

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

REBECA RIVAS COSTA

TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO APÓS CICLOS RECORRENTES DE SECA
EM Moringa oleifera

Recife

2012

REBECA RIVAS COSTA

**TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO APÓS CICLOS RECORRENTES DE SECA
EM *Moringa oleifera***

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Guida dos Santos

Recife

2012

Costa, Rebeca Rivas

Tolerância ao déficit hídrico após ciclos recorrentes de seca em *Moringa oleifera*/ Rebeca Rivas Costa. – Recife: O Autor, 2012.

78 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Mauro Guida dos Santos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biologia Vegetal, 2012.

Inclui bibliografia e anexo

1. Moringaceae 2. Oleaginosas 3. Plantas e água I. Santos, Mauro Guida II. Título.

583.64

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-189

REBECA RIVAS COSTA

TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO APÓS CICLOS RECORRENTES DE SECA
EM *Moringa oleífera*

Avaliada pela banca examinadora:

Prof. Dr. Mauro Guida dos Santos (Titular) - UFPE

Prof^a Dr^a Ana Maria Benko Iseppon (Titular) - UFPE

Prof. Dr. André Luiz Alves de Lima (Titular) – UFRPE, UAST

À Andressa Rivas, Dione Rivas e Marcio
Silva, que são meus amores e meus
pilares.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar o meu caminho, por me mostrar as respostas no momento de dúvida, por me proteger no dia-a-dia.

Ao Prof. Dr. Mauro G. Santos pela orientação, pelos ensinamentos, pela confiança, pela amizade, mas principalmente pela referência ética e profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e pelo financiamento do projeto.

Aos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) alunos, funcionários e professores.

Ao Prof. Dr. Marcelo F. Pompelli pela atenção e colaboração no trabalho.

Ao MSc. Marciel T. Oliveira que desde o início foi sempre gentil e disposto a colaborar mesmo no terceiro turno de trabalho, finais de semana ou feriados. Obrigada também pela amizade e palavras de incentivo.

Ao Bruno M. Lustosa, Camila D. B. Medeiros, Gabriella F. A. F. Faria, Hiram M. Falcão, Karla V. Figueiredo, Lígia G. F. Souza e Silvia Caroline F. Pereira por toda ajuda no trabalho, pela amizade, pelos bons momentos compartilhados profissionalmente e pessoalmente.

Aos colegas do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal (LEV) Bárbara C. F. Silva, Bety S. Hsie, Bruno M. Lustosa, Bruno M. Rodrigues, Camila D. B. Medeiros, Carlos M. Mendonça, Gabriela M. C. Silva, Gabriella F. A. F. Faria, Hiram M. Falcão, João A. A. Granja, Karla V. Figueiredo, Laura E. Melo, Lígia G. F. Souza, Marcela T. P. Oliveira, Marciel T. Oliveira, Maria Claudjane J. L. Alves, Maria Jaislanny L. Medeiros, Mariana L. O. Campos, Millena J. S. Barboza, Rafaela C. Tigre, Rafaela M. Correia, Raphaela Miamoto, Rodolfo Ferreira (Robinho), Rodrigo Q. Miranda, Silvia R. S. Silva e Silvia Caroline F. Pereira pelo apoio, pelo bom convívio profissional e pelas boas risadas.

A minha irmã Andressa Rivas, à minha mãe Dione Rivas, à minha avó Laudione Rivas (vó Lau), à minha bisavó Dionélia Rivas (vó Lola), que são as mulheres da minha vida. Me espelho em cada uma para seguir adiante.

Ao Marcio Silva por todo o amor, carinho, companheirismo, atenção, compreensão e ajuda incondicional. E também à sua família Marcos, Avani e Juliana pelo apoio, carinho e pela preocupação e cuidado em que várias vezes fizeram questão de ir me buscar tarde da noite no laboratório, nos finais de semana ou até mesmo nos feriados. Sou grata!

À minha tia Laudénir Rivas (Tia Binha), por toda a atenção, carinho, suporte, por me proporcionar vários momentos preciosos de higiene mental e por realizar a revisão textual do manuscrito desta dissertação.

Ao meu pai, Felenius J. Costa pelo apoio e carinho.

À Profa. Dra. Laureen M. H. Kido pela amizade, confiança, por me iniciar na carreira científica e principalmente por ser a maior responsável da profissional que sou hoje.

Ao Prof. Dr. Gilberto D. Alves por também me acompanhar e apoiar nos primeiros passos acadêmicos.

Aos meus grandes amigos: André Dias, André Pastor, Bárbara Laine, Elkênita Guedes, Felipe Ferreira, João Antonio, Lia, Maria Clara, Robson, Sura, Tatiana Soares por sempre torcerem por mim e por entender as minhas ausências na maioria dos encontros, mas a recompensa está aí.

Ao Saracotia pela genealidade das músicas que por tantas vezes embalaram minhas noites dissertando, mantendo minha mente ativa, criativa e inspirada.

A conclusão desta etapa tem um significado muito especial para mim: superação. Eu aceitei o desafio de concluir este curso em apenas um ano, eu sabia que não ia ser fácil e realmente não foi. Mas superei todas as dificuldades. E hoje sou grata a todos, nomeados aqui ou não, que colaboraram para a execução deste trabalho.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe
e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é MUITO para ser insignificante.”

Augusto Branco

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1. Esquema do desenho experimental de *Moringa oleifera* submetida a ciclos recorrentes de déficit hídrico. Contendo seis tratamentos controle estressado (CE), moderado estressado (ME), severo estressado (SE), controle irrigado (CI), moderado irrigado (MI) e severo irrigado (SI). Valores em porcentagem indicam a quantidade de rega em relação da capacidade de pote 55

Fig. 2. Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e Umidade relativa do ar (UR%) (A). Fluxo de fótons fotossintéticos ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) utilizados nas medidas de trocas gasosas (B). Seta para baixo indica estresse máximo do primeiro ciclo (dia 10), e seta para cima indica último dia de reidratação e início do segundo ciclo de estresse (dia 20). Umidade do solo (US%) (C) e conteúdo hídrico relativo (CHR) foliar (D) de plantas jovens de *Moringa oleifera* submetidas aos tratamentos: controle estressado (CE), moderado estressado (ME), severo estressado (SE), controle irrigado (CI), moderado irrigado (MI) e severo irrigado (SI) no estresse máximo (dia 10) do primeiro ciclo, último dia de reidratação (dia 20) e máximo estresse (dia 28). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Student Newman Keuls*, a 5% de probabilidade, $\pm\text{E.P.}$, $n=4$ 56

Fig. 3. (A-B) Condutância estomática (g_s), (C-D) assimilação líquida de CO_2 (P_N), (E-F) transpiração (E), e (G-H) eficiência do uso de água (EUA) de plantas jovens de *Moringa oleifera* submetidas aos tratamentos controle estressado (CE), moderado estressado (ME), severo estressado (SE), controle irrigado (CI), moderado irrigado (MI) e severo irrigado (SI) ao longo de todo o período de experimento. Seta para baixo indica estresse máximo do primeiro ciclo (dia 10), e seta para cima indica último dia de reidratação e início do segundo ciclo de estresse (dia 20). Barras verticais representam $\pm\text{E.P.}$ ($n=4$)..... 57

Fig. 4. Mudanças no conteúdo de (A) carboidratos solúveis totais (CST), (B) aminoácidos livres totais (ALT), (C) proteínas solúveis (PS), (D) clorofila a (CLa), (E) clorofila b (CLb) e (F) Carotenóides (CRT) em folhas de plantas jovens de *Moringa oleifera* submetidas aos tratamentos controle estressado (CE), moderado estressado (ME), severo estressado (SE), controle irrigado (CI), moderado irrigado (MI) e severo irrigado (SI) durante o primeiro estresse máximo (dia 10), último dia de reidratação (dia 20) e segundo estresse máximo (dia 28). Médias seguidas pela mesma letra não difere ($P<0,05$) pelo teste de *Student Newman Keuls* a 5% de probabilidade. Barras verticais representam $\pm\text{E.P.}$ ($n=4$)..... 58

Fig. 5. Alteração da atividade de enzimas antioxidantes (A) superóxido dismutase (SOD), (B) catalase (CAT), (C) ascorbato peroxidase (APX) e mudanças no conteúdo foliar de (D) aldeído malônico (MDA), (E) peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em plantas jovens de *Moringa oleifera* submetidas aos tratamentos controle estressado (CE), moderado estressado (ME), severo estressado (SE), controle irrigado (CI), moderado irrigado (MI) e severo irrigado (SI) durante o primeiro estresse máximo (dia 10), último dia de reidratação (dia 20) e segundo estresse máximo (dia 28). Médias seguidas pela mesma letra não difere significativamente pelo teste de *Student Newman Keuls* a 5% de probabilidade. Barras verticais representam $\pm\text{E.P.}$ ($n=4$)..... 59

Fig. 6. Número de folhas (A) e altura (B) em plantas de jovens de *Moringa oleifera* submetidas aos tratamentos controle estressado (CE), moderado estressado (ME), severo estressado (SE), controle irrigado (CI), moderado irrigado (MI) e severo irrigado (SI) durante o primeiro estresse máximo (dia 10), último dia de reidratação (dia 20) e segundo estresse máximo (dia 28). Médias seguidas pela mesma letra não difere significativamente pelo teste de *Student Newman Keuls* a 5% de probabilidade. Barras verticais representam \pm E.P. (n=5)..... 60

Fig. 7. Aspectos das plantas jovens de *Moringa oleifera* provenientes dos seis diferentes tratamentos: controle estressado (CE), moderado estressado (ME), severo estressado (SE), controle irrigado (CI), moderado irrigado (MI), severo irrigado (SI). No dia do estresse máximo do segundo ciclo de estresse (dia 28)..... 61

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Germinabilidade (G%) e velocidade média de germinação (VMG) de sementes de *Moringa oleifera* submetidas a diferentes potenciais osmóticos (MPa)... 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%G	Germinabilidade
ALT	Aminoácidos livres totais
ANOVA	Análise de variância
APG	<i>Angiosperm Phylogeny Group</i>
APX	Ascorbato peroxidase
BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Catalase
CE	Controle estressado
CHR	Conteúdo hídrico relativo
CI	Controle irrigado
CLa	Clorofila a
CLb	Clorofila b
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico
CO ₂	Gás carbônico
CRT	Carotenóides
CST	Carboidratos solúveis totais
<i>E</i>	Transpiração
E.P.	Erro padrão
<i>EUA</i>	Eficiência do uso de água
FACEPE	Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
FFF	Fluxo de fótons fotossintéticos
F_v/F_m	Eficiência quântica máxima do PSII
g_s	Condutância estomática
g_m	Condutância mesofílica
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IPCC	<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>
IRGA	Analisador de gases por infravermelho
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio
KNO ₃	Nitrato de potássio
LEV	Laboratório de Ecofisiologia Vegetal

MDA	Aldeído malônico
ME	Moderado estressado
MI	Moderado irrigado
MS	Massa seca
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NBT	Azul de nitro tetrazólio
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Superóxido
<i>P</i>	Probabilidade
PEG	Polietilenoglicol
<i>PF</i>	Peso fresco
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>P_N</i>	Assimilação líquida de CO ₂ (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)
PPGBV	Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal
PS	Proteínas solúveis
<i>PS</i>	Peso seco
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SE	Severo estressado
SI	Severo irrigado
SOD	Superóxido dismutase
T	Temperatura (°C)
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UR	Umidade relativa do ar (%)
US	Umidade do solo (%)
VGM	Velocidade média de germinação (dias ⁻¹)

SUMÁRIO

Apresentação	13
Fundamentação teórica	15
a) <i>Moringa oleifera</i>	15
b) Mecanismos de tolerância à seca	16
c) Memória ao estresse	19
Referências Bibliográficas	21
Manuscrito	29
Conclusões	62
Resumo	63
Abstract	64
Anexo	65

APRESENTAÇÃO

As plantas são sésseis e por este motivo não podem fugir diante de uma perturbação (SHAO et al., 2006; WU et al., 2007). Elas precisam ser hábeis em responder e se adaptar aos recorrentes estresses (biótico e abiótico). No semiárido, a seca é uma das condições mais severas para o crescimento e a reprodução das plantas (RODRIGUES et al., 2010). Sob essas condições as espécies diferem quanto à habilidade de retardar e tolerar a baixa disponibilidade hídrica em seus tecidos. Em geral, as plantas respondem à seca através de mudanças na morfologia, anatomia, fisiologia, em processos bioquímicos e metabólicos que coletivamente irão permitir um grau de tolerância à seca.

O estudo dos parâmetros ecofisiológicos críticos que limitam a produtividade de espécies oleaginosas no semiárido nordestino, como a *Moringa oleifera* Lam., pode auxiliar a inclusão social de pequenos agricultores da região. Uma vez que, a *M. oleifera* apresenta 1001 utilidades (GUIRRA, 2008) e pode ser usada tanto para consumo doméstico quanto comercial, principalmente por suas sementes apresentarem óleo de boa qualidade para produção de biocombustível (SILVA et al., 2010b). Apesar de ser uma espécie exótica, a *M. oleifera* é tolerante à seca e tem sido encontrada no semiárido nordestino desde a década de 50 (LORENZI & MATOS, 2002; MIRANDA et al., 2002). Desta forma, a *M. oleifera* pode ser uma alternativa aos agricultores daquela região que ao invés de investir em culturas sensíveis ao déficit hídrico como o milho e o feijão que necessitam de irrigação, podem investir em culturas como a *M. oleifera*, tolerantes à seca e com alto valor comercial.

A maioria dos estudos, que investigam os mecanismos pelos quais as plantas são tolerantes à seca, tem envolvido apenas um único evento de estresse (NOORMETS et al., 2008). Em contrapartida, a investigação objetivando entender a tolerância e a recuperação sob eventos recorrentes de seca ainda não são bem entendidos. Além disso, estudos recentes tem demonstrado que as plantas apresentam capacidade de memória quando submetidas à estresse prévio, respondendo mais rápido e/ou mais forte ao estresse recorrente (CONRATH et al., 2006; BRUCE et al., 2007). Como foi verificado por Walter et al. (2011) em plantas de *Arrhenatherum elatius* (L.) P. Beauv. ex J. Presl & C. Presl. submetidos à ciclos recorrentes de seca.

A memória também pode ser adquirida no estágio de sementes. A maioria dos trabalhos envolvem herbáceas que apresentam aumento de tolerância ao frio (XU et al.,

2011), à salinidade (IQBAL & ASHRAF, 2007) ou apenas apresentaram melhor estabelecimento após pré-tratamento (NASCIMENTO, 2003; ROUHI et al., 2011). Esses mecanismos ainda não estão totalmente desvendados principalmente no que diz respeito à capacidade de arbóreas armazenarem memória em decorrência à ciclos recorrentes de seca, desde a fase de semente até o porte de plantas jovens.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

a) *Moringa oleifera*

De acordo com a classificação de APG III (2009), *Moringa* é o único gênero da família Moringaceae, um grupo pequeno composto de 14 espécies (LALAS & TSAKINS, 2002), dentro da ordem Brassicales. Entre as espécies da família Moringaceae, a *Moringa oleifera* Lam. é a mais conhecida e distribuída (MORTON, 1991; LALAS & TSAKINS, 2002; KUMAR et al., 2010; PALIWAL et al., 2011; LUQMAN et al., 2012). Popularmente é conhecida como lírio branco, devido à cor de suas flores, quiabo de quina e baqueta devido ao formato do seu fruto, árvore milagrosa, *horseradish tree* ou *ben oil tree* (FERREIRA et al., 2008; MEHTA et al., 2011; SHARMA et al., 2011; LUQMAN et al., 2012).

M. oleifera é nativa da Índia, mas tem sido distribuída pela Ásia, África, Arábia, América do Norte, Central e Sul, ilhas do Caribe (RAMACHANDRAN et al., 1980; MORTON, 1991; RAJANGAM et al., 2001; LALAS & TSAKINS, 2002; MEHTA et al., 2011; SHARMA et al., 2011). Foi introduzida no Brasil, como planta ornamental, por volta de 1950, sendo bastante encontrada na região Nordeste, principalmente nos estados do Ceará, Piauí e Maranhão (LORENZI & MATOS, 2002; MIRANDA et al., 2002).

