITCHER, A.; SCHILLER, P.; SCHWITTE, H. Sample preservation for determination of organic compounds: microwave versus freeze-drying. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 10, p. 1469-1473, 1996.

QUENTIN, A. G.; BEADLE, C. L.; O'GRADY, A. P.; PINKARD, E. A. Effects of partial defoliation on closed canopy *Eucalyptus globulus* Labillardière: growth, biomass allocation and carbohydrates. **Forest Ecology and Management**, v. 261, n. 3, p. 695-702, 2011.

QUENTIN, A. G.; RODEMANN, T.; DOUTRELEAU, M. F.; MOREAU, M.; DAVIES, N.W.; MILLARD, P. Application of near-infrared spectroscopy for estimation of non-structural carbohydrates in foliar samples of *Eucalyptus globulus* Labillardière. **Tree Physiology**, v. 37, n. 1, p. 131-141, 2017.

RAMIREZ, J. A.; POSADA, J. M.; HANDA, I. T.; HOCH, G.; VOHLAND, M.; MESSIER, C.; REU, B. Near-infrared spectroscopy (NIRS) predicts non-structural carbohydrate concentrations in different tissue types of a broad range of tree species. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1018-1025, 2015.

SAEYS, W.; MOUAZEN, A. M.; RAMON, H. Potential for onsite and online analysis of pig manure using visible and near infrared reflectance spectroscopy. **Biosystems Engineering**, v. 91, n. 4, p. 393-402, 2005.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M.J.E. Smoothing and differentiation of data by simplified least-squares procedures. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 8, p.1627-1639, 1964.

SCHIMLECK, L. R. Near infrared spectroscopy: a rapid, non-destructive method for measuring wood properties and its application to tree breeding. **New Zealand Journal of Forestry Science**, v. 38, n. 1, p. 14-35, 2008.

SCHWANNINGER, M.; RODRIGUES, J.C.; FACKLER, K. A review of band assignments in near infrared spectra of wood and wood components. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 19, p. 287- 308, 2011.

TSUCHIKAWA, S. KOBORI, H. A review of recent application of near infrared spectroscopy to wood science and technology. **Journal of Wood Science**, v. 61, n. 3, p. 213, 2015.

VAN HANDEL, E. V. Direct microdetermination of sucrose. **Anal Biochem.** 22, p. 280-283, 1968.

VIANA, L.C.; TRUGILHO, P.F.; HEIN, P.R.G.; LIMA, J.T. SILVA, J.R.M. Predicting morphological characteristics and basic density of Eucalyptus wood using the NIRS technique. **Cerne**, v.15, n.4, 421-429, 2009

WANG, Y.; MAO, Z.; BAKKER, M. R.; KIM, J. H.; BRANCHERIAU, L.; LECLERC, R.; SELLI, L.; REY, H.; JOURDAN, C.; STOKES, A. Linking conifer root growth and production to soil temperature and carbon supply in temperate forests. **Plant and Soil**, v. 426, n. 1-2, p. 33-50, 2018.

WORKMAN, J.J.; WEYER L. Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 332 (2007)

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 64, p. 81-96, 1954.

ZANANDREA, I.; ALVES, J. D.; DEUNER, S.; DE GOULART, F. P.; HENRIQUE, P. D. C.; SILVEIRA, N. M. Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. **Australian Journal of Botany**, v. 57, n.8, p. 661-669, 2010.

**ARTIGO 2 - PLASTICIDADE FENOTÍPICA E CARBOIDRATOS NÃO
ESTRUTURAIS NOS ANÉIS DE CRESCIMENTO DE CLONES DE CEDRO
AUSTRALIANO EM AMBIENTES CONTRASTANTES**

**PHENOTYPIC PLASTICITY AND NONSTRUCTURAL CARBOHYDRATES IN
ANNUAL GROWTH RINGS OF THE AUSTRALIAN RED CEDAR CLONES IN
CONTRASTING ENVIROMENTS**

**Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2003) e formatado de acordo com o
Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações.**

RESUMO

As reservas dos carboidratos não estruturais (CNE) nas plantas são associadas ao seu crescimento e mecanismos de resiliência, quando expostas aos estresses ambientais, principalmente ao déficit hídrico do solo. Assim, objetivou-se, neste trabalho, estudar a influência dos conteúdos de CNE presentes no tronco sobre a sobrevivência, crescimento e plasticidade fenotípica para taxa de incremento de área seccional dos anéis de crescimento (IAS), bem como fornecer suporte para as seleções de genótipos de árvores mais resilientes, quando estas se deparam com secas mais severas e ou prolongadas. Os CNE avaliados (amido, sacarose, açúcares redutores, açúcares solúveis totais e CNE total) e o IAS foram estimados nos anéis anuais de crescimento do tronco, em discos de madeira retirados a 1,3 m do nível do solo em abril de 2017. Foram estudados dez clones (fd, fe, hf, md, mi, xd, xe, xf, xg, xi) de *Toona ciliata* M. Roem. var. *australis* (cedro australiano), com sete anos de idade e cultivados em dois sítios com condições de estresse hídrico contrastantes. Ambos os sítios se localizam no estado de Minas Gerais, sendo que os com menor e maior níveis de estresse hídrico se localizam em Campo Belo (CBL) e Cana Brava - distrito de João Pinheiro (CNB), respectivamente. As larguras dos anéis de crescimento de cada clone foram medidas e transformadas em IAS. Os efeitos médios dos clones e as suas plasticidades fenotípicas foram estimados por meio de modelos de regressões aleatórias e as correlações entre os parâmetros desses modelos foram analisadas pelos coeficientes da correlação de Pearson. Em CBL, todos os componentes de variância genética referentes às médias dos clones no tempo (um a sete anos) não foram significativas. No entanto, os componentes da plasticidade fenotípica para IAS e todos os CNE foram significativos, com exceção dos açúcares redutores. Já em CNB a significância desses componentes só não foi observada para o amido. Foram estimadas correlações altas e significativas de 0,96 e 0,97, entre a média de conteúdos de CNE total e a plasticidade fenotípica do IAS em CBL e CNB, respectivamente. A plasticidade fenotípica para IAS, quando correlacionada com a taxa de acúmulo de sacarose, foi alta e significativa apenas em CBL ($r = 0,82$), e quando correlacionada com a taxa de acúmulo de CNE total foi positiva e significativa ($r = 0,72$) para CBL e negativa e significativa ($r = -0,99$) para CNB. Observou-se que a média dos conteúdos de CNE, no ambiente menos estressante, não está relacionada com a sobrevivência dos clones. Enquanto que, no ambiente mais estressante, a sobrevivência dos clones é inversamente correlacionada com os valores médios açúcares redutores ($r = -0,90$) e das taxas de acúmulo de amido ($r = -0,91$), açúcares redutores ($r = -0,66$) e CNE total ($r = -0,99$), sugerindo que a depleção desses CNE foi necessária para a manutenção da vida das árvores. A maior performance e plasticidade fenotípica do clone “xd”, verificadas ao longo do tempo de estudo, mostraram que, dentre todos os clones estudados, este é o que se apresentou com maior resiliência, em ambas condições de estresse.

Palavras-chave: *Toona ciliata*. Déficit hídrico. Genótipo. Regressão aleatória. Seleção.

1 INTRODUÇÃO

As alterações no clima ocorridas no passado e suas conseqüentes pressões sobre as plantas são contextualizadas como as precursoras dos processos evolutivos e, conseqüentemente, das variações genéticas entre e dentro de populações de plantas (RAPP; WENDEL, 2005). É a partir dessas variações que as plantas expressam as suas diferenças na sensibilidade e na resposta aos estresses ambientais e, como conseqüência, surgem as oportunidades para se conhecer a capacidade de genótipos distintos nas plantas, quanto à percepção e sinalização para superar os obstáculos impostos por tais estresses, principalmente dos decorrentes de secas mais intensas e ou prolongadas (BECKLIN et al., 2016).

Dentre os mecanismos fisiológicos que provocam a mortalidade das plantas em decorrência de secas, pode-se destacar a privação de carbono e a falha hidráulica. A primeira causa ocorre quando a duração da seca é suficientemente longa para reduzir a fotossíntese e esgotar as reservas de carbono e, conseqüentemente, a manutenção do metabolismo. De forma não excludentes, a falha hidráulica ocorre quando a intensidade da seca atinge um nível limiar de dessecação, antes mesmo que haja a privação de carbono (McDOWELL et al., 2008).

À medida que a tensão do xilema aumenta em decorrência da seca, os açúcares tornam-se fundamentalmente importantes na osmorregulação, bem como na manutenção do fluxo de água no xilema (SECCHI; ZWIENIECKI, 2011). A base teórica para a referida manutenção surgiu na concepção de que a despolimerização do amido armazenado nas células do parênquima gera os açúcares que são responsáveis pela reparação do embolismo nos vasos xilemáticos (NARDINI et al., 2011). Posteriormente, Secchi; Zwieniecki (2012), tornaram essa teoria mais robusta ao evidenciar a capacidade das plantas em perceber a embolia e que a concentração de sacarose é o estímulo que permite às plantas desencadear o processo de resposta biológica para contornar o referido dano.

Várias outras pesquisas subsequentes reafirmaram que a tolerância dos indivíduos ao déficit hídrico é dependente da disponibilidade de carboidratos não estruturais e que as depleções de suas quantidades podem ser mensuradas e associadas aos níveis de déficit hídrico sofrido pelas plantas (MITCHELL et al., 2013; DIETZE et al., 2014, O'BREIN et al., 2014; SEVANTO et al., 2014, NARDINI et al., 2017; DAI, WANG, WAN, 2018; BLACKMAN et al., 2019; TRIFILÒ et al., 2019).

A plasticidade fenotípica conceituada por Bradshaw (1965) como sendo a capacidade de um mesmo genótipo em produzir diferentes fenótipos em resposta à variação ambiental se torna fundamental no processo de melhoramento genético da resistência à seca, uma vez que

as variações genéticas nas respostas de plasticidade podem predizer o grau de vulnerabilidade de espécies e populações sob o efeito das mudanças climáticas (KELLY, 2019).

Nas espécies arbóreas, os anéis de crescimento são importantes para fornecer informações do passado das árvores, indicando como as respostas nas características anatômicas da madeira estão relacionadas com os estresses abióticos ocorridos ao longo de suas vidas (MONTWÉ et al., 2016). Assim, considerando as variações mencionadas entre plantas para expressar as suas diferenças na sensibilidade e na resposta aos estresses ambientais e que o alburno do tronco é um compartimento importante de armazenamento de CNE (MAGEL et al., 2000), pode-se conjecturar que as variações nos padrões de crescimento radial do fuste, mensuráveis anualmente nos anéis de crescimento, podem estar relacionadas com as variações na dinâmica de armazenamento de amido e na sua posterior conversão em açúcares. Complementarmente, o conhecimento da magnitude dessa relação propiciará a formulação de bases estratégicas para o melhoramento genético da resiliência das árvores no tempo e nas diferentes intensidades de secas.