M. oleifera é uma árvore perene, rústica e decídua que apresenta um tronco único de pequeno porte, mas de crescimento rápido atingindo a altura de cerca de 12 m (CÁCERES et al., 1991; LORENZI & MATOS, 2002; PANDEY et al., 2011). É uma planta com folhas tripinadas com folíolos pequenos em cada pina, 30–60 cm de comprimento (SILVA & KERR, 1999; PANDEY et al., 2011). O fruto maduro é seco, do tipo cápsula loculicida que apresenta deiscência por meio de fendas longitudinais com três valvas (RAMOS et al., 2010; PANDEY et al., 2011). *M. oleifera* apresenta entre 12 a 25 sementes por fruto (LORENZI & MATOS, 2002; RAMOS et al., 2010; PANDEY et al., 2011). As sementes são globosas e apresentam três alas que são adaptações para a anemocoria (RAMOS et al., 2010).

As plantas de *M. oleifera* são tolerantes à seca e apresentam uso múltiplo (MORTON, 1991; MAKKAR & BECKER, 1997; PALADA & CHANG, 2003), desta forma servem como uma alternativa para os sertanejos que vivem a nível de subsistência no semiárido brasileiro. Sementes de *M. oleifera*, por apresentarem propriedades coagulantes e floculantes estão sendo utilizadas como uma forma eficiente e econômica de purificação de água a um custo de

apenas uma fração do tratamento químico convencional (GASSENSCHMIDT et al., 1995; NDABIGENGESERE et al., 1995; ANWAR et al., 2007; BELTRÁN-HEREDIA et al., 2009; NKURUNZIZA et al., 2009).

As sementes apresentam alto valor comercial contendo alto teor de óleo (39%), além disso, é de alta qualidade para produção de biocombustível com 78% de ácido oléico e alta estabilidade contra oxidação (RASHID et al., 2008; MARTÍN et al., 2010; SILVA et al., 2010b; OGBUNUGAFOR et al., 2011). O biocombustível derivado do óleo de *M. oleifera* é de melhor qualidade quando comparado ao de girassol, soja, palma e canola (RASHID et al., 2008). Além disso, a produção de óleo por *M. oleifera* é superior ao da *Jatropha curcas* L., *Aleurites moluccana* (L.) Willd. e *Pachira glabra* Pasq. (KIBAZOHI & SANGWAN, 2011).

Várias partes da *M. oleifera* são utilizadas na alimentação humana e forragem animal por ser rica nutricionalmente em betacaroteno, vitamina C e A, proteína, cálcio, ferro, fósforo, potássio (CHAWLA et al., 1988; PALADA & CHANG 2003; BEZERRA et al., 2004; ANWAR et al., 2007). As flores apresentam propriedades melíferas sendo, portanto propícias à apicultura (PANDEY et al., 2011). Todas as partes da planta são usadas na medicina natural (MAKKAR & BECKER, 1997; MORIMITSU et al., 2000; FAHEY, 2005; ANWAR et al., 2007), como pomadas cicatrizantes, no tratamento da malária e da icterícia, gastrointestinal, hepatorenal, hematológica, cardiovascular, doenças nas articulações, atividade antitumoral, antihepatóxica, antiinflamatória, antifúngica, antibacteriana, antifertilidade, analgésica, contra asma e gota, antipirética, antihipertensiva, diurética, reduz o colesterol, antiespasmódica e anticancerígena (PRAKASH et al., 1988; CÁCERES et al., 1991; EZEAMUZIE et al., 1996; RUCKMANI et al., 1998; GUEVARA et al., 1999; MORIMITSU et al., 2000; SIDDHURAJU & BECKER, 2003; ANWAR et al., 2007; CHUANG et al., 2007; DOUGHARI et al., 2007; PEIXOTO et al., 2011).

b) Mecanismos de tolerância ao déficit hídrico

Sabe-se que com as mudanças climáticas são esperados longos períodos de seca principalmente em ambientes áridos e semiáridos (IPCC, 2007). Desta forma, espécies vegetais tolerantes à seca respondem de maneiras diferentes quanto à habilidade de retardar e tolerar ao déficit hídrico.

Turner (1986, 1997) e Subbarao et al. (1995) propuseram três tipos de resposta das plantas ao déficit hídrico: o mecanismo de escape, o mecanismo de tolerância sob alto conteúdo de água (evitamento) e mecanismo de tolerância sob baixo conteúdo de água (tolerância à desidratação). Como as respostas adaptativas das plantas à seca compreendem um caráter multigênico, elas podem utilizar mais de um mecanismos de defesa.

Quanto ao mecanismo de escape, envolve o rápido desenvolvimento fenológico, no qual as plantas podem completar suas fenofases em um curto período de chuva, e apresentam capacidade de plasticidade no desenvolvimento (TURNER, 1986 e 1997; SUBBARAO et al., 1995). No semiárido, há a predominância de comportamento decíduo no período de estiagem, e, no curto período de chuva as plantas desenvolvem o brotamento e a floração (MACHADO et al., 1997; BARBOSA et al., 2003; AMORIM et al., 2009; SOUZA et al. 2010). Em algumas espécies a brotação pode ocorrer em decorrência de chuvas esporádicas no período seco, como foi observado em *Croton sonderianus* Müll. Arg., *Combretum leprosum* Mart., *Mimosa acutistipula* (Mart.) Benth. e *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. por Amorim et al. (2009).

Quanto aos mecanismos de tolerância sob alto conteúdo de água, estes envolvem a manutenção de um alto potencial hídrico mesmo sob déficit hídrico (LÜTTGE & SCARANO, 2004). Para garantir um alto conteúdo hídrico as plantas devem lançar mão de estratégias para minimizar a perda d'água. Portanto, o fechamento estomático é a primeira linha de defesa das plantas ao déficit hídrico, desta forma a planta evita a dessecação por reduzir a taxa transpiratória, mas em compensação diminui a produtividade e o crescimento pela redução na taxa fotossintética (CHAVES, 1991; KRAMER & BOYER, 1995; FOYER & NOCTOR, 2000; CHAVES 2002; TANG et al., 2002; FLEXAS et al., 2006). Essa redução na assimilação de CO₂ (P_N) deve ser em decorrência do decréscimo da disponibilidade do CO₂, com a redução da condutância estomática (g_s); e pelo aumento da resistência na difusão do CO₂ no mesófilo devido à redução na condutância mesofílica (g_m) (FLEXAS et al., 2007, 2008; GALMÉS et al., 2007a, 2007b, 2011). Muitas espécies nos períodos de estiagem apresentam alta eficiência do uso de água (EUA), que é a relação da P_N por molécula de H₂O perdida para atmosfera (E) (MANSUR & BARBOSA, 2000; SILVA et al., 2008). Algumas espécies como *Calotropis procera*, *C. gigantea* (COLOMBO et al., 2007), *Persea indica* (SÁNCHEZ-DÍAZ et al., 2007) toleram ao déficit hídrico com a manutenção do conteúdo hídrico foliar (CHR).

A redução na taxa fotossintética também acarreta em um baixo consumo de NADPH e ATP no ciclo de Calvin, reduzindo a disponibilidade de NADP^+ para receber elétron da cadeia transportadora e aumentando o excesso de energia no sistema (SILVA et al., 2010a; UZILDAY et al., 2012). No entanto, o excesso de energia é prejudicial ao sistema, pois desta forma, o fluxo de elétrons proveniente da fotólise da água segue para o O_2 para a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) tais como, superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (HO) (FOYER & NOCTOR, 2003), que provocam injúria na membrana, degradação de proteína, peroxidação de lipídeos, bem como rompimento nos filamentos de DNA e RNA (MITTLER, 2002; UZILDAY et al., 2012).

As plantas podem eliminar o excesso de energia por fluorescência e calor (HORTON et al., 1996). A fotorrespiração é também considerada uma válvula de escape, ou seja, é uma via alternativa para a eliminação de excesso de energia, e para evitar o dano no aparato fotossintético (FOYER & NOCTOR, 2000; NOCTOR et al., 2002; ATKIN & MACHEREL, 2009).

Para minimizar o dano oxidativo, as plantas apresentam um sistema de defesa endógeno, que inclui enzimas do ciclo antioxidativo tais como, o superóxido dismutase (SOD), que dismuta o $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , o ascorbato peroxidase (APX) e a catalase (CAT), que catalisam a reação de eliminação do H_2O_2 (POLLE & RENNENBERG, 1992; SGHERRI et al., 2000); e agente antioxidantes não enzimáticos tais como, ascorbato, glutathione, carotenóides e tocoferol que são eficientes em eliminar algumas ROS (ASADA, 1999; LOGAN et al., 2006; ASHRAF, 2009).

Os mecanismos de tolerância sob alto conteúdo de água, também envolvem modificações morfológicas, tais como, manutenção do crescimento do sistema radicular em detrimento da parte aérea para extrair água do subsolo (TARDIEU, 1996; VOLAIRE et al., 1998; BLUM, 2005). A orientação foliar pode ser alterada conforme a incidência dos raios solares. Sob alta intensidade luminosa, as folhas podem estar paralelas aos raios para minimizar o tempo de exposição e evitar o aumento da temperatura foliar (HSIAO, 1990).

Quanto aos mecanismos de tolerância à seca sob baixo potencial hídrico, envolve a capacidade da planta em tolerar a desidratação. O ajuste osmótico é o acúmulo de solutos osmoticamente ativos na célula (TURNER, 1986; HARE & CRESS, 1997; CHAVES et al., 2003) que permite a manutenção da turgescência celular e crescimento mesmo sob déficit hídrico (TYREE & JARVIS, 1982; MORGAN, 1984; LAWLOR & LEACH, 1985; TURNER

1986, KOBATA et al. 1992, BRAY, 1993; FUNKHOUSER et al. 1994, PALTA et al. 1994; KRAMER & BOYER, 1995). Com o ajustamento osmótico, a planta reduz o seu potencial para extrair água do solo e desta forma, consegue manter seus estômatos abertos para assimilação de CO₂ (TYREE & JARVIS, 1982; BRAY, 1993). Os principais solutos responsáveis para o ajustamento osmótico são: K, NO₃, Cl, SO₄, malato, aspartato, carboidrato e aminoácido (HANSON & HITZ, 1982). Segundo Smirnov (1998) alguns osmólitos podem servir também como proteção de proteínas e membrana. Algumas espécies como *Ziziphus rotundifolia* Lamk. (ARNDT et al., 2001), *Vitis vinifera* L. (PATAKAS et al., 2002), *Eucalyptus cloeziana* (NGUGI et al., 2003), *Populus tremula* L. e *Tilia cordata* Mill. (Aasamaa et al., 2004), *Olea europaea* (DICHIO et al., 2006) realizam ajuste osmótico.

c) Memória ao estresse

Alguns estudos recentes têm focado no efeito que um evento de estresse prévio tem sob a tolerância aos eventos de estresse subsequentes. Segundo, Conrath et al. (2006) as plantas que sofreram estresse prévio respondem mais rápido e/ou mais forte a um estresse subsequente seja biótico ou abiótico.

Isso indica que as plantas tem a capacidade de memória (*stress imprint*) após o primeiro evento de estresse. Essas respostas das plantas diante a um evento de estresse são controladas a nível molecular por mudanças na expressão de genes, mas que ainda não são bem entendidas (BRUCE et al., 2007). Entretanto, Conrath et al. (2006) propuseram que existem dois mecanismos de memória, um por acúmulo de proteínas sinalizadoras e outro por acúmulo de fatores de transcrição. Além desses, Bruce et al. (2007) acrescentaram o mecanismo epigenético, que envolve mudanças na atividade do DNA através da metilação do DNA ou modificação de histonas (MADLUNG & COMAI, 2004). O mecanismo epigenético é vantajoso, pois apresenta efeito a curto (mitose) e longo prazo (meiose), sem alterar a sequência de DNA (SAZE, 2008).

Quanto ao estágio de plantas jovens, Walter et al. (2011) verificaram aumento da fotoproteção em *Arrhenatherum elatius* (L.) P. Beauv. ex J. Presl & C. Presl. quando houve a reincidência de déficit hídrico, através do decréscimo da eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), indicando aumento da dissipação de energia para prevenir o dano oxidativo. Além disso, Ye e Gressel. (2000) observaram em uma erva daninha (*Conyza bonariensis* L.

Cronquist) pré-estressada com um herbicida, apresentaram maior tolerância ao estresse oxidativo através do aumento de enzimas antioxidantes.

As sementes, quando passam por um período de estresse, podem ser capazes de levar na memória este evento, e desta forma podem responder ao estresse de forma diferenciada no estado de planta. Recentemente têm sido publicados alguns trabalhos sobre este tema, como foi observado em sementes de *Cucumis melo* L. que foram acondicionadas em diferentes soluções osmóticas (KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{KNO}_3 + \text{KH}_2\text{PO}_4$, PEG e manitol), as quais germinaram mais rápido e originaram plântulas com raiz e parte aérea de comprimento maior quando comparadas com as sementes não condicionadas (NASCIMENTO, 2003). No caso de sementes de *Triticum aestivum* L. pré-tratadas com solução salina, que foram mais tolerantes à salinidade durante todo o período de crescimento (IQBAL & ASHRAF, 2007); em sementes de *Glycine max* (L.) Merr., que sofreram pré-tratamento com soluções polietilenoglicol (PEG) com diferentes potenciais osmóticos apresentaram estabelecimento mais rápido das plântulas (ROUHI et al., 2011); em sementes de *Nicotiana tabacum* L. que sofreram pré-tratamento com putrescina apresentaram maior tolerância ao frio pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes (XU et al., 2011).

Ainda não são bem entendidos os mecanismos pelos quais as plantas, principalmente as arbóreas, conseguem tolerar ciclos recorrentes de déficit hídrico desde o estágio de sementes até o porte de plantas jovens, uma vez que, a maioria dos trabalhos publicados abordam poucos parâmetros isoladamente. No entanto, estudos que abordam dados de germinação, trocas gasosas, bioquímica, avaliação enzimática e biometria, poderiam coletivamente auxiliar neste entendimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASAMAA, K.; SÖBER, A.; HARTUNG, W.; NIINEMETS, Ü. Drought acclimation of two deciduous tree species of different layers in a temperate forest canopy. **Trees-Structure and Function**. v. 18, n.1, 93–101, 2004.

AMORIM, I. L. D.; SAMPAIO, E. V. de S. B. e ARAÚJO, E. D. L. Fenologia de espécies lenhosas da Caatinga do Seridó, RN. **Revista Árvore**, v. 33, n. 3, p. 491-499, 2009.

ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**. Res. v. 21, p. 17-25, 2007.

APG (*Angiosperm Phylogeny Group*). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 161, p. 105-121, 2009.

ARNDT, S. K.; CLIFFORD, S. C.; WANEK, K.; JONES, H. G.; POPP, M. Physiological and morphological adaptations of the fruit tree *Ziziphus rotundifolia* in response to progressive drought stress. **Tree Physiology**. v. 21, p. 705–715, 2001.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 50, p. 601–639, 1999.

ASHRAF, M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. **Biotechnology Advances**. v. 27, n. 1, p. 84–93, 2009.

ATKIN, O. K.; MACHEREL, D. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. **Annals of Botany**. v. 103, n. 4, p. 581–597, 2009.

BARBOSA, D. C. A.; BARBOSA, M. C. A.; LIMA, L. C. M. 2003. Fenologia de espécies lenhosas de caatinga. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife: Editora Universitária (UFPE), 2003. p. 657-693.

BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J. Improvement of water treatment pilot plant with *Moringa oleifera* extract as flocculant agent. **Environmental Technology**. v. 30, n. 6, p. 525-534, 2009.

BEZERRA, A. M. E.; MOMENTE, V. G.; MEDEIROS FILHO, S. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) em função do peso da semente e do tipo de substrato. **Horticultura Brasileira**. v. 22, n. 2, p. 295-299, 2004.

BLUM, A. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential—are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? **Australian Journal of Agricultural Research**. v. 56, p. 1159–1168, 2005.

BRAY, E. Molecular response to water deficit. **Plant Physiology**. v. 103, n. 4, p. 1035–1040, 1993.

BRUCE, T. J. A.; METTHES, M. C.; NAPIER, J. A.; PICKETT, J. A. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. **Plant Science**. v. 173, p. 603-608, 2007.

- CÁRCERES, A.; FREIRE, V.; GIRON, L. M.; AVILES, O.; PACHECO, G. *Moringa oleifera* (Moringaceae): ethnobotanical studies in Guatemala. **Economic Botany**. v. 45, p. 522-523, 1991.
- CHAVES, M.M. Effects of water stress on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany** v. 42, n. 1, p. 1-16, 1991.
- CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P. PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought: from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**. v. 30, p. 239–264, 2003.
- CHAVES, M. M.; PEREIRA, J. S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M. L.; RICARDO, C. P. P.; OSÓRIO, M. L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. **Annals of Botany**. v. 89, n. 7, p. 907–916, 2002.
- CHAWLA, S.; SAXENA, A.; SESHADRI, S. *In-vitro* availability of iron various green leafy vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 46, n. 1, p. 125-127, 1988.
- CHUANG, P. H.; LEE, C. W.; CHOU, J. Y.; MURUGAN, M.; SHIEH, B. J.; CHEN, H. M. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 232-236, 2007.
- COLOMBO, R.; MARIN, O.; IRAZABAL, S.; TEZARA, W. Relaciones hídricas, fotosíntesis, y anatomía foliar de dos especies del género *Calotropis*. INCI. v. 32, n. 11, p. 791-796, 2007.
- CONRATH, U.; BECKERS, G. J. M.; FLORS, V.; GARCIA-AGUSTIN, P.; JAKAB, G.; MAUCH, F.; NEWMAN, M. A.; PIETERSE, C. M. J.; POINSSOT, B.; POZO, M. J.; PUGIN, A.; SCHAFFRATH, U.; TON, J.; WENDEHENNE, D.; ZIMMERLI, L.; MAUCH-MANI, B. Priming: getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 19, n. 10, p. 1062–1071, 2006.
- DICHIO, B.; XILOYIANNIS, C.; SOFO, A.; MONTANARO, G. Osmotic regulation in leaves and roots of olive trees during a water deficit and rewatering. **Tree Physiology**. v. 26, p. 179-185, 2006.
- DOUGHARI, J. H.; PUKUMA, M. S.; DE, N. Antibacterial effects of *Balanites aegyptiaca* L. Drel. and *Moringa oleifera* Lam. on *Salmonella typhi*. **African Journal of Biotechnology**. v. 6, n. 19, p. 2212-2215, 2007.
- EZEAMUZIE, I. C.; AMBAKEDEREMO, A. W.; SHODE, F. O.; EKWEBELEM, S. C. Antiinflammatory effects of *Moringa oleifera* root extract. **Pharmaceutical Biology**. v. 34, n. 3, p. 207-212, 1996.
- FAHEY, J. W. A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic and prophylactic properties. **Trees of Life Journal**. v. 1, p. 1-15, 2005.
- FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARVALHO, A. F. U. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**. v. 21, n. 4, p. 431-437, 2008.
- FLEXAS, J.; BOTA, J.; GALMÉS, J.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBO, M. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. **Physiologia Plantarum**. v. 127, n. 3 p. 343–352, 2006.

FLEXAS, J.; RIBAS-CARBO, M.; DIAZ-ESPEJO, A.; GALMÉS, J.; MEDRANO, H. Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. **Plant, Cell and Environmental**. v. 31, n. 5, p. 602–621, 2008.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytologist**. v. 146, p. 359-388, 2000.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**. v. 119, p. 355-364, 2003.

FUNKHOUSER, E. A.; CAIRNEY, J.; CHANG, S.; DIAS, M. A. D. L.; NEWTON, R. J. Cellular and molecular responses to water deficits stress in woody plants. In: Pessaralaki, M. (Ed.). **Handbook of plant and crop stress**. New York: Marcel Dekker Inc., 1994. p. 347-362.

GALMÉS, J.; FLEXAS, J.; SAVÉ, R.; MEDRANO, H. Water relations and stomatal characteristics of Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits: responses to water stress and recovery. **Plant and Soil**. v. 290, p. 139–155, 2007a.

GALMÉS, J.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. **New Phytologist**. v. 175, n. 1, p. 81–93, 2007b.

GALMÉS, J.; CONESA, M. À.; OCHOGAVÍA, J. M.; PERDOMO, J. A.; FRANCIS, D. M.; RIBAS-CARBÓ, M.; SAVÉ, R.; FLEXAS, J.; MEDRANO, H.; CIFRE, J. Physiological and morphological adaptations in relation to water use efficiency in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*. **Plant, Cell & Environmental**. v. 34, n. 2, p. 245-260, 2011.

GASSENSCHMIDT, U.; JANY, K. D.; TAUSCHER, B.; NIEBERGALL, H. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1243, n. 3, p. 477-481, 1995.

GUEVARA, A. P.; VARGAS, C.; SAKURAI, H.; FUJIWARA, Y.; HASHIMOTO, K.; MAOKA, T.; KOZUKA, M.; ITO, Y.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. **Mutation Research**. v. 440, n. 2; p. 181-188, 1999.

GUIRRA, F. 1001 utilidades. **Biodieselbr**. v. 6, p. 30-40, 2008.

HANSON, A. D.; HITZ, W. D. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. **Annual Review of Plant Physiology**. v. 33, p. 163-203, 1982.

HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**. v. 21, n. 2, p. 79–102, 1997.

HORTON, P.; RUBAN, A. V.; WALTERS, R. G. Regulation of light harvesting in green plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 47, p. 655-684, 1996.

HSIAO, T. C. Measurements of plant water status. In: Stewart, B. A.; Nielsen, D. R. (Eds.). **Irrigation of Agricultural Crops**. Madison: Am. Soc. Agr., 1990. p. 244-279.

IQBAL, M.; ASHRAF, M. Seed preconditioning modulates growth, ionic relations, and photosynthetic capacity in adult plants of hexaploid wheat under salt stress. **Journal of Plant Nutrition**. v. 30, p. 381–396, 2007.

IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*). **Climate Change 2007: The Physical Science Basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

KIBAZOHI, O.; SANGWAN, R. S. Vegetable oil production potential from *Jatropha curcas*, *Croton megalocarpus*, *Aleurites moluccana*, *Moringa oleifera* and *Pachira glabra*: Assessment of renewable energy resources for bioenergy production in Africa. **Biomass and Bioenergy**. v. 35, n. 3. p. 1352-1356, 2011.

KOBATA, T.; PALTA, J. A.; TURNER, N. C. Rate of development of post-anthesis water deficits and grain filling in spring wheat. **Crop Science**. v. 32, p. 1238-1242, 1992.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. London: Academic Press, 1995.

KUMAR, P.; MISHRA, D.; GHOSH, G.; PANDA, C. Medicinal uses and pharmacological properties of *Moringa oleifera*. **International Journal of Phytomedicine**. v. 2, p. 210-216, 2010.

LALAS, S.; TSAKINS, J. Characterization of *Moringa oleifera* seed oil variety Priyakulam-1. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 15, n. 1, p. 65-77, 2002.

LAWLOR, D. W.; LEACH, J. E. Leaf growth and water deficits: Biochemistry in relation to biophysics. In: BAKER, R. N.; DAVIES, W. J.; ONG, C.K. (Eds.). **Control of Leaf growth**. Cambridge: Cambridge University Press, 1985. p. 267-294.

LOGAN, B. A.; KORNYEYEV, D.; HARDISON, J.; HOLADAY, A. S. The role of antioxidant enzymes in photoprotection. **Photosynthesis Research**. v. 88, n. 2, p. 119–32, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LUQMAN, S.; SUCHITA, S.; RITESH, K.; ANIL, K. M.; DEBABRATA, C. Experimental Assessment of *Moringa oleifera* leaf and fruit for Its antistress, antioxidant, and scavenging potential using *in vitro* and *in vivo* assays. **Evidence-based complementary and alternative medicine**. v. 2012, p. 1-12, 2012.

LÜTGE, U.; SCARANO, R. Ecophysiology. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 27, p. 1–10, 2004.

MACHADO, I. C.; BARROS, L. M.; SAMPAIO, E. V. S. B. Phenology of Caatinga species at Serra Talhada, PE, Northeastern Brazil. **Biotropica**. v. 29, n. 1, p. 57-68, 1997.

MADLUNG, A.; COMAI, L. The effect of stress on genome regulation and structure. *Annals Botany*. v. 94, n. 4, p. 481–495, 2004.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Nutrients and antiquality factors indifferent morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. **Journal of Agricultural Science**. v. 128, p. 311-322, 1997.

MANSUR, R. J. C. N.; BARBOSA, D. C. A. Physiological behavior in young plants of four trees species of Caatinga submitted the two cycles of water stress. **Phyton-International Journal of Experimental Botany**. v. 68, p. 97–106, 2000.

MARTÍN, C.; MOURE, A.; MARTÍN, G.; CARRILLO, E.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Fractional characterisation of jatropha, neem, moringa, trisperma, castor and candlenut seeds as potential feedstocks for biodiesel production in Cuba. **Biomass and Bioenergy**. v. 34, n. 4, p. 533-538, 2010.

MEHTA, J.; SHUKLA, A.; BUKHARIYA, V.; CHARDE, R. The magic remedy of *Moringa olifera*: an overview. **International Journal of Biomedical Advances Research**. v. 2, n. 6, p. 215-227, 2011.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. **Trends in Plant Science**. v.7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MIRANDA, J. R. P.; CARVALHO, J. G.; SANTOS, D. R.; FREIRE, A. L. O.; BERTONI, J. C.; MELO, J. R. M.; CALDAS, A. L. Silício e cloreto de sódio na nutrição mineral e produção de matéria seca de plantas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 26, p. 957-965, 2002.

MORGAN, J. M. Osmoregulation and water stress in higher plants. **Annual Review Plant Physiology**. v. 35, p. 299-319, 1984.

MORTON, J. F. The horse radish tree: *M. pterigosperma* (Moringaceae). A boon to arid lands. **Economic Botany**. v. 45, n. 3, p. 318-333, 1991.

MORIMITSU, Y.; HAYASHI, K.; NAKAGAMA, Y.; HORIO, F.; UCHIDA, K.; OSAWA, T. Antiplatelet and anticancer isothiocyanates in Japanese horseradish, wasabi. **Biofactors**. v. 13, p. 271–276, 2000.

NASCIMENTO, W. M. Muskmelon seed germination and seedling Development in response to seed priming. **Scientia Agrícola**. v. 60, n. 1, p. 71-75, 2003.

NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S.; TALBOT, B. G. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. **Water Res**. v. 29, n. 2, p. 703-710, 1995.

NGUGI, M. R.; DOLEY, D.; HUNT, M. A.; DART, P.; RYAN, P. Leaf water relations of *Eucalyptus cloeziana* and *Eucalyptus argophloia* in response to water deficit. **Tree Physiology**. v. 23, p. 335–343, 2003.

NKURUNZIZA, T.; NDUWAYEZU, J. B.; BANADDA, E. N.; NHAPE, I. The effect of turbidity levels and *Moringa oleifera* concentration on the effectiveness of coagulation in water treatment. **Water Science and technology**. v. 59, n. 8, p. 1551-1558, 2009.

NOCTOR, G.; VELJOVIC-JOVANOVIC, S.; DRISCOLL, S.; NOVITSKAYA, L.; FOYER, C. H. Drought and oxidative load in the leaves of C-3 plants: a predominant role for photorespiration? **Annals of Botany**. v. 89, p. 841–850, 2002.

NOORMETS, A.; MCNULTY, S. G.; DEFOREST, J. L.; SUN, G.; LI, Q.; CHEN, J. Drought during canopy development has lasting effect on annual carbon balance in a deciduous temperate forest. **New Phytologist**. v. 179, p. 818–828, 2008.

OGBUNUGAFOR, H. A.; ENEH, F. U.; OZUMBA, A. N.; IGWO-EZIKPE, M. N.; OKPUZOR, J.; IGWILO, I. O.; ADENEKAN, S. O.; ONYEKWELU, O. A. Physico-chemical and antioxidant properties of *Moringa oleifera* seed oil. Pak. **Journal of Nutrition**. v. 10, n. 5, p. 409-414, 2011.

PALADA, M. C.; CHANG, L. C. Suggested Cultural Practices for Moringa. **International Cooperators' Guide AVRDC**. AVRDC pub # 03545, p. 1-5, 2003.

PALIWAL, R.; SHARMA, V.; PRACHETA, P.; SHARMA, S.; YADAV, S.; SHARMA S. H. Antinephrotoxic effect of administration of *Moringa oleifera* Lam in amelioration of DMBA induced renal carcinogenesis in swiss albino mice. **Biology and Medicine Journal**. v. 3, n. 2, p. 27-35, 2011.

PALTA, J. A.; KOBATA, T.; TURNER, N. C.; FILLERY, I. R. Remobilization of carbon and nitrogen in wheat as influenced by postanthesis water deficits. **Crop Science**. v. 34, p. 118-124, 1994.

PANDEY, A.; PRADHEEP, K.; GUPTA, R.; NAYAR, E.; BHANDARI, D. 'Drumstick tree' (*Moringa oleifera* Lam.): a multipurpose potential species in India. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v. 58, n. 3, p. 453-460, 2011.

PATAKAS, A.; NIKOLAOU, N.; ZIOZIOU, E.; RADOGLU, K.; NOITSAKIS, B. The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. **Plant Science**. v.163, n. 2, p. 361-367, 2002.

PEIXOTO, J. R. O.; SILVA, G. C.; COSTA, R. A.; FONTENELLE, J. L. S.; VIEIRA, G. H. F.; FONTELES FILHO, A. A.; VIEIRA, R. H. S. F. *In vitro* antibacterial effect of aqueous and ethanolic *Moringa* leaf extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v. 4, p. 201-204, 2011.

POLLE, A.; RENNENBERG, H. Field studies on Norway spruce trees at high altitudes. II. Defense systems against oxidative stress in needles. **New Phytologist**. v. 121, p. 635-640, 1992.

PRAKASH, A. O.; PATHAK, S.; SHUKLA, S.; MATHUR, R. Pre and post-implantation changes in the uterus of rats: response to *Moringa oleifera* Lam. extract. **Ancient Science of Life**. v. 8, n. 1, p. 49-54, 1988.

RAJANGAM, J.; AZAHAKIA-MANAVALAN, R. S.; THANGARAJ, T.; VIJAYAKUMAR, A.; MUTHUKRISHAN, N. Status of production and utilisation of moringa in southern India. In: **Proceedings of the 2001 Workshop Developmental Potential for Moringa Products**. Tanzania: Dar Es Salaam, 2001. p. 33-42.

RAMACHANDRAN, C.; PETER, K. V.; GOPALAKRISHNAN, P. K. Drumstick (*Moringa oleifera*): A multipurpose Indian vegetable. **Economic Botany**. v. 34, n. 3, p. 276-283, 1980.

RAMOS, L. M.; COSTA, R. S.; MÔRO, F. V.; SILVA, R. C. Morfologia de frutos e sementes e morfofunção de plântulas de *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.). **Comunicata Scientiae**. v. 1, n. 2, p. 156-160, 2010.

RASHID, U.; ANWAR, F.; MOSER, B. R.; KNOTHE, G. *Moringa oleifera* oil: A possible source of biodiesel. **Biosource Technology**. v. 99, p. 8175-8179, 2008.

RODRIGUES, B. M.; SOUZA, B. D.; NOGUEIRA, R. M.; SANTOS, M. G. Tolerance to water deficit in young trees of jackfruit and sugar apple. **Revista Ciência Agronômica**. v. 41, n. 2, p. 245-252, 2010.

ROUHI, H. R.; SURKI, A. A.; SHARIF-ZADEH, F.; AFSHARI, R. T.; ABOUTALEBIAN, M. A.; AHMADVAND, G. Study of Different Priming Treatments on Germination Traits of Soybean Seed Lots. **Notulae Scientia Biologicae**. v. 3, n. 1, p. 101-108, 2011.