A forma para melhor expressar esse conhecimento é por meio de clones replicados e cultivados simultaneamente em diferentes ambientes, uma vez que, dessa forma, pode-se melhor estimar os valores médios das características de interesse de cada genótipo bem como as suas plasticidades (SCHEINER, 1993).

Dessa maneira, objetivou-se, neste estudo estudar em clones de *Toona ciliata* M. Roem. var. *australis* (cedro australiano) a influência dos conteúdos de amido, sacarose, açúcares redutores e a soma desses três carboidratos (CNE total), estocados nos seus anéis de crescimento do tronco das árvores, com a sobrevivência, crescimento e plasticidade fenotípica para o incremento da área seccional e selecionar genótipos mais resilientes quando estes se deparam com secas mais severas e ou prolongadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Locais de estudo e atividades de amostragem

O estudo foi conduzido em dois testes clonais, implantados em janeiro de 2010 e avaliados em 2017, no espaçamento 3 x 2 m nas duas localidades. O primeiro ambiente localiza-se, no distrito de Cana Brava - município de João Pinheiro, no noroeste do estado de Minas Gerais - Brasil (17° 23' 48"S e 45° 50' 05"W, 760 m acima do nível do mar). O clima, de acordo com Köppen (1948), é o Aw, tropical de savana com inverno seco - temperatura média do mês mais frio do ano superior a 18°C, inverno seco e com precipitação média inferior a 60 mm em pelo menos um dos meses dessa estação.

O outro ambiente está localizado no município de Campo Belo no sul do estado de Minas Gerais - Brasil (20°52'42"S e 45°16'28"W, 918 m acima do nível do mar). De acordo com Köppen (1948), a região é classificada como Cwa, o clima é temperado úmido com inverno seco - temperatura média do mês mais frio do ano se encontra entre -3°C e 18°; a precipitação média é inferior a 60 mm em pelo menos um dos meses do inverno; verão quente, com temperatura média do mês superior a 22°C.

Por motivos de comparação e para se obter o máximo do conteúdo de CNE em cada árvore, a coleta do material amostrado foi feita no final do período de crescimento, início do outono (meses de abril e maio).

Em cada ambiente, foram selecionados cinco árvores para cada um dos 10 clones estudados (fd, fe, hf, md, mi, xd, xe, xf, xg, xi). Além de evitar indivíduos suprimidos pela competição por clones vizinhos, tomaram-se os devidos cuidados em selecionar árvores sem danos visíveis, principalmente à altura do peito (DAP), para melhor individualização dos anéis de crescimento e não alteração da composição química da madeira.

Foram derrubadas 50 árvores em cada ambiente, sendo retirados na altura do peito dois discos com aproximadamente 40 mm de espessura. Destes, um foi utilizado para as análises dos CNE e o outro para avaliação da largura dos anéis de crescimento.

Em campo, os discos foram identificados e, aqueles que seriam utilizados para análises dos CNE, foram armazenados imediatamente em cooler com gelo para a diminuição da atividade enzimática e evitar possível oxidação até a chegada ao laboratório. Os discos foram aquecidos em forno micro-ondas na potência de 600 W por 90 segundos, para que ocorresse a desnaturação das enzimas (HOCH, RICHTER; KÖRNER, 2003) e, em seguida, secos em

estufa a 60° C até massa constante. Posteriormente, foram armazenados em freezer à -20 °C (GÉRARD; BRÉDA, 2014).

Já, os discos que foram utilizados para a avaliação do crescimento radial do fuste foram secos à temperatura ambiente (~25 °C). Para que os sete anéis de crescimento ficassem evidentes e individualizados os discos foram lixados.

2.2 Quantificações dos conteúdos de carboidratos não estruturais

Os conteúdos de amido, sacarose, açúcares redutores e CNE totais (soma do amido, sacarose e açúcares redutores) foram quantificados em cada anel de crescimento por meio da espectroscopia NIR utilizando modelos desenvolvidos por Rosado et al., (2019). Foram utilizados os modelos para predição de CNE na madeira sólida (discos), por ser o método mais rápido e menos laborioso para fenotipagem.

O espectrômetro FTNIR Bruker (Optik GmbH, Ettlingen, Germany), modelo MPA, dotado de esfera de integração e interferômetro foi utilizado para coletar os espectros diretamente na face transversal de cada disco, posicionado em dois pontos opostos de cada anel de crescimento, por meio da fibra óptica na gama de 12.500 cm^{-1} a 3.500 cm^{-1} com uma resolução espectral de 8 cm^{-1} em modo de reflexão difusa. Cada espectro representou a média de 16 varreduras.

2.3 Medições dos anéis de crescimento

Nas secções transversais dos discos lixados, foram marcadas oito posições radiais onde foram medidas as larguras dos anéis de crescimento utilizando o dispositivo LINTAB-TSAPTM (RINNTECH, 2017) com precisão de 0,01mm.

A largura que representa o crescimento radial em cada ano, foi calculado como a média aritmética da largura nas oito posições radiais do disco em cada anel de crescimento. A série de medidas das larguras dos anéis de crescimento foi convertida em área da secção transversal anual, conhecida como incremento de área seccional (IAS), utilizando o pacote do R, dplR 1.6.3 (BUNN, 2008).

Neste estudo, o IAS não foi padronizado de acordo com a abordagem clássica da dendrocronologia, uma vez que, de acordo com Avanzi et al., (2018) o uso de dados não transformados pode fornecer três possíveis vantagens: i) as dimensões fornecidas pelas transformações possuem uma menor clareza do significado biológico (REDMOND et al.,

2017); ii) preserva variações de baixa frequência associadas a tendências de longo prazo (ESPER et al., 2002); iii) maximiza a variação interindividual, por reter toda a informação registradas nos anéis de crescimento.

2.4 Análises estatísticas

2.4.1 Modelo de regressão aleatória

Por meio do pacote ASReml-R (BUTLER et al., 2009), um modelo de regressão aleatória foi utilizado para quantificar os efeitos da idade no IAS e nos CNEs nos clones de cedro australiano em cada ambiente separadamente.

Nas variáveis de efeitos fixos, para facilitar interpretações de plasticidade fenotípica e comparações entre as variáveis respostas, os anos das árvores foram inseridos como um termo quadrático.

Para estimar as variâncias dos interceptos e inclinações das trajetórias das curvas (σ^2_{li}) em todas as variáveis, o fator aleatório de clone foi inserido. Dessa forma, também é possível estimar para cada clone, os parâmetros (b_i), que representam as respostas dos clones no tempo. O modelo, a partir de PINHEIRO; BATES (2000), é:

$$y_{ki} = (\beta_0 + b_{0i}) + (\beta_1 + b_{1i})x_{ki} + \dots + \varepsilon_{ki} \quad (1)$$

em que y_{ki} é a variável resposta no k^{th} ano no clone i , β_0 e β_1 são os parâmetros do efeitos fixos dos interceptos e inclinações, b_{0i} e b_{1i} são os parâmetros dos interceptos e inclinações do clone i^{th} , x_{ki} é a variável explicativa no k^{th} ano no clone i^{th} e, ε_{ki} é o erro dentro de clones que é assumido com distribuição normal, $\varepsilon_{ki} \sim N(0, \sigma^2)$.

Para evitar que os resíduos não sejam independentes, em decorrência da autocorrelação entre as medições nas árvores no tempo, uma estrutura auto regressiva de 1ª ordem heterogênea (AR1H) foi incluída no modelo.

Outra matriz de variâncias-covariâncias, a de correlação heterogênea, foi assumida entre os efeitos aleatórios do intercepto e inclinação.

O teste Likelihood Ratio Test (LRT) foi feito para verificar a significância de cada efeito aleatório no modelo.

2.4.2 Informações genéticas

A partir das análises de regressões aleatórias foram obtidas as predições dos valores genotípicos para cada clone, conhecidos como Best Linear Unbiased Prediction (BLUPs) ou, neste caso, parâmetros das trajetórias das curvas (b_i). Os efeitos aleatórios foram estimados via solução do sistema de equações de Henderson (1975) e os componentes de variância por meio da máxima verossimilhança residual ou restrita (REML) (PATTERSON; THOMPSON, 1971).

Com os componentes de variâncias, estimou-se a herdabilidade na média dos clones de acordo com a seguinte expressão:

$$h_m^2 = 1 - \frac{\overline{PEV}}{\overline{\sigma_g^2}} \quad (2)$$

em que: \overline{PEV} é a variância média dos erros de predição e $\overline{\sigma_g^2}$ é a variância genética dos b_i dos clones.

Os parâmetros referentes às inclinações de cada genótipo significam a plasticidade fenotípica (G x E). No entanto, tal referência não pode ser utilizada para as inclinações dos CNE, já que esses sofrem modificações no tempo que não são avaliadas neste estudo. Esses parâmetros significam como cada clone gasta ou economiza as suas reservas no tempo, ou seja, a taxa de acúmulo no tempo.

2.4.3 Correlações entre interceptos e inclinações

A influência dos b_i das trajetórias das curvas dos CNEs nos b_i do crescimento dos clones foi calculada pelo coeficiente de correlação de Pearson e as significâncias estatísticas dessas correlações foram testadas, utilizando-se o procedimento bootstrap, por meio do pacote do R, boots (CATHY; RIPLEY, 2017; DE CÁSSIA PEREIRA et al., 2017).

A caracterização e o destaque das relações existentes entre todos os clones e as variáveis analisadas no tempo foram feitos utilizando-se a análise de componentes principais (ACP), com representação gráfica via biplot, por meio do pacote R, factoextra (KASSAMBARA; MUNDT, 2017) e FactoMineR (LÊ et al., 2008). Com essa análise multivariada é possível representar, na mesma dimensão, as variáveis fisiológicas e de crescimento dos clones de cedro australiano.