RUCKMANI, K.; KAVIMANI, S.; ANANDAN, R.; JAYKAR, B. Effect of *Moringa oleifera* Lam. on paracetamol-induced hepatotoxicity. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 60, n. 1, p. 33-35, 1998.

SÁNCHEZ-DÍAZ, M.; TAPIA, C.; ANTOLÍN, M. C. 2007. Drought induced oxidative stress in Canarian laurel forest tree species growing under controlled conditions. **Tree Physiology**. v. 27, n. 10, p. 1415-1422, 2007.

SAZE, H. Epigenetic memory transmission through mitosis and meiosis in plants. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v. 19, n. 6, p. 527-536, 2008.

SGHERRI, C. L. M.; MAFFEI, M.; NAVARI-IZZO, F. Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. **Journal of Plant Physiology**. v. 157, n. 3, p. 273-279, 2000.

SHAO, H. B.; CHU, L. Y.; ZHAO, C. X.; GUO, Q. J.; LIU, X. A.; RIBAUT, J. M. Plant gene regulatory network system under abiotic stress. **Acta Biologica Szegediensis**. v. 50, n. 1-2, p. 1-9, 2006.

SHARMA, V.; PALIWAL, R.; PRACHETA, P.; SHARMA, S. Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant activities of hydro-ethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. Pods. **Journal of Pharmaceutical Research**. v. 4, n. 2, p. 554-557, 2011.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Antioxidant properties of various solvent extraction of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, n. 8, p. 2144-2155, 2003.

SILVA, A. R.; KERR, W. E. **Moringa: uma nova hortaliça para o Brasil**. Uberlândia: UFU/DIRIU, 1999.

SILVA, E. C.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; ARAÚJO, F. P.; MELO, N. F.; AZEVEDO-NETO, A. D. Physiological responses to salt stress in young umbu plants. **Environmental and Experimental Botany**. v. 63, n. 1-3, p. 147-157, 2008.

SILVA, E. N.; FERREIRA-SILVA, S. L.; FONTENELE, A. V.; RIBEIRO, R. V.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subject to isolated and combined drought and heat stress in *Jatropha curcas* plants. **Journal of Plant Physiology**. v. 167, n. 14, p. 1157-1164, 2010a.

SILVA, J. P. V.; SERRA, T. M.; GOSSMAN, M.; WOLF, C. R.; MENEGHETTI, M. R.; MENEGHETTI, S. M. P. *Moringa oleifera* oil: Studies of characterization and biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**. v. 34, n. 10, p. 1527-1530, 2010b.

SMIRNOFF, N. Plant resistance to environmental stress. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 9, n. 2, p. 214-219, 1998.

SOUZA, B. D.; MEIADO, M. V.; RODRIGUES, B. M.; SANTOS, M. G. Water relations and chlorophyll fluorescence responses of two leguminous trees from the Caatinga to different watering regimes. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 32, n. 2, p. 235-244, 2010.

SUBBARAO, G. V.; JOHANSEN, A. C.; SLINKARD, R. C.; RAO, N.; SAXENA, N. P.; CHAUHAN, Y. S. Strategies for improving drought resistance in grain legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 14, n. 6, p. 469- 523, 1995.

TANG, A. C.; KAWAMITSU, Y.; KANECHI, M.; BOYER, J. S. Photosynthetic oxygen evolution at low water potential in leaf discs lacking an epidermis. **Annals of Botany**. v. 89, n. 7, p. 861–870, 2002.

TARDIEU, F. Drought perception by plants. Do cells of droughted plants experience water stress. **Plant Growth Regulation**. v. 20, n. 2, p. 93-104, 1996.

TURNER, N. C. Adaptation to water deficits: a changing perspective. **Australian Journal of Plant Physiology**. v. 13, n. 1, p.175- 190, 1986.

TURNER, N. C. Further progress in crop water relations. In: SPARKS, D. L. (Ed.) *Advances in agronomy*. Academic Press, 1997. p. 293-337.

TYREE, M. T.; JARVIS, P. G. Water in tissues and cells. In: LANGE, O. L.; NOBEL, P. S.; OSMOND, C. B.; ZIEGLER, H. (Eds.). **Physiological Plant Ecology II: Water Relations and Carbon Assimilation**. Berlin: Springer Verlag, 1982. p. 35–77.

UZILDAY, B.; TURKAN, I.; SEKMEN, A. H.; OZGUR, R.; KARAKAYA, H. C. Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C4) and *Cleome spinosa* (C3) under drought stress. **Plant Science**. v. 182, p. 59-70, 2012.

VOLAIRE, F.; THOMAS, H.; LELIEVRE, F. Survival and recovery of perennial forage grasses under prolonged Mediterranean drought. I. Growth, death, water relations and solute content in herbage and stubble. **New Phytologist**. v. 140, p. 439–449, 1998.

WALTER, J.; NAGY, L.; HEIN, R.; RASCHER, U.; BEIERKUHNLEIN, C.; WILLNER, E.; JENTSCH, A. 2011. Do Plants Remember Drought? Hints Towards a Drought Memory in grasses. **Environmental and Experimental Botany**. v. 71, n. 1, 3440.

WU, G.; SHAO, H. B.; CHU, L. Y.; CAI, J. W. Insights into molecular mechanisms of mutual effect between plants and the environment. A review. **Agronomy for Sustainable Development**. v. 27, n. 1, p. 68–78, 2007.

XU, S. C.; HU, J.; LI, Y. P.; MA, W. G.; ZHENG, Y. Y.; ZHU, S. J. Chilling tolerance in *Nicotiana tabacum* induced by seed priming with putrescine. **Plant Growth Regulation**. v. 63, n. 3, p. 279-290, 2011.

YE, B.; GRESSEL, J. Transient, oxidant-induced antioxidant transcript and enzyme levels correlate with greater oxidant-resistance in paraquat-resistant *Conyza bonariensis*. **Planta**. v. 211, n. 1, p. 50–61, 2000.

MANUSCRITO

A ser submetido ao periódico *Environmental and Experimental Botany* em março de 2012

Tolerância ao déficit hídrico após ciclos recorrentes de seca em *Moringa oleifera*

Rebeca Rivas^a; Marciel Teixeira Oliveira^a; Mauro Guida Santos^{a,*}

^aUniversidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, Av. Prof. Moraes Rego. s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

*Autor correspondente. Tel.: +55 81 2126 8844. Fax: +55 81 2126 7803 Endereço de email: mauroguida@yahoo.com.br (M.G. Santos).

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar se plantas jovens de *Moringa oleifera* são capazes de carregar na memória estresses hídricos recorrentes ocorridos desde a germinação das sementes até o porte de plantas jovens e com isso apresentar maior tolerância à seca. As sementes foram germinadas em baixos potenciais osmóticos 0,0; - 0,1; - 0,2; - 0,3; - 0,4 e - 0,5 MPa. Foram utilizadas plantas jovens com 50 dias após a emergência, originadas da germinação de três potenciais osmóticos 0,0; - 0,3 e - 0,4 MPa. As plantas foram submetidas a dois regimes hídricos: as irrigadas (100% da capacidade de pote) e as estressadas (10% da capacidade de pote), totalizando seis tratamentos. Foram realizados dois ciclos de déficit hídrico intercalados por 10 dias de reidratação. Foram analisados os parâmetros de germinação, trocas gasosas, bioquímica, enzimática e biometria. As plantas jovens de *M. oleifera* são tolerantes aos ciclos recorrentes de seca pela manutenção do alto conteúdo hídrico relativo (CHR), pela alta eficiência do uso de água (EUA), pela manutenção dos pigmentos fotossintéticos e além do aumento da atividade de enzimas antioxidantes. Houve rápida recuperação da taxa fotossintética durante o período de reidratação. As plantas estressadas provenientes dos tratamentos -0,3 e -0,4 MPa apresentaram maior tolerância a seca quando comparada às provenientes do tratamento 0,0 MPa. Isso sugere que as sementes

submetidas a um estresse prévio, no período germinativo, têm a capacidade de adquirir memória à seca, possibilitando à *M. oleifera* uma maior tolerância a ciclos recorrentes.

Palavras-chave: estresse abiótico, oleaginosa, trocas gasosas, ROS

1. INTRODUÇÃO

A irregularidade da chuva, que causa longos períodos de seca, é um dos fatores que mais limita a produtividade agrícola no mundo (Rodrigues et al., 2010). Além disso, outros fatores podem estar associados à seca como, temperatura alta, baixa umidade, alta luminosidade e alto déficit de pressão de vapor, que pode aumentar a evapotranspiração anual. Desta forma, as plantas apresentam mecanismos que as permitem escapar, alterando o desenvolvimento fenológico, ou tolerar, mantendo ou diminuindo o potencial hídrico sob escassez de água.

Moringa oleifera Lam., pertencente à família Moringaceae, é nativa do noroeste da Índia, e bem distribuída no sudeste da Ásia, na África, na Arábia, na América do Sul, no Pacífico e nas ilhas do Caribe (Sharma et al., 2011). Foi introduzida no Brasil na década de 50, como ornamental (Lorenzi e Matos, 2002). Possui porte arbóreo perene de crescimento rápido, tolerante à seca e a solos pobres, no semiárido nordestino tornou-se uma alternativa para os sertanejos que vivem a nível de subsistência (Palada e Chang, 2003). Todas as partes da *M. oleifera* são usadas na medicina natural (Sharma et al., 2011). As sementes apresentam alto valor comercial contendo alto teor de óleo (39%), além de alta qualidade para produção de biocombustível com 78% de ácido oléico e alta estabilidade contra oxidação (Rashid et al., 2008; Silva et al., 2010). O biocombustível derivado do óleo de *M. oleifera* é de melhor qualidade quando comparado ao de girassol, soja, palma e canola (Rashid et al., 2008), e além

disso, a produção de óleo por *M. oleifera* é superior ao da *Jatropha curcas* L., *Aleurites moluccana* (L.) Willd. e *Pachira glabra* Pasq. (Kibazohi e Sangwan, 2011).

A literatura atual é ampla no que diz respeito ao estudo sobre os mecanismos ecofisiológicos que tornam espécies vegetais tolerantes à seca (Kramer e Boyer, 1995; Hsiao, 1973; Rodrigues et al., 2010). Estudos recentes envolvendo os parâmetros ecofisiológicos em plantas sob déficit hídrico tem demonstrado que a primeira resposta ao déficit hídrico é o fechamento estomático que restringe a perda d'água e a assimilação de CO₂ (Ditmarová et al., 2010). Neste cenário, quando a resistência a H₂O é maior do que ao CO₂, observa-se aumento na eficiência do uso de água (Galle et al., 2011). Sob seca, o excesso de energia luminosa capturada e não utilizada em sua maior parte, proporciona o aumento do dano oxidativo através das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Uzilday et al., 2012). O dano oxidativo pode ser mensurado através da quantificação do MDA (aldeído malônico), que é produto da peroxidação lipídica de membrana (Cakmak e Horst, 1991). Em contrapartida, vias de neutralização das ROS são ativadas, como ciclo de carotenóides e enzimas antioxidantes (Sánchez-Díaz et al., 2007). Também pode haver aumento no conteúdo de aminoácidos e carboidratos pela proteólise e hidrólise de amidos respectivamente, devido à paralização do crescimento celular e para suprir a respiração (Thapa et al., 2011).

As plantas, quando são submetidas a um estresse, têm alta capacidade de homeostase, mas essa resposta depende da intensidade do estresse, do tempo de exposição e do número de eventos de estresse (Chaves et al., 2009). Estudos recentes têm demonstrado que, quando a planta sofre uma exposição prévia a um estresse, ela tem a capacidade de responder mais rápido e com mais vigor a um evento de estresse recorrente (Walter et al., 2011), esse fenômeno é conhecido como *hardening*. Isso implica que as plantas têm a capacidade de memória (*stress imprint*) que é resultado de mudanças bioquímicas e/ou epigenéticas que ocorrem após a primeira exposição ao estresse (Bruce et al., 2007).

A capacidade de memória pode ser adquirida pela planta ainda na fase de semente. Sementes pré-tratadas de *Nicotiana tabacum* L. (Xu et al., 2011), *Triticum aestivum* L. (Iqbal e Ashraf, 2007) e *Glycine max* (L.) Merr. (Rouhi et al., 2011), apresentaram maior tolerância ao frio, à salinidade e estabelecimento mais rápido das plântulas, respectivamente. Percebe-se que a literatura atual é ampla no estudo de memória em herbáceas, mas em arbóreas é escassa. O objetivo principal do trabalho foi avaliar se plantas jovens de *Moringa oleifera* são capazes de carregar na memória estresses hídricos recorrentes ocorridos desde a germinação das sementes até o porte de plantas jovens, e com isso apresentar maior tolerância à seca.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de *M. oleifera* coletadas na região metropolitana do Recife a partir de quatro indivíduos, e, a seguir, foram misturadas antes do início dos experimentos. O trabalho foi desenvolvido em duas etapas: a primeira com sementes em câmara de germinação e outra com plantas jovens sob condições de casa-de-vegetação em potes a partir das plantas obtidas na primeira etapa.

2.1 Etapa I – germinação

As sementes foram esterilizadas em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5% por cinco minutos, e, a seguir lavadas três vezes com água deionizada autoclavada. Após esta fase as mesmas foram germinadas em caixas tipo *gerbox* sob duas folhas de papel filtro umedecidas com as soluções de potenciais osmóticos diferentes, contendo polietilenoglicol (PEG 6000): 0,0; - 0,1; - 0,2; - 0,3; - 0,4; - 0,5 MPa, segundo Villela et al. (1991), sendo quatro repetições com 50 sementes cada. As sementes foram mantidas em câmara do tipo BOD sob fotoperíodo

de 12 h e temperatura de 25°C. A avaliação ocorreu a cada 24 h para o cálculo de velocidade média de germinação (VMG) e germinabilidade (G%).

2.2 Etapa II – Plantas jovens

Após a germinação, as plantas jovens foram mantidas irrigadas em substrato na sala de crescimento, por 15 dias, com temperatura de 25°C, umidade relativa 70% e fotoperíodo de 12 h. Posteriormente, as plantas jovens foram transplantadas para vasos de 7 L contendo horizonte orgânico de um solo (terra preta), horizonte argiloso (terra vermelha) e areia lavada e na proporção de 3:1:1, respectivamente. Em seguida, foram mantidas inteiramente casualizadas em casa-de-vegetação, sendo regadas com 100% da capacidade de pote, diariamente.

Para o início do experimento com déficit hídrico, foram utilizadas plantas jovens com 50 dias após a emergência, originadas da germinação de três potenciais osmóticos 0,0; - 0,3 e - 0,4 MPa (controle, moderado e severo, respectivamente). Para cada tratamento de germinação, foram utilizadas 24 plantas, sendo 12 mantidas irrigadas com 100% da capacidade de pote e 12 submetidas ao déficit hídrico (10% da capacidade de pote), totalizando seis tratamentos. Após atingir o estresse máximo (condutância estomática em torno de zero), as plantas foram reidratadas por dez dias, sendo em seguida, submetidas a um novo ciclo de déficit hídrico (Fig. 1). Durante o experimento foram mensuradas as médias da temperatura e da umidade relativa do ar (UR) (Fig. 2A) da casa-de-vegetação com auxílio de um termohigrômetro (J.Prolab/Modelo SH122); além disso, foi determinado o fluxo de fótons fotossintéticos (FFF) utilizado nas medidas de trocas gasosas (Fig. 2B) com auxílio do analisador de gases por infravermelho (IRGA) modelo LCIpro (ADC – UK).

2.3 Análises e medidas

2.3.1 Status hídrico

A umidade do solo foi determinada com base em cinco amostras por tratamento nos dias de estresse máximo (primeiro e segundo ciclo) e, no último dia de reidratação. As amostras foram coletadas às 06:00 h; em seguida, o peso fresco foi mensurado em balança (TOLEDO/modelo 9094-1); sendo as plantas posteriormente, mantidas em estufa à 80°C por 48 h e pesadas (peso seco) na mesma balança. A umidade de solo foi determinada em porcentagem pela fórmula: $US (\%) = 100 \times (PF - PS / PF)$, onde US é a umidade do solo, PF e PS é o peso fresco e seco do solo, respectivamente.