Todas as análises foram feitas utilizando o ambiente do software R (R Development Core Team, 2016).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises descritivas

As anomalias no crescimento radial do tronco de árvores de cedro australiano, normalmente, resultam na formação de falsos anéis, os quais podem gerar erros interpretativos em estudos dendrocronológicos (HENRICH; BANKS, 2006). Entretanto, por se tratar de uma espécie decídua, cujas árvores foram cultivadas em testes clonais em dois ambientes com períodos de chuva e seca bem definidos, foi possível visualizar facilmente os seus anéis de crescimento que são tipicamente porosos e constatar a formação de anéis anuais de crescimento. Consequentemente, isso permitiu medir o incremento anual da área seccional (IAS) e estimar os conteúdos CNE por anel, pela técnica NIR. As médias dessas avaliações estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores médios referentes ao incremento de área seccional dos anéis de crescimento (IAS), os conteúdos de carboidratos não estruturais (CNE) em porcentagem de matéria seca (% MS): amido, sacarose, açúcares redutores (AR) e CNE total (soma dos conteúdos de amido, sacarose e açúcares redutores) e sobrevivência em campo (Sob) dos clones de cedro australiano, cultivados em Campo Belo e Cana Brava.

(continua)

| Ambientes | Clones | IAS (cm ²) | Amido (%MS) | Sacarose (%MS) | AR (%MS) | CNE total (% MS) | Sob (%) |
|---------------|--------|---------------------------|----------------|-------------------|--------------|---------------------|------------|
| Campo Belo | Média | 46,78 ± 36,58 | 2,33 ± 2,82 | 0,17 ± 0,13 | 3,72 ± 3,73 | 6,30 ± 4,73 | 95 |
| | fd | 23,96 ± 13,3 | 1,50 ± 2,15 | 0,10 ± 0,08 | 0,58 ± 1,20 | 2,03 ± 3,04 | 100 |
| | fe | 52,85 ± 31,12 | 3,32 ± 3,06 | 0,16 ± 0,15 | 2,96 ± 2,59 | 6,92 ± 4,64 | 96 |
| | hf | 47,78 ± 31,62 | 1,37 ± 2,47 | 0,18 ± 0,12 | 4,66 ± 4,26 | 6,65 ± 4,54 | 93 |
| | md | 41,64 ± 36,73 | 3,77 ± 3,92 | 0,24 ± 0,17 | 7,20 ± 4,5 | 11,11 ± 5,79 | 94 |
| | mi | 32,82 ± 23,98 | 2,11 ± 2,21 | 0,20 ± 0,10 | 6,55 ± 4,94 | 9,21 ± 4,96 | 96 |
| | xd | 79,41 ± 36,67 | 1,95 ± 2,10 | 0,14 ± 0,08 | 3,06 ± 2,77 | 4,70 ± 2,59 | 100 |
| | xe | 63,03 ± 38,89 | 2,73 ± 2,75 | 0,18 ± 0,18 | 3,87 ± 2,22 | 6,60 ± 3,42 | 89 |
| | xf | 57,23 ± 45,46 | 2,26 ± 3,54 | 0,17 ± 0,14 | 2,30 ± 2,60 | 5,05 ± 4,38 | 100 |
| | xg | 53,72 ± 36,58 | 1,40 ± 1,60 | 0,13 ± 0,07 | 2,22 ± 2,34 | 3,82 ± 2,49 | 93 |
| | xi | 15,32 ± 7,22 | 2,92 ± 2,75 | 0,18 ± 0,13 | 3,81 ± 3,2 | 6,92 ± 3,61 | 88 |
| Cana Brava | Média | 8,7 ± 5,52 | 1,79 ± 1,49 | 0,25 ± 0,15 | 11,29 ± 6,78 | 13,63 ± 6,07 | 53 |
| | fd | 7,45 ± 5,37 | 2,03 ± 1,52 | 0,27 ± 0,16 | 8,14 ± 6,59 | 10,51 ± 6,03 | 43 |
| | fe | 8,13 ± 3,62 | 1,79 ± 1,32 | 0,23 ± 0,13 | 9,96 ± 5,67 | 13,21 ± 4,58 | 68 |
| | hf | 6,56 ± 2,71 | 0,91 ± 1,47 | 0,30 ± 0,16 | 14,54 ± 6,3 | 15,96 ± 5,22 | 42 |
| | md | 7,77 ± 2,64 | 1,87 ± 1,55 | 0,28 ± 0,13 | 16,11 ± 8,24 | 18,59 ± 7,78 | 50 |
| | mi | 12,43 ± 6,95 | 1,79 ± 1,38 | 0,18 ± 0,16 | 12,47 ± 6,84 | 14,91 ± 6,94 | 46 |

Tabela 1- Valores médios referentes ao incremento de área seccional dos anéis de crescimento (IAS), os conteúdos de carboidratos não estruturais (CNE) em porcentagem de matéria seca (% MS): amido, sacarose, açúcares redutores (AR) e CNE total (soma dos conteúdos de amido, sacarose e açúcares redutores) e sobrevivência em campo (Sob) dos clones de cedro australiano, cultivados em Campo Belo e Cana Brava.

(conclusão)

| Ambientes | Clones | IAS (cm ²) | Amido (%MS) | Sacarose (%MS) | AR (%MS) | CNE total (% MS) | Sob (%) |
|------------|--------|---------------------------|----------------|-------------------|--------------|---------------------|------------|
| Cana Brava | xd | 14,27 ± 7,55 | 1,44 ± 0,91 | 0,17 ± 0,09 | 8,15 ± 5,01 | 9,90 ± 4,07 | 66 |
| | xe | 9,09 ± 5,54 | 1,94 ± 1,34 | 0,33 ± 0,17 | 12,75 ± 6,12 | 14,48 ± 5,66 | 53 |
| | xf | 6,91 ± 3,47 | 2,77 ± 1,76 | 0,30 ± 0,14 | 8,81 ± 5,14 | 11,61 ± 4,18 | 52 |
| | xg | 4,99 ± 2,04 | 2,01 ± 1,72 | 0,26 ± 0,14 | 9,87 ± 5,97 | 12,05 ± 4,71 | 50 |
| | xi | 9,44 ± 5,67 | 1,37 ± 1,16 | 0,22 ± 0,10 | 12,06 ± 6,87 | 15,07 ± 5,43 | 63 |

Fonte: Do autor (2019).

As médias do IAS, em todos os clones, foram melhores em Campo Belo (46,78 cm²) que em Cana Brava (8,7 cm²), em razão de suas características ambientais favoráveis ao desenvolvimento da espécie. O melhor clone para Campo Belo e Cana Brava foi o “xd” com 79,41 e 14,27 cm², respectivamente. Os menores valores de IAS foram observados nos clones “xi” (15,32cm²) em Campo Belo e “xg” (4,99 cm²) em Cana Brava.

As avaliações de concentração de CNE, na madeira das árvores, são facilmente e rapidamente mensuráveis quando se utiliza a espectroscopia no infravermelho próximo (ROSADO et al., 2019). Entretanto, essas avaliações não podem, por si só, serem interpretadas como sendo uma função de armazenamento de carbono pela planta, visto que essa função é resultante de assincronias temporais na oferta e demanda de compostos de carbono e que somente o amido é sintetizado exclusivamente para o armazenamento, sem exercer qualquer outra função metabólica nas plantas, como é o caso dos açúcares (HARTMANN; TRUMBORE, 2016).

A média de armazenamento de amido foi maior nas árvores cultivadas em Campo Belo (2,33% MS), sendo o maior valor encontrado para o clone “md” (3,77% MS) e o menor para “hf” (1,33% MS). Valores menores dos conteúdos de amido foram observados em Cana Brava, cujo clone “xf” apresentou maiores conteúdos e “hf” os menores, 2,77 e 0,91 %MS, respectivamente. Porém, quando comparados os clones plantados no ambiente favorável (Campo Belo) com o desfavorável (Cana Brava), o clone “xg” apresentou maior aumento na porcentagem de amido (+43,57%) e o “md” sofreu uma redução de -50,40%, conforme pode ser visualizado no Anexo - Tabela 1. Esse comportamento do clone “xg” pode estar relacionado com a estratégia na preferência de aumentar sua fonte de energia para

sobrevivência ou proteção contra efeitos abióticos (SAMI et al., 2016) e, também, amortecer as interações entre fonte-dreno, durante as diferentes condições ambientais, possibilitando, dessa forma, maior estabilidade de produção (SLEWINSKI, 2012).

Nos conteúdos de sacarose, açúcares redutores e CNE totais, foram encontradas as menores médias em Campo Belo, 0,17; 3,72 e 6,30% MS, respectivamente. Sendo o clone “md” o que apresentou os maiores valores e o “fd” os menores. Já, em Cana Brava, a média de sacarose foi de 0,25% MS, cujo clone “xe” apresentou valores de 0,33% e “xd” de 0,17% MS. Nos açúcares redutores a média foi de 11,29% MS sendo o clone “md” com o maior valor (16,11% MS) e “fd” o menor (8,14% MS) e, nos conteúdos de CNE totais, a média foi de 13,63% MS dos quais o clone com maior valor foi “md” e o menor “xd” com 18,59 e 9,90% MS, respectivamente. Ao comparar os clones nos dois ambientes, o clone “fd” quando plantado em Cana Brava, tendeu a despolimerizar mais os seus conteúdos de amido para açúcares (sacarose:+170% e açúcares redutores:+1303,45%) e CNE total (+417,73%), aumentando a concentração destes na madeira. Enquanto que, o clone “mi”, apresentou uma redução de -10% na sacarose, e os menores aumentos nos açúcares redutores +90,38% e dos CNE total +61,89%.

As maiores sobrevivências dentro do teste clonal para os referidos clones foram de 100% para os clones “fd”, “xd” e “xf” em Campo Belo. Em decorrência do ambiente mais estressante de Cana Brava, a sobrevivência dos clones foi menor, sendo que o melhor, nesse referido local foi “fe” com 68% de sobrevivência das árvores.

Nos dois ambientes, na análise interanual, tanto os níveis de amido, quanto os de sacarose foram relativamente constantes e muito baixos nos anéis mais velhos, que correspondem a região de formação do cerne, enquanto que na região de formação do alburno esses níveis foram crescentes. Os açúcares redutores e o CNE total apresentaram um aumento de concentração nos anéis formados entre o terceiro e o quarto ano, a partir daí ocorreram os decréscimos até o último anel (Anexo - Figura 1 - 4).

As concentrações de carbono circulante nos órgãos das plantas, fornecido pela fotossíntese, são utilizadas para estabelecer a premissa predominante de que a maior parte do carbono assimilado é utilizada no metabolismo da planta e na produção de biomassa e, apenas, uma menor fração é retida para formar os estoques de CNE (MARTÍNS-VILATA et al, 2016). Esses estoques são constituídos por uma mistura das duas referidas frações (amido e açúcares solúveis) que tem funções distintas, mas com interconversão entre elas, o que possibilita o entendimento do fluxo e consumo de fotoassimilados e reservas em diferentes escalas de tempo (DIETZE et al., 2014).