O conteúdo hídrico relativo (CHR) foliar foi determinado em seis amostras por tratamento nos dias de estresse máximo (primeiro e segundo ciclo) e no último dia de reidratação. Foram coletados discos foliares às 6h e foram acondicionados em potes em isopor com gelo; em seguida foram pesados (peso fresco) em balança semi-analítica (ADN – modelo 200); posteriormente os discos foliares foram embebidos por 24h em água deionizada, após esse período os discos foram pesados (peso túrgido) na mesma balança, retirando o excesso superficial de água com papel macio; posteriormente, os discos foram mantidos em estufa à 80° por 48h, após esse período foram pesados (peso seco) na mesma balança (Barrs & Weatherley, 1962). O CHR foi dado em porcentagem pela fórmula: $CHR(\%) = 100 \times (PF - PS) / (PT - PS)$ onde, PF, PS, PT são peso fresco, seco e túrgido de tecido foliar, respectivamente.

2.3.2 Medidas de trocas gasosas

As medidas de trocas gasosas foram realizadas através do analisador de gases por infravermelho (IRGA), modelo LCIpro (ADC – UK) que forneceu dados sobre condutância

estomática (g_s), a assimilação líquida de CO_2 (P_N), bem como a transpiração (E), permitindo calcular a eficiência do uso da água (EUA), através da fórmula: $EUA = P_N/E$. As medidas foram realizadas em uma folha completamente expandida, das 9h às 10h, em seis plantas por tratamento escolhidas ao acaso.

2.3.3 Análises bioquímicas do tecido vegetal

Foi coletada uma folha totalmente expandida e madura de sete plantas por tratamento. Imediatamente após a coleta, o material vegetal foi embalado em papel alumínio e congelado em nitrogênio líquido. Em seguida, foi armazenada em freezer -20°C para posterior análise bioquímica e avaliação do estresse oxidativo. As coletas foram realizadas, às 15:00 h, no dia do estresse máximo (primeiro e segundo ciclo) e no último dia de reidratação.

Para as análises bioquímicas foram realizadas quantificações de carboidratos solúveis totais (CST), aminoácidos livres totais (ALT), proteínas solúveis (PS), e pigmentos fotossintéticos [clorofila a, b (CLa e CLb) e carotenóides (CRT)]. Foram utilizadas amostras de tecido foliar fresco seguindo as metodologias propostas por Dubois et al. (1956), Moore e Stein (1954), Bradford (1976) e Lichthenthaler (1987), respectivamente. Todas essas análises foram determinadas com espectrofotômetro (Thermo Scientific/Modelo Genesys 10S UVVIS) de duplo feixe ajustado ao comprimento de onda específico para cada composto orgânico.

Para quantificação de CST e ALT foram utilizados 50 mg de tecido foliar em extrato etanólico, utilizando como padrão Glicose ($180 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e aminoácidos 1 mM (glicina, ácido glutâmico, fenilalanina e arginina), respectivamente. As PS, por sua vez, foram utilizados 10 mg de tecido foliar para obtenção do extrato, utilizando como padrão a albumina de soro bovino (BSA 0,1%). Quanto aos pigmentos fotossintéticos foram utilizados 50 mg de tecido foliar para a extração em acetona 80%.

2.3.4 Avaliação do estresse oxidativo

Foi avaliado o produto da peroxidação lipídica de membrana plasmática, o aldeído malônico (MDA) e a espécie reativa de oxigênio (ROS), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), seguindo metodologia descrita por Cakmak e Horst (1991) e Alexieva et al. (2001), respectivamente. Para a quantificação de ambos, foram utilizados 50 mg de tecido foliar para a extração em ácido tricloroacético (TCA 0,1%). Na reação do peróxido de hidrogênio foi utilizado como padrão H_2O_2 (1mM). Para o cálculo da concentração do MDA foi utilizado o coeficiente de extinção molar ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Foram avaliadas três enzimas do ciclo antioxidativo a Superóxido Dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1), a Catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6), e o Ascorbato Peroxidase (APX, E.C. 1.11.1.11), seguindo as metodologias propostas por Giannopolitis e Ries (1977), Havir e Mchale (1987) e Nakano e Asada (1981). Foram utilizados 100 mg de tecido foliar em tampão fosfato de potássio (pH = 7,8) para a obtenção do extrato da SOD. A atividade da SOD foi determinada pela habilidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitro tetrazólio (NBT). Para a obtenção do extrato da CAT e do APX foram utilizados 200 mg de tecido foliar em tampão de fosfato de potássio (pH = 7,5). A atividade da CAT e do APX foram determinadas pela decomposição de H_2O_2 e ascorbato, respectivamente, por espectrofotômetro com Δ absorbância em 1 minuto.

2.3.5 Avaliação biométrica

Foram avaliadas cinco plantas por tratamento, semanalmente, quanto à altura e ao número de folhas.

2.3.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) um fator. As médias, quando apresentaram diferença significativa, foram contrastadas pelo teste de *Student Newman Keuls* a 5% de probabilidade. Os dados de G% foram transformados em $\arcseno\sqrt{x/100}$, onde x é a G%, antes de submeter ao teste estatístico.

3. RESULTADOS

3.1 Germinação

A redução do potencial osmótico interferiu na germinação (Tabela 1). Com relação à G%, todos os tratamentos apresentaram redução em relação ao controle ($P<0,05$). Houve redução ($P<0,05$) na quantidade de sementes germinadas quando hidratadas com soluções de - 0,3 MPa em relação ao - 0,2 MPa, e de - 0,4 MPa em relação ao - 0,3 MPa. Sementes de *M. oleifera* não germinaram em potenciais osmóticos abaixo de - 0,4 MPa. Com relação à VMG, foi observado que as sementes germinadas sob baixos potenciais osmóticos apresentaram redução ($P<0,05$) em relação ao controle (Tabela 1).

Foram escolhidos três tratamentos para realizar o experimento em casa-de-vegetação. Com base nos resultados obtidos, os tratamentos - 0,3 e - 0,4 MPa foram os mais prejudicados na G% e, além disso, o tratamento - 0,4 MPa apresentou menor VMG ($P<0,05$). Os tratamentos foram denominados de controle (0,0 MPa), moderado (- 0,3 MPa) e severo (- 0,4 MPa).

3.2 Status hídrico

As plantas de *M. oleifera* submetidas ao déficit hídrico, independente do tratamento de germinação, apresentaram redução ($P < 0,05$) na umidade do solo (Fig. 2C) em relação aos tratamentos irrigados (CI, MI e SI). Essa redução foi de aproximadamente 66% no primeiro estresse máximo (dia 10), e de 72% no segundo estresse máximo (dia 28). No último dia de reidratação (dia 20) não se observou diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

Apesar da redução da umidade do solo nos tratamentos sob déficit hídrico, não foi observada redução no CHR foliar ao longo de todo o período de avaliação (Fig. 2D).

3.3 Trocas gasosas

Desde o início da imposição do déficit hídrico, foi observado, ao longo do tempo, um declínio da g_s , P_N e E , e, conseqüentemente aumento acentuado da EUA (Fig. 3 A-H). No primeiro e segundo estresse máximo, a redução ($P < 0,05$) foi de aproximadamente 100% dos tratamentos estressados (CE, ME e SE) em relação aos irrigados (CI, MI e SI) para os parâmetros E e g_s .

No primeiro estresse máximo (dia 10), houve redução ($P < 0,05$) na P_N de aproximadamente 83% nos tratamentos CE e SE em relação aos tratamentos irrigados; e redução de 60% do ME em relação aos tratamentos irrigados. Já com relação a EUA , o aumento ($P < 0,05$) nos tratamentos CE e SE foi mais de 20.000% em relação aos tratamentos irrigados; e no tratamento ME o aumento foi mais de 60.000% em relação aos tratamentos irrigados. Além disso, as plantas do tratamento ME, que sofreram estresse prévio na germinação, apresentaram aumento ($P < 0,05$) em relação ao tratamento CE para os parâmetros P_N e EUA .

No segundo estresse máximo, houve redução ($P < 0,05$) na P_N dos tratamentos estressados em relação aos tratamentos irrigados: de aproximadamente 90% em CE, de 80%

em ME e SE. Com relação a *EUA*, houve aumento ($P<0,05$) entre os tratamentos estressados em relação aos irrigados: de aproximadamente 7.000% do tratamento CE; de aproximadamente 24.000% nos tratamentos ME e SE. Além disso, as plantas que sofreram estresse prévio na germinação apresentaram diferença ($P<0,05$) em relação ao tratamento CE: houve aumento no tratamento ME quanto a P_N ; e aumento dos tratamentos ME e SE quanto a *EUA*.

No período de reidratação, foi observada uma rápida recuperação dos tratamentos estressados pela tendência de um aumento na g_s , P_N e *E*, e declínio da *EUA* ao longo do tempo (Fig. 3 A-H). No entanto, no último dia de reidratação (dia 20), houve aumento ($P<0,05$) da g_s no tratamento CE em relação aos irrigados; quanto à P_N , houve aumento ($P<0,05$) no tratamento ME em relação ao MI; por outro lado, quanto à *E* houve aumento de aproximadamente 40% e 35% no tratamento CE e ME, respectivamente em relação aos tratamentos irrigados; já na *EUA*, o CE apresentou redução ($P<0,05$) de aproximadamente 30% em relação aos tratamentos irrigados, e ME apresentou aumento ($P<0,05$) de aproximadamente 67% em relação aos tratamentos irrigados. Além disso, as plantas que sofreram estresse prévio na germinação (ME e SE) apresentaram diferença ($P<0,05$) em relação ao CE para os parâmetros g_s (redução), *E* (redução) e *EUA* (aumento).

3.4 Solutos orgânicos e pigmentos fotossintéticos foliares

Foi observado acúmulo de solutos e pigmentos fotossintéticos em parte dos tratamentos estressados em relação aos irrigados ao longo do período de avaliação (Fig. 4 A-F).

No primeiro estresse máximo, houve acúmulo de CST apenas no tratamento CE (42%) em relação ao CI ($P<0,05$); de ALT em todos os tratamentos estressados em relação aos seus

respectivos tratamentos irrigados: CE (117%), ME (35%) e SE (57%); não foi observado acúmulo de PS ($P>0,05$) entre os tratamentos. Com relação aos pigmentos fotossintéticos (CLa, CLb e CRT), houve aumento em CE e SE em relação ao CI e SI, respectivamente. As plantas que sofreram estresse prévio na germinação apresentaram diferença ($P<0,05$) em relação ao tratamento CE: houve redução no conteúdo de CST e ALT nos tratamentos ME e SE; e aumento de CLa nos tratamentos ME e SE; aumento de CLb no tratamento SE.

No último dia da reidratação, houve acúmulo de CST nos tratamentos estressados (42%) em relação ao MI; de ALT nos tratamentos CE e SE, de aproximadamente 63%, em relação ao CI e SI, respectivamente; de PS no tratamento CE, de aproximadamente 76%, em relação aos tratamentos irrigados. Quanto aos pigmentos fotossintéticos, houve aumento ($P<0,05$) de CLa nos tratamentos CE (58%) e ME (27%) em relação à CI e MI, respectivamente; de CLb e CRT nos tratamentos CE, ME e SE em relação ao CI, MI, SI, respectivamente. Além disso, as plantas que sofreram estresse prévio na germinação apresentaram diferença ($P<0,05$) em relação ao tratamento CE: houve redução no conteúdo de ALT, PS e CLa nos tratamentos ME e SE; e redução de CLb e CRT no tratamento SE.

No segundo ciclo, não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos: para CST, PS, CLa e CLb. Mas, quanto ao ALT, houve aumento ($P<0,05$) apenas no ME (75%) relação ao MI; e, quanto ao CRT, houve aumento ($P<0,05$) de CE (41%) e SE (67%) em relação aos tratamentos irrigados. Além disso, as plantas do tratamento ME e SE, que sofreram estresse prévio na germinação, apresentaram aumento ($P<0,05$) de ALT em relação ao tratamento CE.

3.5 Sistema antiestresse oxidativo

Foi observado aumento do produto da peroxidação lipídica, de espécie reativa de oxigênio e da atividade enzimática em alguns tratamentos estressados em relação aos irrigados no período de primeiro e segundo tratamento de estresse máximo (Fig. 5 A-E).

No primeiro estresse máximo, houve acúmulo ($P<0,05$) de MDA nos tratamentos CE (125%), ME (107%) e SE (98%) em relação ao CI, MI e SI, respectivamente; e de H_2O_2 apenas no tratamento ME (44%) em relação ao MI. Quanto à atividade das enzimas, houve aumento ($P<0,05$) da atividade da SOD no tratamento ME (44%) em relação ao MI; da CAT no tratamento CE (153%) e ME (520%) em relação ao CI e MI, respectivamente; e da APX no tratamento ME (120%) em relação aos tratamentos irrigados. Também foi observado diferença ($P<0,05$) entre as plantas que sofreram estresse prévio na germinação em relação ao tratamento CE: houve redução de MDA nos tratamentos ME e SE; na atividade da SOD, CAT e APX houve aumento no tratamento ME.

No segundo estresse máximo, houve acúmulo ($P<0,05$) de MDA nos tratamentos ME (84%) e SE (68%) em relação ao MI e SI, respectivamente; de H_2O_2 apenas no tratamento ME (80%) em relação ao MI. Quanto à atividade enzimática, foi observado aumento ($P<0,05$) da atividade da SOD nos tratamentos CE (48%) e ME (27%) em relação aos seus respectivos tratamentos irrigados; a atividade da CAT foi aumentada ($P<0,05$) no tratamento CE (210%) e reduzida ($P<0,05$) no tratamento ME (320%) em relação ao CI e MI, respectivamente; a atividade da APX foi reduzida ($P<0,05$) no tratamento SE (70%) em relação ao SI. Também foram observadas diferenças ($P<0,05$) entre as plantas que sofreram estresse prévio na germinação em relação ao tratamento CE: houve aumento de H_2O_2 no tratamento ME; a atividade da SOD foi reduzida no tratamento SE; a atividade da CAT foi reduzida nos tratamentos ME e SE; a APX apresentou aumento de sua atividade no tratamento ME.

3.6 Biometria

Quanto ao número de folhas, houve redução ($P < 0,05$) nos tratamentos estressados em relação aos irrigados, com exceção do tratamento ME que não houve diferença ($P > 0,05$) no primeiro estresse máximo (Fig. 6A). Entretanto, não foi observado diferença ($P > 0,05$) quanto a altura nos tratamentos estressados em relação aos seus respectivos tratamentos irrigados ao longo de todo o período de avaliação (Fig. 6B).

4. DISCUSSÃO

Os mecanismos pelos quais *M. oleifera* torna tolerante ao déficit hídrico ainda são desconhecidos, uma vez que a maioria dos estudos envolvendo *M. oleifera* aborda principalmente composição química e uso medicinal. O presente estudo objetivou entender como *M. oleifera* tolera o déficit hídrico; e se o pré-tratamento na germinação ativa algum mecanismo de prevenção contra os efeitos do déficit hídrico.

Embora a semente de *M. oleifera* apresente baixa umidade, esta não possui eficiência na absorção de água quando o substrato apresenta baixa disponibilidade dela (Tabela 1). O que pode indicar que a germinação só ocorre na estação chuvosa. Resultados semelhantes foram obtidos na germinação de uma oleaginosa (*Carthamus tinctorius* L.) sob baixos potenciais osmóticos (utilizando PEG 6000), foi constatado que a redução do potencial osmótico diminui a taxa de germinação e que *C. tinctorius* não germina em potenciais abaixo de - 0,45 MPa (Dantas et al., 2011). Sementes de *Pinus taeda* L. (teor de óleo 52,3%) apresentam graus de umidade de equilíbrio mais baixos do que sementes de *Eucalyptus grandis* W. Hill. (teor de óleo 24,2%), pois absorvem menos água pelo fato de serem hidrofóbicas (Fantinatti et al., 2005).