3.2 Análises dos modelos de regressão

O *likelihood ratio test* (LRT), conduzido para conhecer o comportamento da variância clonal, indicou que houve melhorias significativas nos ajustes do modelo dos fatores aleatórios e, também, que existem evidências de variabilidade genética (Tabela 2).

Partindo de uma regressão aleatória de um modelo completo, ou seja, com os efeitos do intercepto e inclinação, pode-se observar que os componentes de variâncias são diferentes de zero a partir dos modelos parciais, sem o intercepto e ora sem a inclinação. O teste LRT foi conduzido em todas as variáveis, considerando apenas os efeitos dos clones, nesse teste preliminar, os clones foram considerados significativos para o IAS e para todos os CNE, com exceção do amido.

Outro ponto a ser observado é que os testes foram feitos com dois graus de liberdade para o teste de qui-quadrado, já que este utilizou duas (co)variáveis no modelo com inclinação aleatória: a variância dos interceptos ou de inclinações dos clones e a correlação entre eles.

Em Campo Belo, todos os componentes de variâncias para as inclinações das trajetórias apresentaram significância [$\text{Pr}(>\text{Chisq})$], com exceção dos açúcares redutores. Isso demonstra a existência de plasticidade fenotípica (G x E) para o IAS e que, também, existe diferença entre os clones quanto aos seus padrões de acúmulo de CNE. Com relação aos componentes de variâncias dos interceptos que representaram as variâncias entre clones, em cada variável, não foram significativos.

Tabela 2 - Análise de deviance (ANADEV) para o incremento de área seccional dos anéis de crescimento (IAS) e os conteúdos de carboidratos não estruturais (CNE): amido, sacarose, açúcares redutores e CNE total (soma dos conteúdos de amido, sacarose e açúcares redutores) em clones de cedro australiano no município de Campo Belo - MG e Cana Brava - MG.

(continua)

| Variáveis | Modelo* | Df | Campo Belo | | | Cana Brava | | |
|-----------|---------|----|------------|-------|------------|------------|-------|------------|
| | | | deviance | Chisq | Pr(>Chisq) | deviance | Chisq | Pr(>Chisq) |
| IAS | m_i | 9 | -2444,80 | 17,65 | 0,00 | -1185,7 | 29,33 | 0,00 |
| | m_s | 9 | -2427,16 | 0,00 | 1,00 | -1166,2 | 9,79 | 0,01 |
| | m_i_s | 11 | -2427,15 | | | -1156,4 | | |
| Amido | m_i | 9 | -305,39 | 21,54 | 0,00 | -221,53 | 5,48 | 0,06 |
| | m_s | 9 | -287,37 | 3,52 | 0,17 | -216,05 | 0,00 | 1,00 |
| | m_i_s | 11 | -283,85 | | | -216,05 | | |
| Sacarose | m_i | 9 | 1572,78 | 7,38 | 0,02 | 1456,73 | 18,79 | 0,00 |
| | m_s | 9 | 1578,71 | 1,45 | 0,49 | 1458,62 | 16,90 | 0,00 |
| | m_i_s | 11 | 1580,15 | | | 1475,52 | | |

Tabela 2 - Análise de deviance (ANADEV) para o incremento de área seccional dos anéis de crescimento (IAS) e os conteúdos de carboidratos não estruturais (CNE): amido, sacarose, açúcares redutores e CNE total (soma dos conteúdos de amido, sacarose e açúcares redutores) em clones de cedro australiano no município de Campo Belo - MG e Cana Brava - MG.

(conclusão)

| Variáveis | Modelo* | Df | Campo Belo | | | Cana Brava | | |
|-------------|---------|----|------------|-------|------------|------------|-------|------------|
| | | | deviance | Chisq | Pr(>Chisq) | deviance | Chisq | Pr(>Chisq) |
| Aç, Redutor | m_i | 9 | -1045,20 | 0,02 | 0,99 | -1336,7 | 9,24 | 0,01 |
| | m_s | 9 | -1048,75 | 3,57 | 0,17 | -1341,1 | 13,61 | 0,00 |
| | m_i_s | 11 | -1045,18 | | | -1327,5 | | |
| CNE total | m_i | 9 | -1228,88 | 10,88 | 0,00 | -1383,5 | 5,87 | 0,05 |
| | m_s | 9 | -1223,34 | 5,33 | 0,07 | -1392,9 | 15,35 | 0,00 |
| | m_i_s | 11 | -1218,00 | | | -1377,6 | | |

Fonte: Do autor (2019).

Modelo completo (m_i_s), modelo parciais sem o efeito de inclinação (m_i) e sem a inclinação (m_s).

Os clones plantados no ambiente estressante de Cana Brava, não apresentaram variância nas inclinações com relação aos conteúdos de amido ($Pr = 0,06$), indicando que, nesse ambiente, quando os níveis de amido se tornam baixos, as diferenças entre clones não podem ser detectadas. Contudo, é conhecido que as moléculas de amido são convertidas em açúcares (sacarose e redutores) para reparos da condutividade hidráulica e de embolismo, os quais estão associados às sobrevivências das espécies (PIPER, 2011; SIMARD et al., 2013; ROWLAND et al., 2015; SAVI et al., 2016; YOSHIMURA et al., 2016).

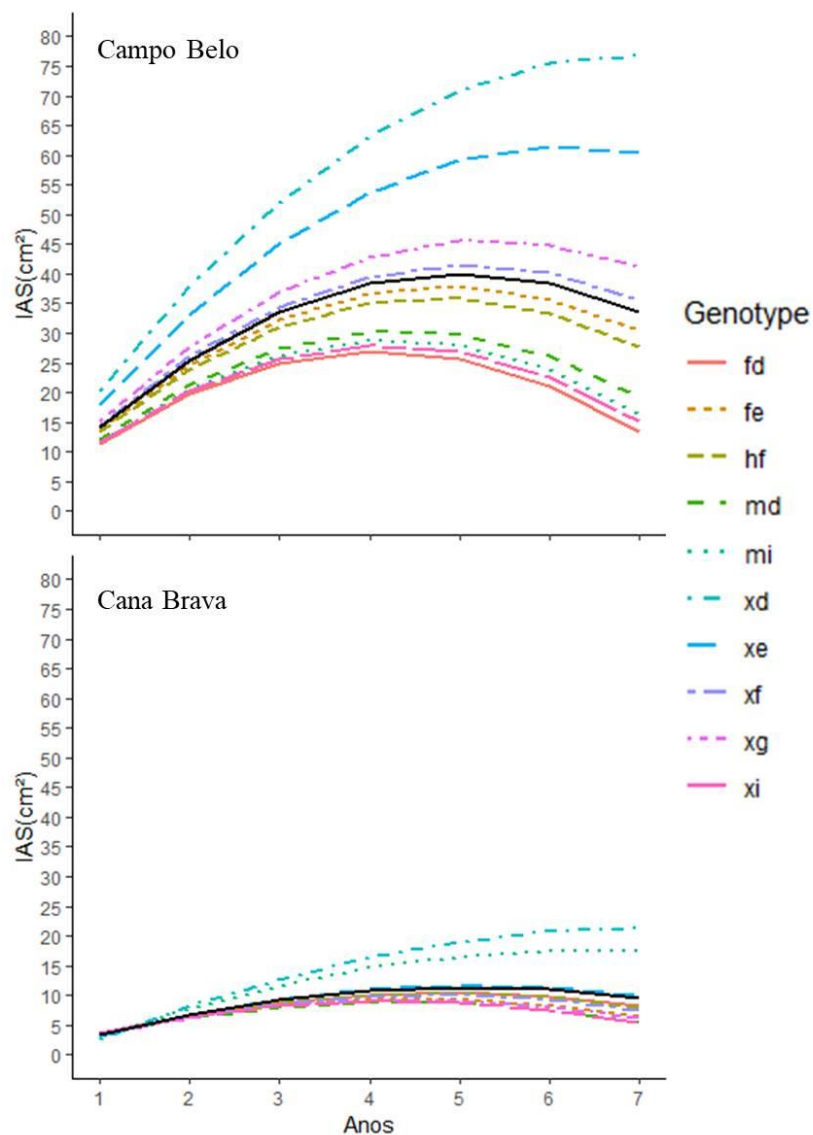
A mudança no balanço de fonte - dreno da espécie, quando negativo também está relacionada com sua proteção, por meio da osmorregulação e da produção de compostos secundários (THALMANN; SANTELIA, 2017; DUSENGE et al., 2019). Além disso, cada clone se manifesta diferentemente em relação aos padrões na taxa de acúmulo de sacarose e açúcares redutores no tempo (inclinações) e a diferença entre as médias do IAS (intercepto) passa a ser significativa.

Com base nos modelos ajustados, as trajetórias das curvas quadráticas para o IAS foram preditas (Figura 1). Esses gráficos reforçam os resultados das análises de LRT para cada parâmetro estimado e que cada clone possui diferentes curvas de crescimento durante os sete anos de avaliação.

No ambiente favorável de Campo Belo, os clones “xd” e “xe” se destacam como os melhores em relação ao IAS. Os clones “xg”, “xf”, “fe” e “hf” se comportam semelhante a média populacional. Os quatro genótipos menores em relação à média são: “md”, “mi”, “xi” e

“fd”. Em Cana Brava, o clone “xd” continua sendo o melhor, seguido do “mi” que teve uma melhora no ranqueamento. O “xe” passou a se comportar na média, juntamente com os clones “hf” e “xf”, que continuam no agrupamento intermediário com o “fd”. Os genótipos “md” e “xi” continuam sendo os menores nos dois ambiente e que também compõem os clones “fe”, “xg” que caíram na classificação.

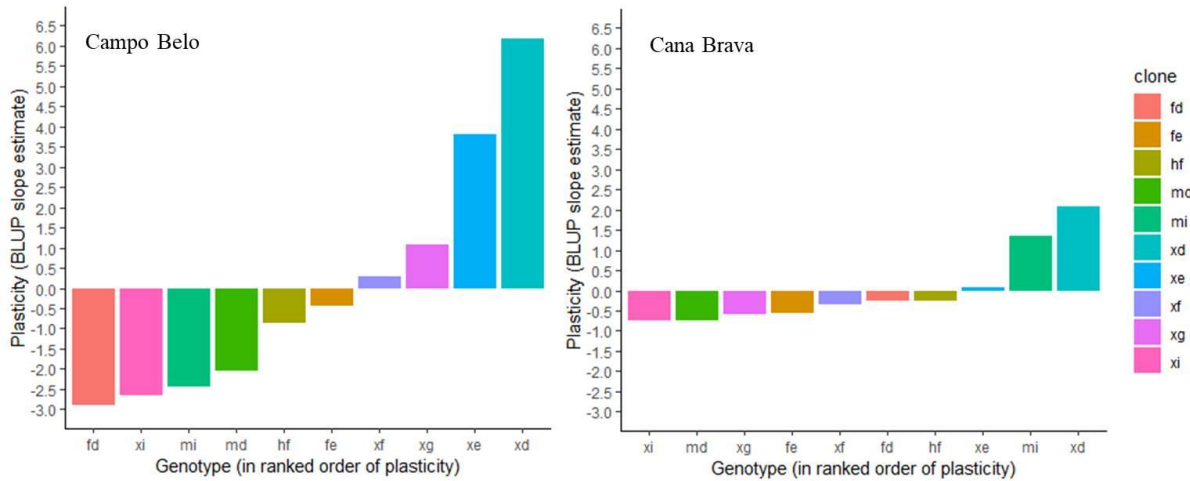
Figura 1 - Predição da trajetória do incremento de área seccional (IAS) dos clones de cedro australiano nos ambientes de Campo Belo e Cana Brava. Linha contínua e preta refere-se à média da população.