As plantas de *M. oleifera*, quando jovens, conseguem manter seu CHR foliar alto, mesmo sob baixa umidade do solo (Fig. 2D). Com isso, auxilia a manutenção dos processos fisiológicos na célula, bem como o seu crescimento (Fig. 6B). Resultados semelhantes foram encontrados em plantas arbóreas de dois anos de idade, tal como em *Persea indica* (L.) Spreng. após 16 dias de seca (Sánchez-Díaz et al., 2007). De forma diferente em *Laurus azorica* (Seub.) Franco, *Myrica faya* Dryand. (Sánchez-Díaz et al., 2007), *Quercus ilex* L. e *Cistus albidus* L. (Galle et al., 2011), todas arbóreas, não conseguiram manter um alto CHR sob déficit hídrico. Apesar da altura da planta ser mantida, a redução no número de folhas é extremamente acentuada (Fig. 6 e 7) o que pode reduzir a área exposta à atmosfera responsável pela transpiração.

As plantas jovens de *M. oleifera*, submetidas ao déficit hídrico, apresentaram como primeira linha de defesa o fechamento estomático (Fig. 3 A-B). Parece ser comum em espécies arbóreas, tais como, *Picea abies* (L.) H. Karst. (Ditmarová et al., 2010), *L. azorica*, *P. indica*, e *M. faya* (Sánchez-Díaz et al., 2007), *Q. ilex* e *C. albidus* (Galle et al., 2011). Tal comportamento é esperado em plantas de porte arbóreo, uma vez que, a relação parte aérea/raiz é muito alta. Dessa forma, reduzir a transpiração é vital quando sob baixa disponibilidade hídrica.

No entanto, a P_N não foi reduzida na mesma proporção do que a E , o que proporcionou um aumento da EUA (Fig. 3 C-H). No período de reidratação, a recuperação fotossintética foi mais rápida do que o seu declínio sob déficit hídrico. Com apenas dois dias de reidratação, as plantas submetidas ao déficit hídrico (CE, ME e SE) já não apresentavam diferença ($P > 0,05$), quanto à P_N , em relação às irrigadas (Fig. 3 C-D). O mesmo não foi observado por Galle et al. (2011), que estudaram duas espécies arbóreas do Mediterrâneo uma sempre-verde (*Q. ilex*) e outra semi-decídua (*C. albidus*) sob ciclos recorrentes de seca e observaram um declínio mais rápido em P_N no período seco, do que a recuperação no período de reidratação. Porém, nesse

mesmo período, as plantas de *M. oleifera* estressadas mantiveram g_s com valores menores em relação às irrigadas, indicando que houve um ajuste para reduzir a transpiração e conseqüentemente um aumento ($P < 0,05$) na *EUA*. Desta forma, g_s necessitou de mais tempo para recuperação do que a P_N . Galle et al. (2011) mostraram que essa rápida recuperação de P_N acompanhada de valores baixos de g_s se deu pela alta condutância mesofílica (g_m), o mesófilo apresentou resistência menor à difusão do CO_2 , sendo o estômato o principal fator limitante para a fotossíntese. Tal comportamento conduz a uma taxa de crescimento acentuada da espécie, com alta *EUA*, mesmo sob condições onde a disponibilidade hídrica no solo possa sofrer oscilações sazonais, assim como no semiárido nordestino. Este crescimento é sustentado pela manutenção da taxa fotossintética, apesar de ser menor que a taxa potencial de quando bem hidratada, e também pelo alto CHR, o que pode ser um indicativo de uma acentuada condutividade hidráulica no interior do caule.

As plantas de *M. oleifera*, provenientes da germinação sob diferentes potenciais osmóticos, apresentaram respostas diferenciadas quando submetidas ao déficit hídrico. Com base na eficiência do uso de água, verificou-se que o tratamento ME (-0,3 MPa) apresentou maior tolerância ao déficit hídrico no primeiro estresse máximo; e, no segundo estresse máximo, o tratamento ME e SE (-0,4MPa) foram os mais tolerantes. Mesmo no período de reidratação, foram observados valores menores na g_s de ME e SE em relação ao CE, o que garantiu valores maiores de *EUA*. Estes resultados sugerem que as plantas que foram estressadas previamente na germinação podem ter adquirido memória, e assim obtiveram respostas superiores sob déficit hídrico, quando comparadas às plantas que não apresentaram estresse na germinação (CE).

No primeiro estresse máximo, as plantas jovens de *M. oleifera* modificaram seu metabolismo celular, sobretudo no tratamento CE que apresentou maior acúmulo de CST e ALT (Fig. 4 A-B). Já as plantas submetidas ao estresse prévio na germinação (ME e SE)

apresentaram menor alteração metabólica com o acúmulo de apenas ALT. Esses acúmulos de solutos no interior da célula, provavelmente se deve à pelo fato de haver pouquíssimo fluxo transpiratório, o que impede o translocamento dos carboidratos e aminoácidos para outras partes da planta. Em compensação, no segundo estresse máximo, as plantas do tratamento CE apresentaram alteração metabólica menor em relação ME e SE, indicando que houve um ajuste bioquímico em decorrência do primeiro evento de estresse (Fig. 4). Os resultados bioquímicos mostraram que o aumento no conteúdo de ALT em plantas jovens de *M. oleifera* não foi seguido pela degradação de proteínas (proteólise). Sugere-se que esse aumento de ALT seja por síntese de novos aminoácidos, o que é indicativo de tolerância (Rodrigues et al., 2010).

Não houve redução de pigmentos fotossintéticos em ambos os ciclos de seca (Fig. 4 D-E), quando comparada as plantas irrigadas. Porém, com 10 dias de reidratação, após o primeiro ciclo, o conteúdo de CLa e CLb foi maior nas plantas do CE e ME em relação a todos os tratamentos ($P < 0,05$) (Fig. 4 D-E). Além disso, houve aumento da fotoproteção através dos carotenóides, o que pode ter ajudado a dissipar o excesso de energia (Fig. 4F). A manutenção do conteúdo dos pigmentos fotossintéticos, ou seu aumento, pode contribuir para uma rápida recuperação após o período de estresse, o que pôde ser observado em P_N mesmo sob uma reduzida g_s (Fig. 3 A-D), resultados semelhantes em arbóreas podem ser encontrados em Shvaleva et al. (2006) e Sánchez-Díaz et al. (2007).

A espécie em estudo, a idade em que o estresse foi imposto e a intensidade do déficit hídrico parecem ser determinantes no comportamento do conteúdo das moléculas orgânicas presentes nas folhas, como observado em duas espécies arbóreas tropicais onde houve aumento de solutos (Rodrigues et al., 2010), em duas do Mediterrâneo (Galle et al., 2011), por outro lado não houve alteração em quatro espécies da floresta Atlântica quando jovens sob seca (Souza et al., 2010).

Como foi visto anteriormente, a primeira ação da planta contra o déficit hídrico é o fechamento estomático, que causa o aumento de temperatura foliar e pode diminuir a taxa CO_2/O_2 intracelular, diminuindo a assimilação de CO_2 e aumentando a fotorrespiração (em plantas C3) (Foyer e Noctor, 2000). O excesso de energia facilita o acúmulo de moléculas de oxigênio, proporcionando a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que pode causar dano oxidativo à célula, mas também serve como molécula sinalizadora, como no caso do peróxido de hidrogênio (Foyer e Noctor, 2000). Portanto, plantas quando submetidas ao déficit hídrico apresentam mudanças no seu metabolismo celular para evitar dano oxidativo.

O aumento no conteúdo de carotenóides não foi suficiente para evitar o dano oxidativo, verificado pelo acúmulo de MDA que é resultado da peroxidação lipídica da membrana (Fig. 5A). O tratamento CE apresentou maior atividade da CAT no primeiro estresse máximo, e de SOD e CAT no segundo. Desta forma, sugere-se que o primeiro ciclo de déficit hídrico nas plantas do tratamento CE serviu como estímulo para indução da atividade de enzimas antioxidantes (SOD e CAT) para responderem com mais vigor ao déficit hídrico no estresse recorrente, pois sabe-se que a SOD atua dismutando o $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 em vários compartimentos celulares. Walter et al. (2011) observaram aumento na fotoproteção em *Arrhenatherum elatius* (L.) P. Beauv. ex J. Presl & C. Presl submetida a ciclos recorrentes de déficit hídrico. Além disso, os resultados indicam que a maior proteção neste tratamento foi no peroxissomo, onde a CAT processa o H_2O_2 gerado pela fotorrespiração (Foyer e Noctor, 2000).

CAT e APX são as principais enzimas que eliminam o H_2O_2 nas folhas, ambas atuam cooperativamente, mas sabe-se que a APX tem mais afinidade ao H_2O_2 do que a CAT (Foyer e Noctor, 2000). Logo no primeiro estresse máximo, as plantas do tratamento ME apresentaram aumento da atividade das enzimas estudadas, mas no segundo estresse máximo só não foi observado aumento na atividade da CAT (Fig. 5 A-C). Estes resultados indicam

que o estresse prévio na germinação pode ter auxiliado como memória ao déficit hídrico, e que neste tratamento além de proteção ao peroxissomo houve aumento de proteção no cloroplasto, local principal de atuação da APX (Foyer e Noctor, 2000).

Curiosamente, as plantas do tratamento SE não apresentaram aumento nem da atividade de enzimas antioxidantes e nem no dano oxidativo em relação aos demais tratamentos estressados (Fig. 5 A-D). Porém, com menor atividade da SOD (Fig. 5A) produziu a mesma quantidade de MDA quando comparada ao CE (Fig. 5D). Estes resultados sugerem que a dissipação de ROS possa ter ocorrido por agente não enzimático, como é o caso dos carotenóides que apresentaram nível elevado durante os períodos de estresse máximo (Fig. 4F). A inibição da atividade de algumas enzimas pode ter sido em consequência de uma regulação na sua expressão gênica, da desnaturação, e/ou inativação dessas proteínas (Cavalcanti et al., 2007). Em *Eucalyptus globulus* Labill. não foi observado aumento da atividade enzimática em folhas sob déficit hídrico, porém nas raízes esta ocorreu (Shvaleva et al., 2006)

As plantas jovens de *M. oleifera* apresentaram alta plasticidade para realizarem ajustes metabólicos durante o período de seca e para serem capazes de se recuperar durante o período de reidratação. Os nossos resultados sugerem que plantas jovens de *M. oleifera* aumentam a tolerância após ciclos recorrentes de seca, utilizando mais de um mecanismo. Através da alta *EUA*, pois evita o máximo de perda hídrica por molécula de CO₂ assimilada e também a acentuada perda de folhas e manutenção do alto CHR foliar. A manutenção no conteúdo de clorofila também pode ser considerada como uma estratégia de tolerância. Além disso, as plantas jovens de *M. oleifera* minimizam o estresse oxidativo pelo aumento no conteúdo de carotenóides e da atividade de enzimas do ciclo antioxidante (SOD, CAT e APX). Entre os tratamentos estressados, os tratamentos ME e SE apresentaram maior tolerância ao déficit hídrico durante todo o período de avaliação. Portanto, as sementes de *M. oleifera* submetidas

a um estresse prévio, no período germinativo, têm a capacidade de adquirir memória à seca, possibilitando uma maior tolerância aos ciclos recorrentes de seca.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao CNPq pelo suporte financeiro dado a pesquisa com plantas com potencial oleaginoso (Proc. CNPq483550/20108). R. Rivas é grata pela bolsa escolar do CNPq. M. T. Oliveira é grato pela bolsa escolar recebida da FACEPE. M.G. Santos é grato pela bolsa de produtividade recebida através do CNPq.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ.* 24, 1337–1344.

Barrs, H.D., Weatherley, P.E., 1962. A reexamination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust. J. Biol. Sci.* 15, 413–428.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Anal. Bioch.* 72, 248-254.

Bruce, T.J.A., Metthes, M.C., Napier, J.A., Pickett, J.A., 2007. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Sci.* 173, 603-608.

Cakmak, I., Horst, J., 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.* 83, 463–468.

Cavalcanti, F.R., Lima, J.P., FerreiraSilva, S.L., Viégas, R.A., Silveira, J.A., 2007. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. *J. Plant. Physiol.* 164, 591-600.

Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C., 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 103, 551-560.

Dantas, C.V.S., Silva, I.B., Pereira, G.M., Maia, J.M., Lima, J.P.M.S., Macedo, C.E.C., 2011. Influência da sanidade e déficit hídrico na germinação de sementes de *Carthamus tinctorius* L. *Rev. Bras. Sementes.* 33, 574-582.

- Ditmarová, L., Kurjak, D., Palmroth, S., Kmet, J., Strelcová, K., 2010. Physiological responses of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings to drought stress. *Tree Physiol.* 30, 205-213.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Reders, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Fantinatti, J.B., Usberti, R., Brod, F.P.R. 2005. Isotermas de sorção de sementes de *Eucalyptus grandis* e *Pinus taeda*. *Rev. bras. Sementes.* 27, 6-11.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytol.* 146, 359-388.
- Galle, A., Florez-Sarasa, I., Aououad, H.E., Flexas, J., 2011. The Mediterranean evergreen *Quercus ilex* and the semi-deciduous *Cistus albidus* differ in their leaf gas exchange regulation and acclimatation to repeated drought and rewatering cycles. *J. Exp. Bot.* 62, 5207-5216.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases: occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309–314.
- Havir, E.A., McHale, N.A., 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 84, 450–455.
- Hsiao, T.C., 1973. Plant response to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24, 519-570.
- Iqbal M., Ashraf M., 2007. Seed preconditioning modulates growth, ionic relations, and photosynthetic capacity in adult plants of hexaploid wheat under salt stress. *J. Plant Nutr.* 30, 381–396.
- Kibazohi O., Sangwan R.S., 2011. Vegetable oil production potential from *Jatropha curcas*, *Croton megalocarpus*, *Aleurites moluccana*, *Moringa oleifera* and *Pachira glabra*: Assessment of renewable energy resources for bioenergy production in Africa. *Biomass Bioenerg.* 35, 1352-1356.
- Kramer, P.J., Boyer, J.S., 1995. Water relations of plants and soils. Academic Press, New York.
- Lichthenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, in: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds), *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 350-382.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas, segunda ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Moore, S., Stein, W., 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* 221, 907-913.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867–880.
- Palada, M.C., Chang, L.C., 2003. Suggested Cultural Practices for Moringa. International Cooperators' Guide AVRDC. AVRDC pub # 03545, 1–5.
- Rashid, U., Anwar, F., Moser, B.R., Knothe, G., 2008. *Moringa oleifera* oil: A possible

source of biodiesel. *Biosour. technol.* 99, 8175-8179.

Rodrigues, B.M., Souza, B.D., Nogueira, R.M., Santos, M.G., 2010. Tolerance to water deficit in young trees of jackfruit and sugar apple. *Rev. Ciênc. Agron.* 41, 245-252.

Rouhi, H.R., Surki, A.A., SharifZadeh, F., Afshari, R.T., Aboutalebian, M.A., Ahmadvand, G., 2011. Study of Different Priming Treatments on Germination Traits of Soybean Seed Lots. *Not. Sci. Biol.* 3, 101-108.

Sánchez-Díaz, M., Tapia, C., Antolín, M.C., 2007. Drought induced oxidative stress in Canarian laurel forest tree species growing under controlled conditions. *Tree Physiol.* 27, 1415-1422.

Sharma, V., Paliwal, R., Sharma, P., Sharma, S., 2011. Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant activities of hydroethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. *Pods. J. Pharm. Res.* 4, 554-557.

Shvaleva, A., Costa, L., Silva, F.E., Breia, E., Jouve, J., Hausman, J.F., Almeida, M.H., Maroco, J.P., Rodrigues, M.L., Pereira, J.S., Chaves, M.M., 2006. Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. *Tree Physiol.* 26, 239-248.

Silva, J.P.V., Serra, T.M., Gossman, M., Wolf, C.R., Meneghetti, M.R., Meneghetti, S.M.P., 2010. *Moringa oleifera* oil: Studies of characterization and biodiesel production. *Biomass and Bioenerg.* 24, 1527-1530.