Fonte: Do autor (2019).

Nesse caso, para a identificação dos clones com respostas plásticas no tempo, os coeficientes de inclinação de cada genótipo foram extraídos, para a realização do ranqueamento, conforme apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Ranqueamento dos clones por ordem das estimativas de plasticidade no Incremento de Área Seccional (IAS) em Campo Belo e Cana Brava.



Fonte: Do autor (2019).

A abordagem dos modelos mistos de regressão aleatória é eficiente e apropriada estatisticamente para estimar a plasticidade fenotípica e descrever as respostas no nível de população e da variação entre clones (NUSSEY et al., 2007; MORRISSEY, LIEFTING, 2016; ARNOLD, KRUK, NICOTRA, 2019). Essa mesma metodologia está sendo utilizada em alguns estudos para estimar as mudanças ocorridas nas idades das árvores e na avaliação da interação genótipos por ambientes no melhoramento de plantas (PUJOL et al., 2014; ALVES et al., 2017; SUN et al., 2017; MARCHAL et al., 2019).

Considerando os dois ambientes avaliados, houve mudanças no ranqueamento da plasticidade fenotípica. Os clones “xd” e “xe”, em Campo Belo, e “xd” e “mi” em Cana Brava, foram classificados com plasticidade fenotípica adaptativa, pois apresentaram melhora do desempenho no tempo (PIGLIUCCI et al., 2001; SULTAN, 1995). Enquanto que os clones “xg”, “xf”, “fe” e “hf” (Campo Belo), e “xe”, “hf”, “fd” e “xf” (Cana Brava), foram considerados com plasticidade fenotípica não adaptativa, por não estarem relacionadas com o desempenho e, os clones “md”, “mi”, “xi” e “fd” (Campo Belo) e “fe”, “xg”, “md” e “xi” (Cana Brava) são considerados mal adaptados por reduzirem seu desempenho nas mudanças de ambiente (PIGLIUCCI et al., 2001; NEWMAN, 1992; VAN KLEUNEN, FISCHER, 2005; ARNOLD, NICOTRA, KRUK, 2019).

Na Tabela 3, pode-se observar as variâncias genéticas dos parâmetros dos modelos referentes às variáveis analisadas e quantificar o quanto esses padrões foram definidos por fatores genéticos.

Tabela 3- Estimativas dos parâmetros genéticos em Campo Belo e em Cana Brava para o incremento de área seccional dos anéis de crescimento (IAS) e os conteúdos de carboidratos não estruturais (CNE): amido, sacarose, açúcares redutores (AR) e CNE total (soma dos conteúdos de amido, sacarose e açúcares redutores) em clones de cedro australiano.

| Local | Parâmetros | Amido | Sacarose | AR | CNE total | IAS |
|------------|----------------------|--------------------------|----------|----------|-----------|--------------------------|
| Campo Belo | Var. gen. intercepto | 0,08128 | 0,00009 | 1,30218 | 1,04788 | 1,60 x 10 ⁻⁰⁶ |
| | PEV intercepto | 0,03859 | 0,00003 | 0,31599 | 0,40342 | 2,32 x 10 ⁻⁰⁷ |
| | h ² m | 0,53 | 0,66 | 0,76 | 0,62 | 0,85 |
| Cana Brava | Var. gen. intercepto | 1,64 X 10 ⁻⁰⁷ | 0,00333 | 13,93020 | 13,22072 | 1,84681 |
| | PEV intercepto | 6,32 X 10 ⁻⁰⁸ | 0,00087 | 3,96671 | 3,65384 | 0,37934 |
| | h ² m | 0,61 | 0,74 | 0,72 | 0,72 | 0,79 |

Fonte: Do autor (2019).

Apesar das variâncias genéticas para amido não serem significativas, as estimativas dos componentes de herdabilidade no sentido amplo ou clonal apresentadas na Tabela 3, para essa molécula, foi estimada com o objetivo de verificar a confiabilidade entre os valores genéticos reais e os estimados. A maior herdabilidade dos clones em Campo Belo foi observada para o IAS ($h^2m = 0,85$) e o menor para amido ($h^2m = 0,53$). Em Cana Brava, a herdabilidade média do IAS diminuiu para 0,79, mas continua a melhor dentre as características avaliadas. Esses valores de herdabilidades médias podem ser considerados como satisfatórios para todos os caracteres, indicando confiabilidade no valor fenotípico como indicador do valor genotípico (FALCONER et al., 1960). Isso possibilita o sucesso na seleção de genótipos superiores para alcançar ganhos genéticos nas referidas características de interesse.

3.3 Correlações entre interceptos e inclinações

Para entender as relações do crescimento dos diferentes clones de cedro australiano e a sua plasticidade fenotípica nos sete anos de plantio, em Campo Belo e Cana Brava, foi realizada correlação de Pearson entre os interceptos e inclinações dos conteúdos de carboidratos (Tabela 4).

Tabela 4 - Correlação de Pearson entre os interceptos e inclinações dos conteúdos de carboidratos não estruturais (CNE), incremento de área seccional (IAS) e sobrevivência dos clones de cedro australiano instalados nos municípios de Campo Belo e Cana Brava.

| Parâmetros | Variáveis | IAS | | | | Sobrevivência | |
|------------|----------------|------------|------------|------------|------------|---------------|------------|
| | | Intercepto | | Inclinação | | Campo Belo | Cana Brava |
| | | Campo Belo | Cana Brava | Campo Belo | Cana Brava | | |
| Intercepto | IAS | - | - | - | - | -0,10 | -0,58* |
| | Amido | 0,11 | -0,18 | 0,13 | -0,27 | -0,32 | -0,24 |
| | Sacarose | 0,07 | 0,00 | 0,07 | 0,01 | 0,00 | -0,45* |
| | Açúcar redutor | -0,27 | -0,62* | -0,29 | 0,65* | -0,58* | -0,90* |
| | CNE total | -0,19 | -0,59* | 0,96* | 0,97* | -0,14 | -0,58* |
| Inclinação | IAS | - | - | - | - | 0,81* | -0,92* |
| | Amido | -0,10 | -0,19 | -0,11 | -0,26 | -0,24 | -0,91* |
| | Sacarose | -0,12 | -0,04 | 0,82* | 0,04 | 0,00 | 0,00 |
| | Açúcar redutor | -0,32 | 0,38 | -0,29 | -0,41 | -0,46* | -0,66* |
| | CNE total | -0,13 | 0,60* | 0,72* | -0,99* | -0,11 | -0,99* |

Fonte: Do autor (2019).

* significância pelo bootstrap.

Considerando o intercepto do IAS, verificou-se que só houve correlações significativas entre as variáveis para Cana Brava. As correlações com as médias (intercepto) foram negativas para as variáveis açúcar redutor ($r = -0,62$) e CNE total ($r = -0,59$) e positivas para a taxa de acúmulo (inclinação) para CNE total ($r = 0,60$). Esses valores de correlação negativa indicam que quando a média de açúcar redutor e CNE total diminuem, a média de IAS aumenta, indicando que esses CNE são as principais fontes de energia para o crescimento radial do tronco.

Analisando a inclinação (plasticidade fenotípica) para o IAS constatou-se que a média dos CNE total está altamente e positivamente correlacionada ($r = 0,96$) para Campo Belo e ($r = 0,97$) para Cana Brava, assim como o açúcar redutor ($r = 0,65$) para esse ambiente. Isso indica que nos dois ambientes os aumentos na média nos conteúdos de CNE total estão diretamente ligados à plasticidade fenotípica dos clones. Por outro lado, os açúcares redutores em ambientes mais estressantes, também, estão diretamente relacionados com a plasticidade fenotípica, porém em um nível menor do que o CNE total.

A taxa de acúmulo de sacarose é apenas significativa no melhor ambiente ($r=0,82$), ou seja, quanto maiores as inclinações maiores serão os valores de plasticidade fenotípica do IAS dos clones. Na Tabela 4, apresentam-se comportamentos distintos, entre ambientes, nas correlações entre acúmulo de CNE total e plasticidade fenotípica. Em ambas as condições, essas correlações foram significativas, sendo positiva em Campo Belo ($r = 0,72$) e negativa

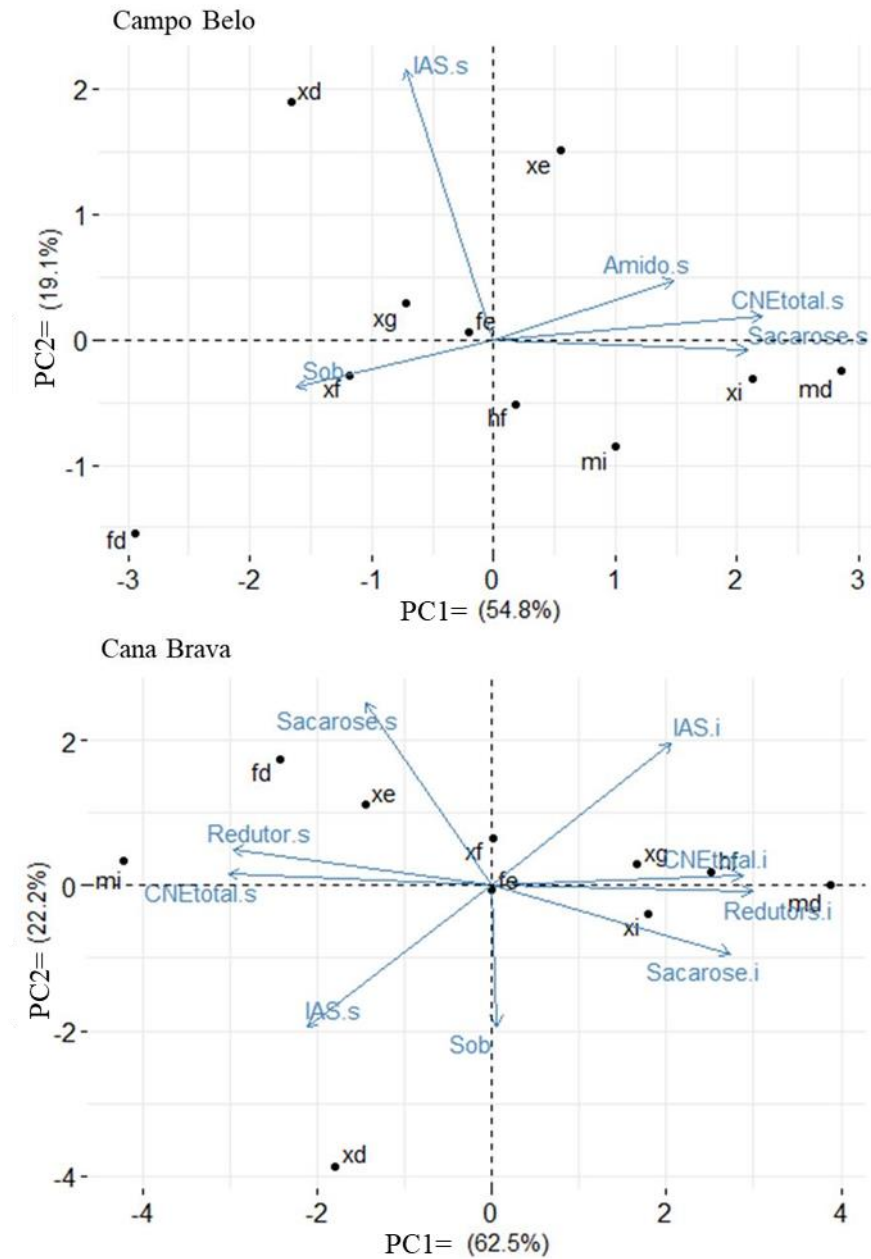
para Cana Brava ($r = -0,99$). Essa correlação negativa explica que em ambientes mais estressantes os aumentos na plasticidade fenotípica decorrem na redução da taxa de acúmulo de CNE total.

De forma geral, a média dos conteúdos de CNE no ambiente menos estressante não está relacionada com a sobrevivência dos clones, exceto na média do açúcar redutor ($r = -0,58$) e da taxa de acúmulo do mesmo ($r = -0,46$). No entanto, a diminuição da sobrevivência em ambientes mais estressantes está relacionada com a redução da média e com a taxa de acúmulo desses carbonos. Isso pode ser observado pelas correlações negativas com a sobrevivência.

A plasticidade fenotípica do IAS quando correlacionada com a sobrevivência apresenta comportamentos distintos entre ambientes. Em ambas as localidades essa correlação alta e significativa, sendo positiva ($r = 0,81$) para Campo Belo e negativa ($r = -0,92$) para Cana Brava, respectivamente. Essa correlação negativa em ambientes estressantes evidenciou a existência de um “tradeoff” onde, a maioria dos clones, pode estar investindo mais energia para manutenção da plasticidade fenotípica (FUSCO, MINELLI, 2010), em detrimento à manutenção de suas sobrevivências.

Para melhor explorar as relações entre as variáveis fisiológicas e de crescimento com a discriminação de cada clone nos dois ambientes, procedeu-se à análise de componentes principais nos gráficos Biplot (Figura 3). As variáveis que foram significativas em cada local, pelo teste LRT, estão representadas como vetores e os pontos são os 10 clones.

Figura 3 - Biplot dos parâmetros de crescimento (IAS), sobrevivência (Sob) e dos conteúdos de carboidratos não estruturais (amido, sacarose, açúcares redutores e CNE totais) nos dois primeiros componentes principais com a discriminação dos clones de cedro australiano. Variáveis seguidas de “i” são referentes aos interceptos e “s” das inclinações.



Fonte: Do autor (2019).

Em Campo Belo, os dois primeiros componentes, PC1 e PC2, explicaram 73,9% da variação total. As principais variáveis que contribuíram no PC1, foram a inclinação do CNE total (33,4%) e Sacarose (29,9%). Já no PC2, a inclinação do IAS (91,9%) teve a maior

contribuição. A dispersão dos clones no plano cartesiano indicou que houve divergência em relação às características avaliadas e, também, no agrupamento entre eles.

Observando a PC1 os clones “md” e “fd” apresentaram maiores distância. Isso ocorre porque o clone “md” possui altos valores nas taxas de acúmulos de sacarose, CNE total e amido. Já o clone “fd” contém menores valores nesses parâmetros de inclinações. Na PC2, a maior distância é vista entre “xd” e “fd” em razão, essencialmente, da plasticidade fenotípica (IAS.s) entre os anos de plantio em Campo Belo.

Quando se compara a trajetória do IAS (Figura 1) com o Biplot (Figura 2), os melhores clones, “xd” e “xe”, estão na maior distância e com uma correlação positiva na PC2. Os clones medianos: “fe”; “xf”; “hf” e “xg”, aqueles que seguem a mesma tendência da média populacional, estão concentrados próximos ao zero no gráfico. E, os piores, “md”, “mi” e “xi”, estão agrupados na parte mais positiva da PC1. O clone “fd”, pela distância entre os outros genótipos, se mostra divergente em relação a essas características.

A quantidade na taxa de acúmulo de amido, sacarose e CNE total parecem estar relacionadas com os clones de pior desempenho em Campo Belo e inversamente proporcionais com a sobrevivência do cedro.

Nesse plantio em campo, aqui considerado como ideal, a plasticidade fenotípica (IAS.s) nos diversos ambientes proporcionados pelo tempo não foi influenciada pelos CNE. No entanto, as maiores plasticidades estão relacionadas com os desempenhos do clone “xd” e “xe”.

Entretanto, em Cana Brava, os dois componentes principais plotadas explicaram 84,7% da variação total. Dentre as variáveis explicativas da PC1 as que mais contribuíram foram as inclinações do CNE total (17,1%) e dos açúcares redutores (16,5%) e, nos interceptos, os açúcares redutores (16,7%), CNE total (15,5%) e sacarose (14,0%). Na PC2, a inclinação da sacarose (33,7%), sobrevivência (19,8%) e o intercepto e inclinação do IAS, 20,4 e 19,9%, respectivamente, tiveram as maiores contribuições. Os clones continuam se mostrando divergentes no ambiente estressante, mas o clone “xd” se mostrou diferente dos demais.

Na PC1, os clones “md” e “mi” se mostraram os mais distantes. Nesse caso, o clone “md” possui maiores valores médios (interceptos) de CNE totais, açúcares redutores e sacarose e menores taxas de acúmulos no tempo (inclinação) de açúcares redutores e CNE totais, ao contrário do clone “mi”. Na PC2, novamente, temos as maiores distâncias para os clones “fd” e “xd”. A taxa de acúmulo no tempo (inclinação) de sacarose no clone “fd” é

maior, no entanto, a sobrevivência e a plasticidade fenotípica foram menores quando comparadas com o “xd”, que foi maior dentre todos os clones.

A plasticidade fenotípica está diretamente relacionada às taxas de acúmulo no tempo (inclinações) dos açúcares redutores, CNE totais e sobrevivência dos clones no ambiente estressante e inversamente proporcional aos valores médios (interceptos) de CNE total, açúcares redutores e sacarose.

Pode-se constatar, com esses resultados, que dentre os dez clones avaliados que o clone que se destacou como o melhor para ambos os ambientes, estressantes ou não, foi o “xd”. No entanto, o clone “xe” apresentou bom desenvolvimento no ambiente de Campo Belo e na média em Cana Brava. O contrário ocorreu com o clone “mi”, enquanto apresentava o pior desempenho no ambiente de Campo Belo mostrou plasticidade fenotípica, por meio da eficiência no aumento das taxas de acúmulo de açúcares redutores e CNE totais em Cana Brava.

4 CONCLUSÃO

A correlação negativa entre a média dos açúcares redutores nos anéis de crescimento e seus incrementos médios em área seccional indica que esses açúcares são relacionados com o crescimento radial do tronco e, portanto, eles têm implicações nas atividades de condução da floresta de cedro australiano.

Em condições mais estressantes, a plasticidade fenotípica é inversamente proporcional ao acúmulo de açúcares redutores e de carboidratos não estruturais totais produzidos pelas árvores, sendo esta, portanto, dependente da depleção desses carboidratos.

As médias e os acúmulos dos conteúdos de carboidratos, exceto açúcares redutores, no ambiente menos estressante não estão relacionadas com a taxa de sobrevivência. Em ambientes mais estressantes, o aumento dessa taxa está relacionada com a redução da média do acúmulo de carboidratos. Essa relação evidencia a existência de um “tradeoff” entre investimento energético na plasticidade fenotípica em detrimento da taxa de sobrevivência.

Seja para ambientes mais ou menos estressantes, é possível selecionar clones com melhor desempenho e plasticidade fenotípica para incremento de área seccional.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R. S. et al. **Evaluation of genotype x environment interactions in cotton using the method proposed by Eberhart and Russell and reaction norm models.** Embrapa Florestas-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2017.
- ARNOLD, P. A., KRUIK, L. E. B., NICOTRA, A. B. **How to analyse plant phenotypic plasticity in response to a changing climate.** *New Phytologist*, v. 222, n. 3, p. 1235-1241, 2019.
- ARNOLD, P. A., NICOTRA, A. B., KRUIK, L. E. B. **Sparse evidence for selection on phenotypic plasticity in response to temperature.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 374, n. 1768, p. 20180185, 2019b.
- AVANZI, C. et al. **Disentangling the effects of spatial proximity and genetic similarity on individual growth performances in Norway spruce natural populations.** *Science of the Total Environment*, v. 650, p. 493-504, 2019.
- BRADSHAW, A. D. **Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants.** In: **Advances in genetics.** Academic Press, p. 115-155. 1965.
- BECKLIN, K. M., et al. **Examining plant physiological responses to climate change through an evolutionary lens.** *Plant Physiology*, v. 172, n. 2, p. 635-649, 2016.
- BLACKMAN, C. J., et al. **Drought response strategies and hydraulic traits contribute to mechanistic understanding of plant dry-down to hydraulic failure.** *Tree physiology*, v. 39, n. 6, p. 910-924, 2019.
- BUNN, A. G. **A dendrochronology program library in R (dplR).** *Dendrochronologia*, v. 26, n. 2, p. 115-124, 2008.
- BUTLER, D. G. et al. **ASReml-R reference manual (version 3).** The State of Queensland, Department of Primary Industries and Fisheries: Brisbane, Qld, 2009.
- CATHY, A.; RIPLEY, B. **boot: Bootstrap R (S-Plus) functions.** R package version 1.3-20 CRAN R Project, 2017.
- DAI, Y., WANG, L., WAN, X. **Relative contributions of hydraulic dysfunction and carbohydrate depletion during tree mortality caused by drought.** *AoB PLANTS*, v. 10, n. 1, p. plx069, 2018.
- DE CÁSSIA PEREIRA, F et al. **Implications of the population effect in the selection of soybean progeny.** *Plant Breeding*, v. 136, n. 5, p. 679-687, 2017.
- DIETZE, M. C, et al. **Nonstructural carbon in woody plants.** *Annual review of plant biology*, v. 65, p. 667-687, 2014.
- DUSENGE, M. E., DUARTE, A. G., WAY, D. A. **Plant carbon metabolism and climate change: elevated CO₂ and temperature impacts on photosynthesis, photorespiration and respiration.** *New Phytologist*, v. 221, n. 1, p. 32-49, 2019.