Souza, B.D., Rodrigues, B.M., Endres, L., Santos, M.G., 2010. Ecophysiology parameters of four Brazilian Atlantic Forest species under shade and drought stress. *Acta. Physiol. Plant.* 32, 729-737.

Thapa, G., Dey, M., Sahoo, L., Panda, S.K., 2011. An insight into the drought stress induced alterations in plants. *Biol. Plant.* 55, 603613.

Uzilday, B., Turkan, I., Sekmen, A.H., Ozgur, R., Karakaya, H.C., 2012. Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C4) and *Cleome spinosa* (C3) under drought stress, *Plant Sci.* 182, 59-70.

Villela, F.A., Doni-Filho, L., Sequeira, E.L., 1991. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura. *Pesqui. Agropec. Bras.* 26, 1957-1968.

Xu, S.C., Hu, J., Li, Y.P., Ma, W.G., Zheng, Y.Y., Zhu, S.J., 2011. Chilling tolerance in *Nicotiana tabacum* induced by seed priming with putrescine. *Plant Growth Regul.* 63, 279-290.

Walter, J., Nagy, L., Hein, R., Rascher, U., Beierkuhnlein, C., Willner, E., Jentsch, A., 2011. Do plants remember drought? Hints towards a drought memory in grasses. *Environ. Exp. Bot.* 71, 34-40.

TABELA

Tabela 1. Germinabilidade (G%) e velocidade média de germinação (VMG) de sementes de *Moringa oleifera* submetidas a diferentes potenciais osmóticos (MPa).

Tratamento (MPa)	G%	VMG (dias ⁻¹)
0,0	94,5 ± 1,79 A	0,14 ± 0,004 A
- 0,1	71,0 ± 4,82 B	0,08 ± 0,007 B
- 0,2	76,0 ± 3,54 B	0,09 ± 0,006 B
- 0,3	52,5 ± 3,90 C	0,09 ± 0,006 B
- 0,4	6,0 ± 2,12 D	0,05 ± 0,014 C

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de *Student Newman Keuls* a 5% de probabilidade, ±E.P, n=4.

LEGENDAS DE FIGURA

Fig. 1. Esquema do desenho experimental de *Moringa oleifera* submetida a ciclos recorrentes de déficit hídrico. Contendo seis tratamentos controle estressado (CE), moderado estressado (ME), severo estressado (SE), controle irrigado (CI), moderado irrigado (MI) e severo irrigado (SI). Valores em porcentagem indicam a quantidade de rega em relação da capacidade de pote.

Fig. 2. Temperatura (°C) e Umidade relativa do ar (UR%) (A). Fluxo de fótons fotossintéticos ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) utilizados nas medidas de trocas gasosas (B). Seta para baixo indica estresse máximo do primeiro ciclo (dia 10), e seta para cima indica último dia de reidratação e início do segundo ciclo de estresse (dia 20). Umidade do solo (US%) (C) e conteúdo hídrico relativo (CHR) foliar (D) de plantas jovens de *Moringa oleifera* submetidas aos tratamentos: controle estressado (CE), moderado estressado (ME), severo estressado (SE), controle irrigado (CI), moderado irrigado (MI) e severo irrigado (SI) no estresse máximo (dia 10) do primeiro ciclo, último dia de reidratação (dia 20) e máximo estresse (dia 28). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Student Newman Keuls*, a 5% de probabilidade, $\pm\text{E.P.}$, $n=4$

Fig. 3. (A-B) Condutância estomática (g_s), (C-D) assimilação líquida de CO_2 (P_N), (E-F) transpiração (E), e (G-H) eficiência do uso de água (EUA) de plantas jovens de *Moringa oleifera* submetidas aos tratamentos controle estressado (CE), moderado estressado (ME), severo estressado (SE), controle irrigado (CI), moderado irrigado (MI) e severo irrigado (SI) ao longo de todo o período de experimento. Seta para baixo indica estresse máximo do primeiro ciclo (dia 10), e seta para cima indica último dia de reidratação e início do segundo ciclo de estresse (dia 20). Barras verticais representam $\pm\text{E.P.}$ ($n=4$).

Fig. 4. Mudanças no conteúdo de (A) carboidratos solúveis totais (CST), (B) aminoácidos livres totais (ALT), (C) proteínas solúveis (PS), (D) clorofila a (CLa), (E) clorofila b (CLb) e (F) Carotenóides (CRT) em folhas de plantas jovens de *Moringa oleifera* submetidas aos tratamentos controle estressado (CE), moderado estressado (ME), severo estressado (SE), controle irrigado (CI), moderado irrigado (MI) e severo irrigado (SI) durante o primeiro estresse máximo (dia 10), último dia de reidratação (dia 20) e segundo estresse máximo (dia 28). Médias seguidas pela mesma letra não diferem ($P<0,05$) pelo teste de *Student Newman Keuls* a 5% de probabilidade. Barras verticais representam $\pm\text{E.P.}$ ($n=4$).

Fig. 5. Alteração da atividade de enzimas antioxidantes (A) superóxido dismutase (SOD), (B) catalase (CAT), (C) ascorbato peroxidase (APX) e mudanças no conteúdo foliar de (D) aldeído malônico (MDA), (E) peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em plantas jovens de *Moringa oleifera* submetidas aos tratamentos controle estressado (CE), moderado estressado (ME), severo estressado (SE), controle irrigado (CI), moderado irrigado (MI) e severo irrigado (SI) durante o primeiro estresse máximo (dia 10), último dia de reidratação (dia 20) e segundo estresse máximo (dia 28). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de *Student Newman Keuls* a 5% de probabilidade. Barras verticais representam $\pm\text{E.P.}$ ($n=4$).

Fig. 6. Número de folhas (A) e altura (B) em plantas de jovens de *Moringa oleifera* submetidas aos tratamentos controle estressado (CE), moderado estressado (ME), severo estressado (SE), controle irrigado (CI), moderado irrigado (MI) e severo irrigado (SI) durante o primeiro estresse máximo (dia 10), último dia de reidratação (dia 20) e segundo estresse

máximo (dia 28). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de *Student Newman Keuls* a 5% de probabilidade. Barras verticais representam \pm E.P. (n=5).

Fig. 7. Aspectos das plantas jovens de *Moringa oleifera* provenientes dos seis diferentes tratamentos: controle estressado (CE), moderado estressado (ME), severo estressado (SE), controle irrigado (CI), moderado irrigado (MI), severo irrigado (SI). No dia do estresse máximo do segundo ciclo de estresse (dia 28).