- ESPER, J., COOK, E. R., SCHWEINGRUBER, F. H. **Low-frequency signals in long tree-ring chronologies for reconstructing past temperature variability.** *Science*, v. 295, n. 5563, p. 2250-2253, 2002.
- FALCONER, D. S. et al. **Introduction to quantitative genetics.** Introduction to quantitative genetics., 1960.
- FUSCO, G., MINELLI, A. **Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 365: 547-556, 2010.
- GÉRARD, B., BRÉDA, N. **Radial distribution of carbohydrate reserves in the trunk of declining European beech trees (*Fagus sylvatica* L.).** *Annals of Forest Science*, v. 71, n. 6, p. 675-682, 2014.
- HARTMANN, H., TRUMBORE, S. **Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees - from what we can measure to what we want to know.** *New Phytologist*, v. 211, n. 2, p. 386-403, 2016. doi:10.1111/nph.13955.
- HEINRICH, I., BANKS, J.C.G., **Tree-ring anomalies in *Toona ciliata*.** *IAWA Journal*. v.27, n. 2, p. 213-231. 2006.
- HENDERSON, C. R. **Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model.** *Biometrics*, p. 423-447, 1975.
- HOCH, G., RICHTER, A., KÖRNER, C. **Non-structural carbon compounds in temperate forest trees.** *Plant, Cell & Environment*, v. 26, n. 7, p. 1067-1081, 2003.
- KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. **Factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses**, v. 1, n. 3, 2017.
- KELLY, M. **Adaptation to climate change through genetic accommodation and assimilation of plastic phenotypes.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 374, n. 1768, p. 20180176, 2019.
- KÖPPEN, W. **Climatologia: con um estudo de los climas de la tierra.** México: Fondo de Cultura Economica, p. 478, 1948.
- KÖRNER, C. 2003. **Carbon limitation in trees.** *Journal of ecology*, v. 91, n. 1, p. 4-17, 2003.
- LÊ, S., JOSSE, J., HUSSON, F. **FactoMineR: an R package for multivariate analysis.** *Journal of statistical software*, v. 25, n. 1, p. 1-18, 2008.
- MAGEL, E., EINIG, W., HAMPP, R. **Carbohydrates in trees.** In: Anil Kumar, G., Narinder, K., eds. *Developments in crop science*. Amsterdam, the Netherlands:Elsevier, p 317-336. 2000.
- MARCHAL, A., et al. **Deciphering hybrid larch reaction norms using random regression.** *G3: Genes, Genomes, Genetics*, v. 9, n. 1, p. 21-32, 2019.

- MARTÍNEZ-VILALTA, J., et al. **Dynamics of nonstructural carbohydrates in terrestrial plants: a global synthesis.** *Ecological Monographs*. v. 86, n. 4, p. 495-516, 2016.
- MCDOWELL, N. G., et al. **Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought?** *New Phytologist*. v. 178, n. 4, p. 719-739, 2008.
- MITCHELL, P. J. et al. **Drought response strategies define the relative contributions of hydraulic dysfunction and carbohydrate depletion during tree mortality.** *New Phytologist*, v. 197, n. 3, p. 862-872, 2013.
- MONTWÉ, D., et al. **Drought tolerance and growth in populations of a wide-ranging tree species indicate climate change risks for the boreal north.** *Global change biology*, v. 22, n. 2, p. 806-815, 2016.
- MORRISSEY, M. B., LIEFTING, M.. **Variation in reaction norms: statistical considerations and biological interpretation.** *Evolution*, v. 70, n. 9, p. 1944-1959, 2016.
- NARDINI, A., GULLO, M. A. L., SALLEO, S. **Refilling embolized xylem conduits: Is it a matter of phloem unloading?** *Plant Science*, v. 180, n. 4, p. 604-611, 2011.
- NARDINI, A., et al. **Drought Stress and the Recovery from Xylem Embolism in Woody Plants.** *Progress in Botany Vol. 79.* Springer, Cham, p. 197-231, 2017.
- NEWMAN, R. A. **Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis.** *Bioscience*, V. 42, N. 9, P. 671-678, 1992.
- NUSSEY, D. H., WILSON, A. J., BROMMER, J. E. **The evolutionary ecology of individual phenotypic plasticity in wild populations.** *Journal of Evolutionary Biology*, v. 20, n. 3, p. 831-844, 2007.
- O'BRIEN, M., et al. **Drought survival of tropical tree seedlings enhanced by non-structural carbohydrate levels.** *Nature Climate Change*, v. 4, n. 8, p. 710, 2014.
- PATTERSON, H. D., THOMPSON, R. **Recovery of inter-block information when block sizes are unequal.** *Biometrika*, v. 58, n. 3, p. 545-554, 1971.
- PIGLIUCCI, M., et al. **Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture.** JHU Press, 2001.
- PINHEIRO, J., BATES, D. **Mixed-effects models in S and S-PLUS.** Springer Science & Business Media, 2006.
- PIPER, F. I. **Drought induces opposite changes in the concentration of non-structural carbohydrates of two evergreen Nothofagus species of differential drought resistance.** *Annals of Forest Science*, v. 68, n. 2, p. 415-424, 2011.
- PUJOL, B., MARROT, P., PANNELL, J. R. **A quantitative genetic signature of senescence in a short-lived perennial plant.** *Current Biology*, v. 24, n. 7, p. 744-747, 2014.

R Development Core Team. **R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016.

RAPP, R. A.; WENDEL, J. F. **Epigenetics and plant evolution.** *New Phisiology.* v. 168, p. 81-91, 2005.

REDMOND, M. D. et al. **Interacting effects of climate and landscape physiography on piñon pine growth using an individual-based approach.** *Ecosphere,* v. 8, n. 3, p. e01681, 2017.

RINNTECH - Technology for Tree and Wood Analysis TSAP-Win™. Retrieved 12 14, 2017.

ROSADO, L. R., et al. **Near Infrared Spectroscopy: rapid and accurate analytical tool for prediction of non-structural carbohydrates in wood.** *CERNE,* v. 25, n. 1, p. 84-92, 2019.

ROWLAND, L. et al. **Death from drought in tropical forests is triggered by hydraulics not carbon starvation.** *Nature,* v. 528, n. 7580, p. 119, 2015.

SAMI, F., et al. **Role of sugars under abiotic stress.** *Plant Physiology and Biochemistry,* v. 109, p. 54-61, 2016.

SAVI, T. et al. **Species-specific reversal of stem xylem embolism after a prolonged drought correlates to endpoint concentration of soluble sugars.** *Plant physiology and biochemistry,* v. 106, p. 198-207, 2016.

SCHEINER, S. M. **Genetics and Evolution of Phenotypic Plasticity.** *Annual review of ecology and systematics,* v. 24, n. 1, p. 35-68, 1993

SECCHI, F., ZWIENIECKI, M. A. **Sensing embolism in xylem vessels: the role of sucrose as a trigger for refilling.** *Plant, Cell & Environment,* v. 34, n. 3, p. 514-524, 2011.

SECCHI, F., ZWIENIECKI, M. A. **Analysis of Xylem Sap from Functional (Nonembolized) and Nonfunctional (Embolized) Vessels of Populus nigra: Chemistry of Refilling.** *Plant Physiology,* v. 160, n. 2, p. 955-964, 2012.

SEVANTO, S., et al. **How do trees die? A test of the hydraulic failure and carbon starvation hypotheses.** *Plant, cell & environment,* v. 37, n. 1, p. 153-161, 2014.

SIMARD, S., et al. **Intra-annual dynamics of non-structural carbohydrates in the cambium of mature conifer trees reflects radial growth demands.** *Tree Physiology,* v. 33, n. 9, p. 913-923, 2013.

SLEWINSKI, T. L. **Non-structural carbohydrate partitioning in grass stems: a target to increase yield stability, stress tolerance, and biofuel production.** *Journal of Experimental Botany.* v. 63, n. 13, p. 4647-4670, 2012.

SULTAN, S. E. **Phenotypic plasticity and plant adaptation.** Acta botanica neerlandica, v. 44, n. 4, p. 363-383, 1995.

SUN, J., et al. **Multitrait, random regression, or simple repeatability model in high-throughput phenotyping data improve genomic prediction for wheat grain yield.** The plant genome, 2017.

THALMANN, M., SANTELIA, D. **Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress.** New Phytologist, v. 214, n. 3, p. 943-951, 2017.

TRIFILÒ, P., et al. **Hydraulic recovery from xylem embolism in excised branches of twelve woody species:** Relationships with parenchyma cells and non-structural carbohydrates. Plant Physiology and Biochemistry, v. 139, p. 513-520, 2019.

VAN KLEUNEN, M., FISCHER, M. **Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants.** New Phytologist, v. 166, n. 1, p. 49-60, 2005.

YOSHIMURA, K., et al. **The dynamics of carbon stored in xylem sapwood to drought-induced hydraulic stress in mature trees.** Scientific reports, v. 6, p. 24513, 2016.

Tabela 1 - Médias e diferença em percentagem (dif%) entre os clones plantados em Campo Belo (CBL) e Cana Brava (CNB), para as variáveis Incremento de Área Seccional (IAS), amido, sacarose, açúcar redutor e CNE total.

| | IAS | | | Amido (% MS) | | | Sacarose (% MS) | | | Aç. Redutor (% MS) | | | CNE total (% MS) | | |
|-------|-------|-------|---------|--------------|------|---------|-----------------|------|---------|--------------------|-------|---------|------------------|-------|---------|
| | CBL | CNB | dif (%) | CBL | CNB | dif (%) | CBL | CNB | dif (%) | CBL | CNB | dif (%) | CBL | CNB | dif (%) |
| Média | 46.78 | 8.70 | -81.40 | 2.33 | 1.79 | -23.18 | 0.17 | 0.25 | 47.06 | 3.72 | 11.29 | 203.49 | 6.30 | 13.63 | 116.35 |
| fd | 23.96 | 7.45 | -68.91 | 1.50 | 2.03 | 35.33 | 0.10 | 0.27 | 170.00 | 0.58 | 8.14 | 1303.45 | 2.03 | 10.51 | 417.73 |
| fe | 52.85 | 8.13 | -84.62 | 3.32 | 1.79 | -46.08 | 0.16 | 0.23 | 43.75 | 2.96 | 9.96 | 236.49 | 6.92 | 13.21 | 90.90 |
| hf | 47.78 | 6.56 | -86.27 | 1.37 | 0.91 | -33.58 | 0.18 | 0.30 | 66.67 | 4.66 | 14.54 | 212.02 | 6.65 | 15.96 | 140.00 |
| md | 41.64 | 7.77 | -81.34 | 3.77 | 1.87 | -50.40 | 0.24 | 0.28 | 16.67 | 7.20 | 16.11 | 123.75 | 11.11 | 18.59 | 67.33 |
| mi | 32.82 | 12.43 | -62.13 | 2.11 | 1.79 | -15.17 | 0.20 | 0.18 | -10.00 | 6.55 | 12.47 | 90.38 | 9.21 | 14.91 | 61.89 |
| xd | 79.41 | 14.27 | -82.03 | 1.95 | 1.44 | -26.15 | 0.14 | 0.17 | 21.43 | 3.06 | 8.15 | 166.34 | 4.70 | 9.90 | 110.64 |
| xe | 63.03 | 9.09 | -85.58 | 2.73 | 1.94 | -28.94 | 0.18 | 0.33 | 83.33 | 3.87 | 12.75 | 229.46 | 6.60 | 14.48 | 119.39 |
| xf | 57.23 | 6.91 | -87.93 | 2.26 | 2.77 | 22.57 | 0.17 | 0.30 | 76.47 | 2.30 | 8.81 | 283.04 | 5.05 | 11.61 | 129.90 |
| xg | 53.72 | 4.99 | -90.71 | 1.40 | 2.01 | 43.57 | 0.13 | 0.26 | 100.00 | 2.22 | 9.87 | 344.59 | 3.82 | 12.05 | 215.45 |
| xi | 15.32 | 9.44 | -38.38 | 2.92 | 1.37 | -53.08 | 0.18 | 0.22 | 22.22 | 3.81 | 12.06 | 216.54 | 6.92 | 15.07 | 117.77 |

Figura 1- Distribuição dos conteúdos de amido (%MS) no tempo dos clones de cedro australiano.

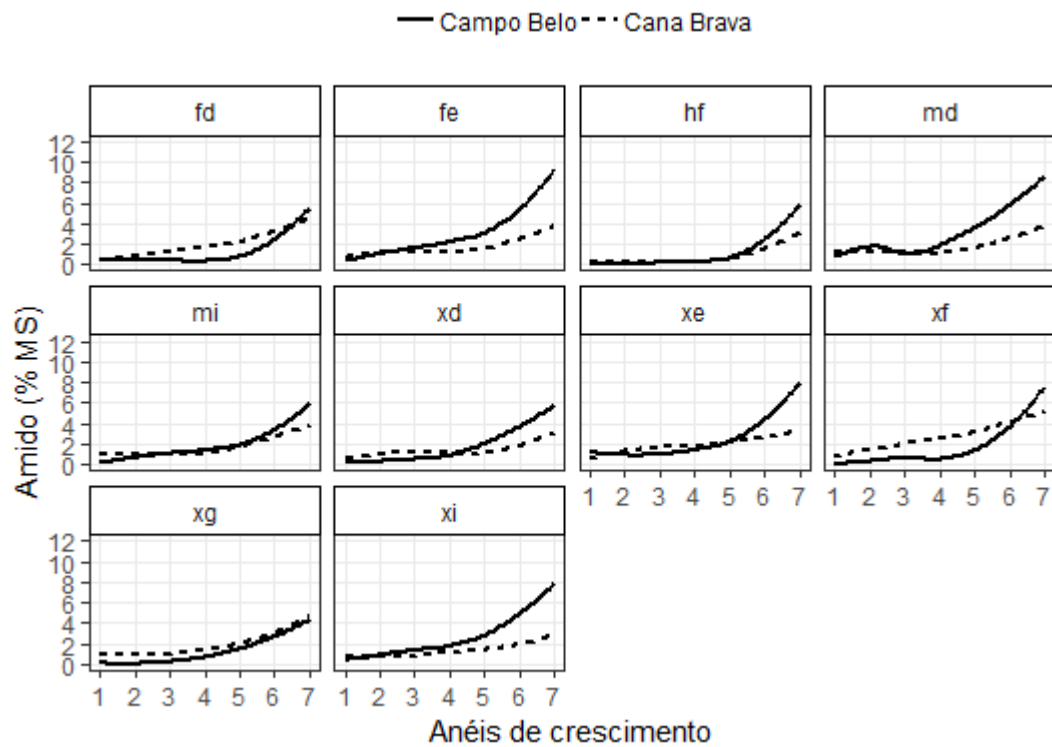


Figura 2 - Distribuição dos conteúdos de sacarose (%MS) no tempo dos clones de cedro australiano.

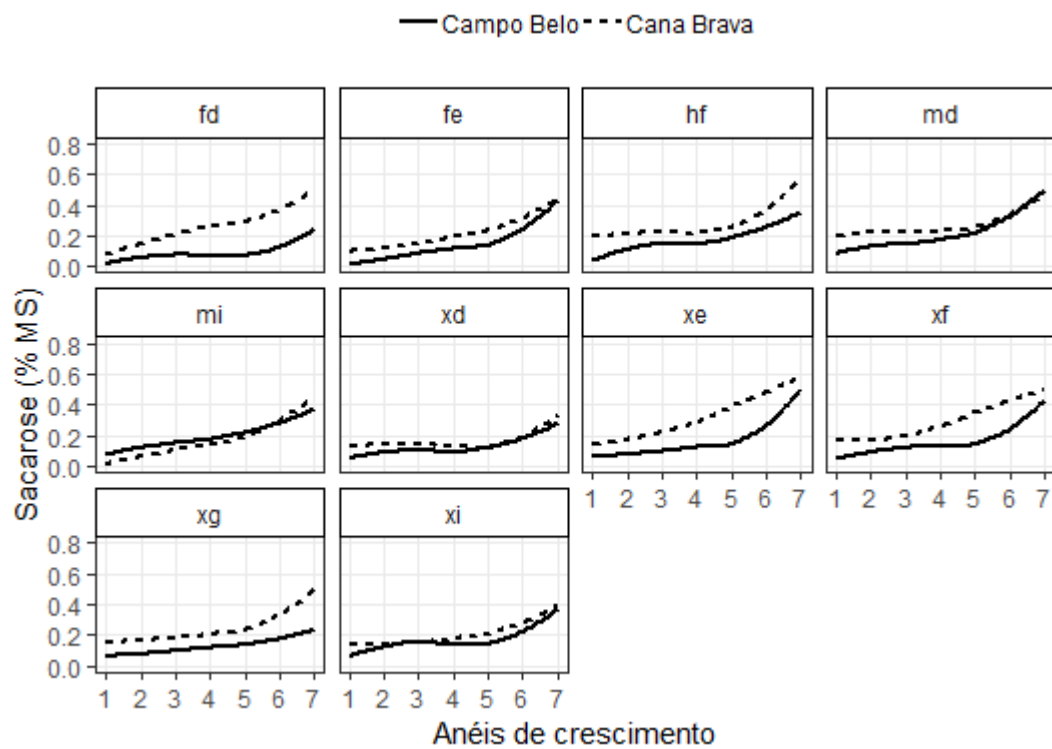


Figura 3 - Distribuição dos conteúdos de açúcar redutor (%MS) no tempo dos clones de cedro australiano.

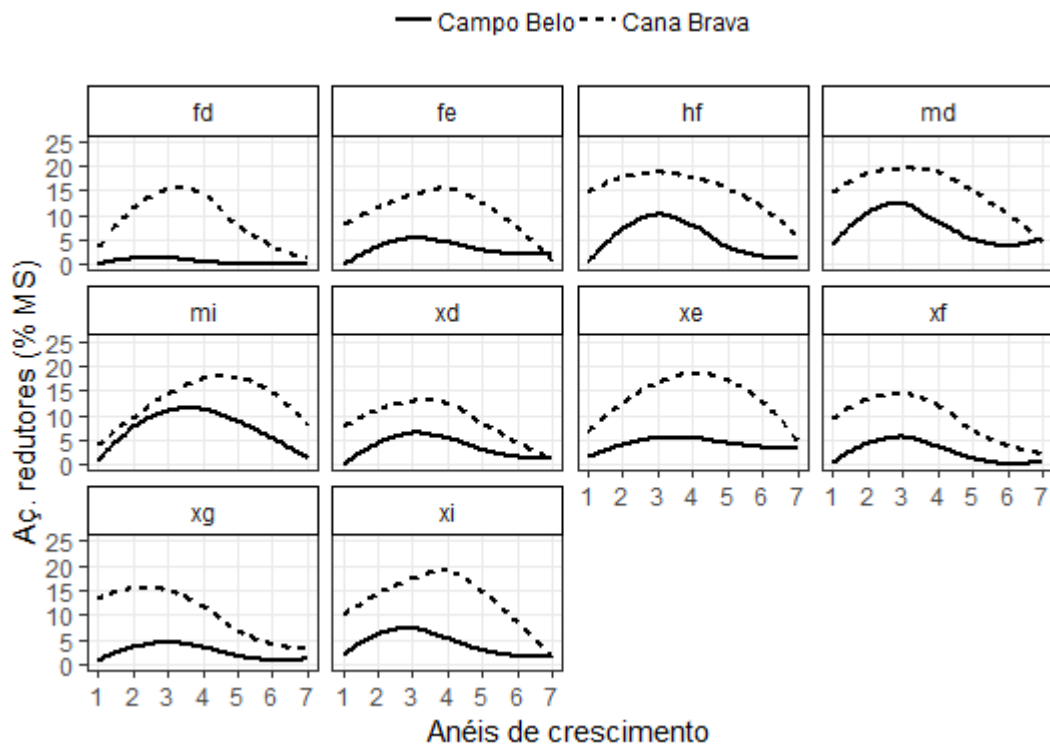


Figura 4 - Distribuição dos conteúdos dos carboidratos não estruturais - CNE total (%MS) no tempo dos clones de cedro australiano.