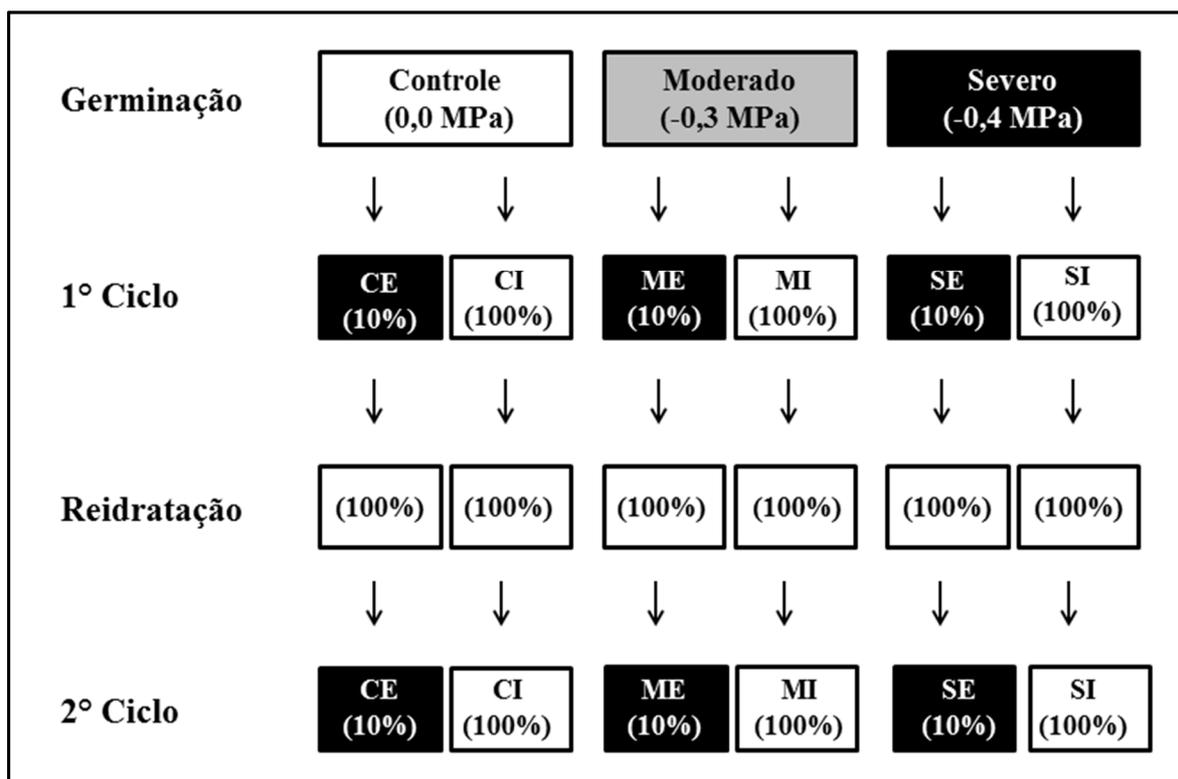


Fig. 1

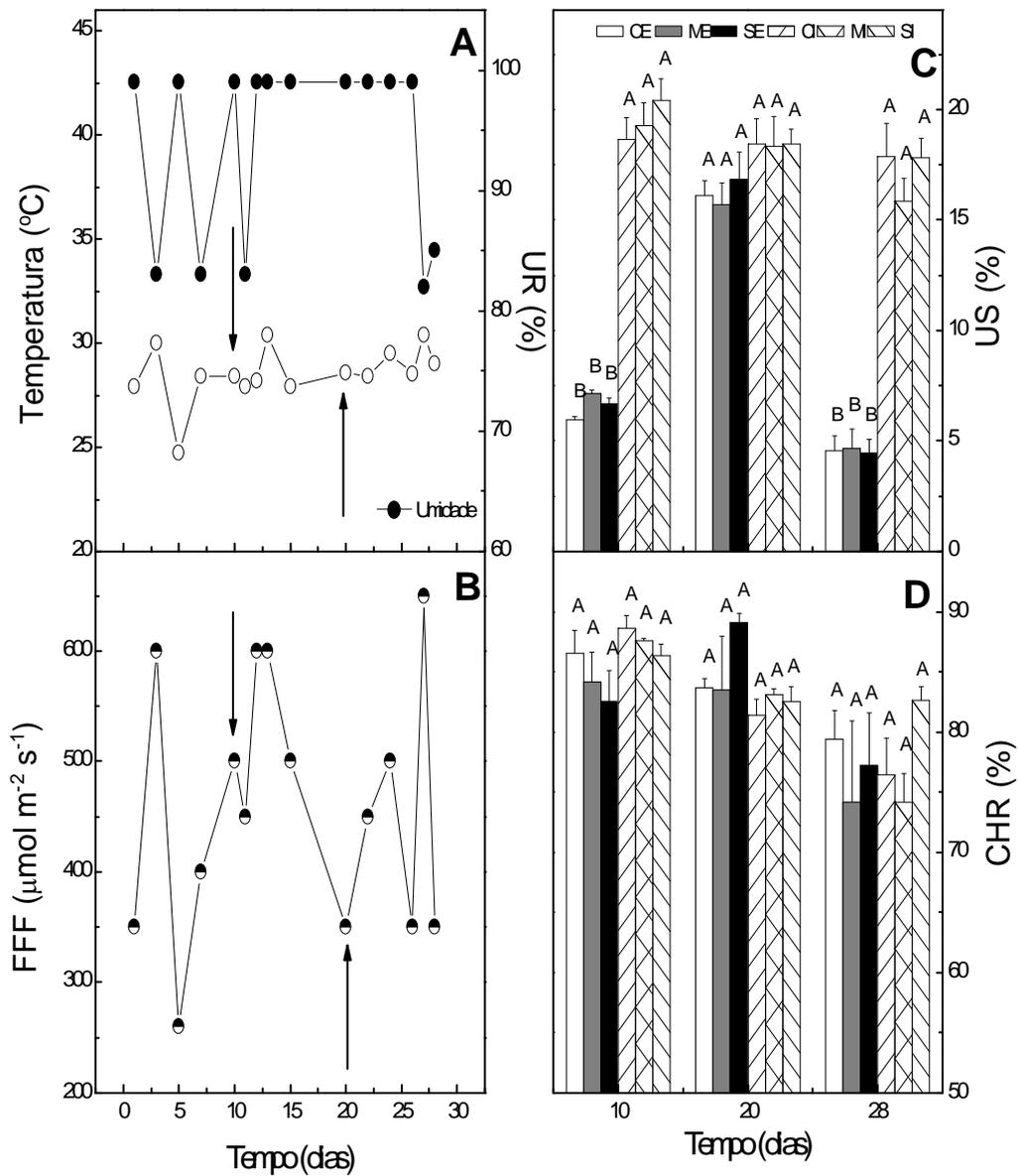


Fig. 2

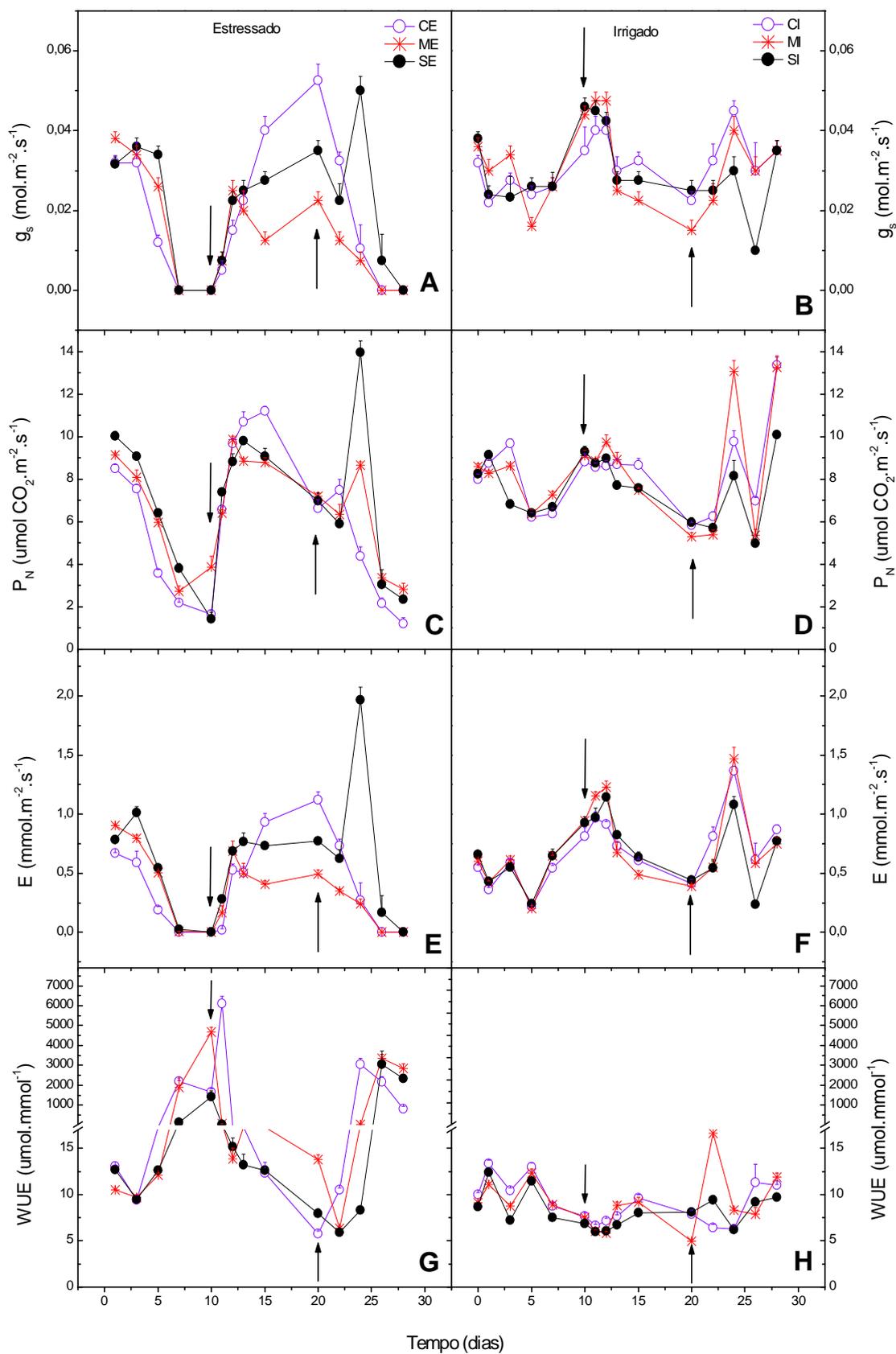


Fig. 3

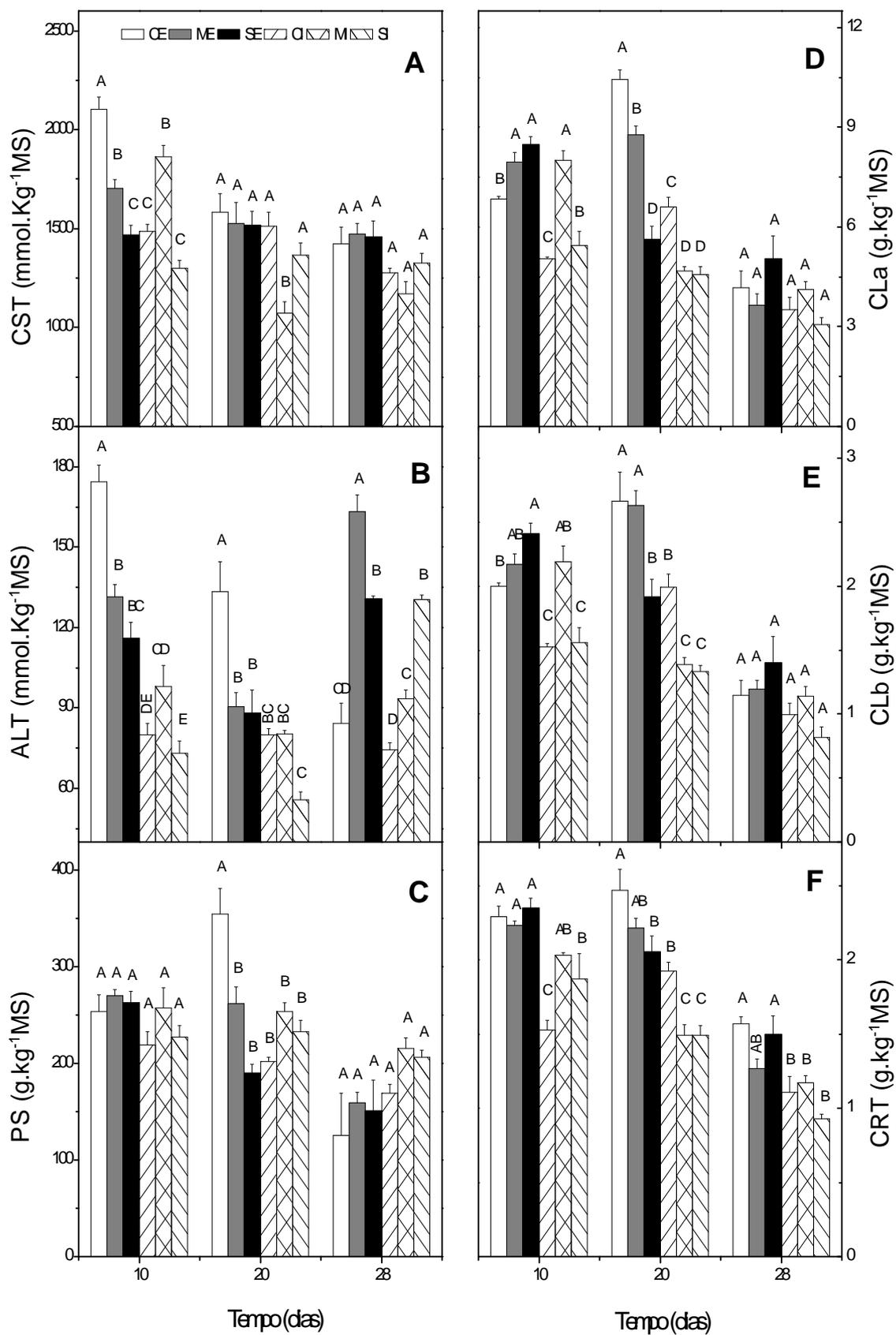


Fig. 4

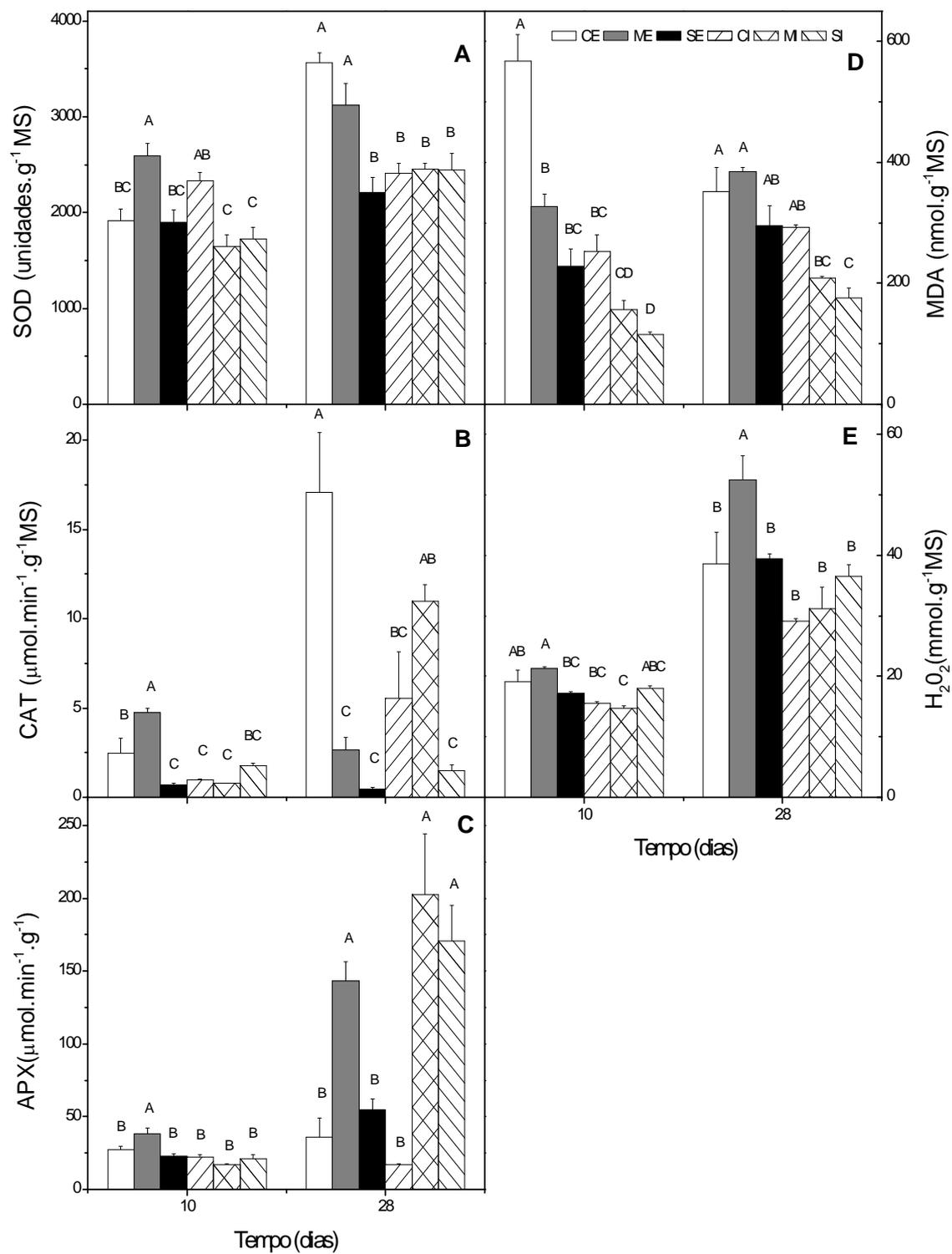


Fig. 5

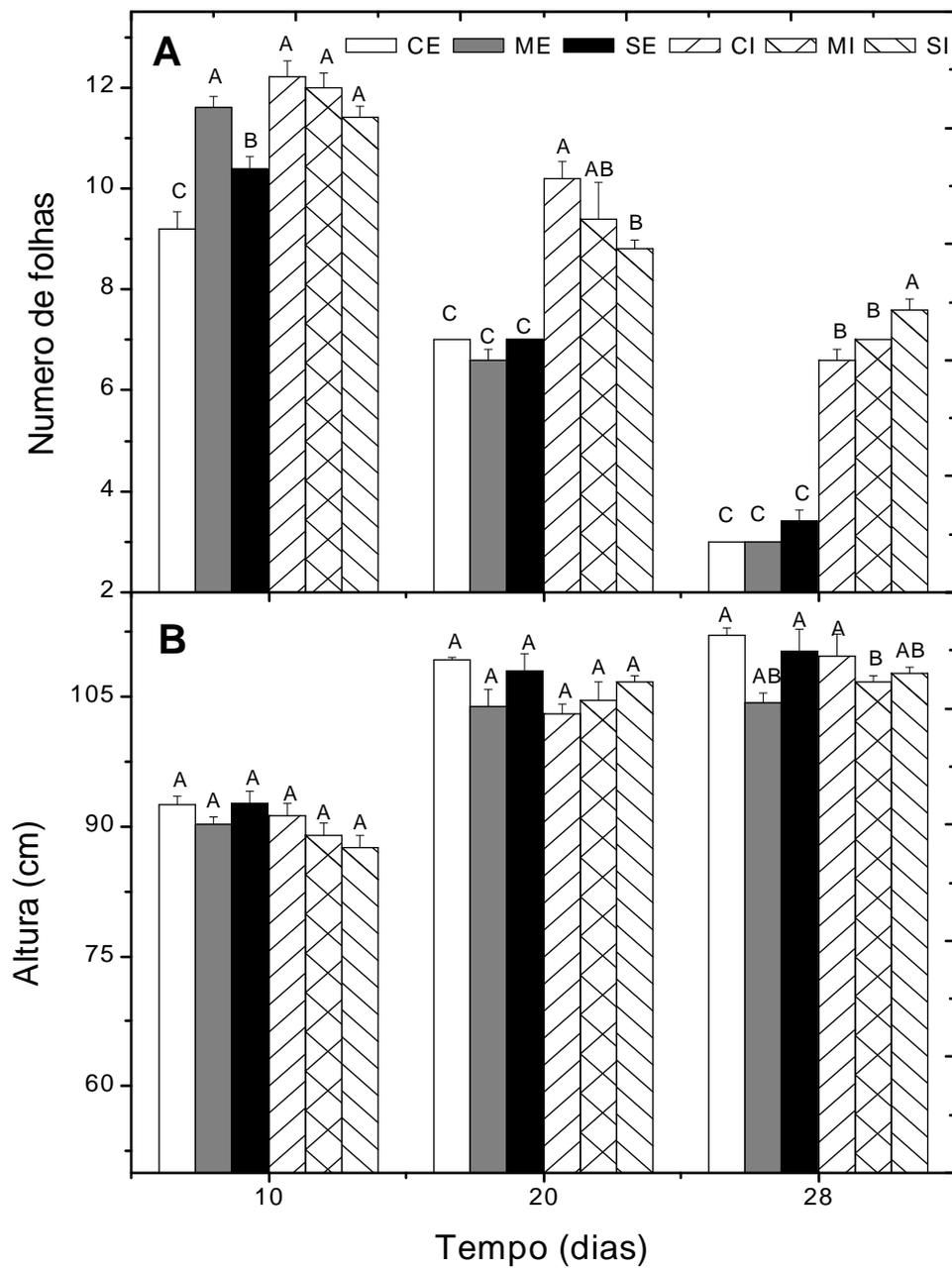


Fig. 6

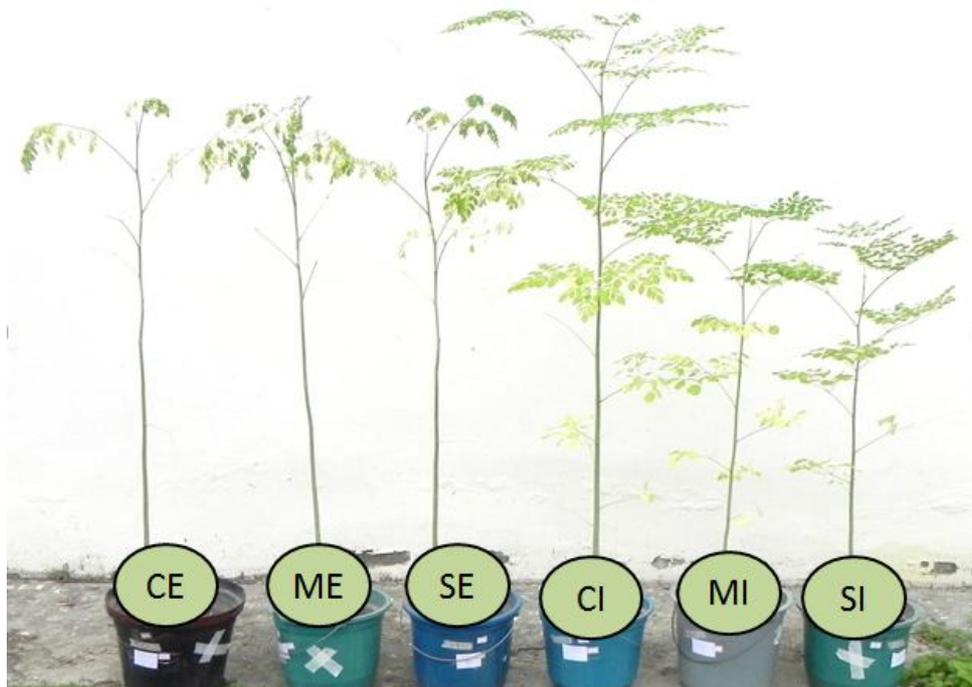


Fig. 7

CONCLUSÕES

1. A redução do potencial osmótico limita a germinação de sementes de *M. oleifera*;
2. As plantas jovens de *M. oleifera* aumentam a tolerância após ciclos recorrentes de seca, utilizando alta eficiência do uso da água, acentuada perda de folhas, manutenção de um alto conteúdo hídrico relativo foliar, manutenção no conteúdo de clorofila, aumento da defesa antioxidante pelo conteúdo de carotenóides e da atividade de enzimas do ciclo antioxidativo (superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase);
3. As sementes de *M. oleifera* submetidas a um estresse prévio (ME e SE), no período germinativo, tem a capacidade de adquirir memória à seca, possibilitando uma maior tolerância aos ciclos recorrentes de seca em relação às plantas que não sofreram estresse prévio (CE).

RESUMO

Moringa oleifera é uma arbórea, tolerante à seca e a solos pobres, no semiárido nordestino, compreendendo uma alternativa para os sertanejos que vivem a nível de subsistência. É principalmente utilizada na limpeza de água por apresentarem propriedades coagulantes e floculantes. As sementes apresentam destacado valor comercial contendo alto teor de óleo com qualidades ímpares para produção de biocombustível. Estudos recentes indicam que quando a planta sofre uma exposição prévia a um estresse, ela tem a capacidade de responder mais rápido e com mais vigor a um evento de estresse recorrente, esse fenômeno é conhecido como endurecimento (*hardening*). Isso implica que as plantas tem a capacidade de memória (*stress imprint*). O objetivo do trabalho foi avaliar se plantas jovens de *Moringa oleifera* são capazes de carregar na memória estresses hídricos recorrentes ocorridos desde a germinação das sementes até o porte de plantas jovens e com isso apresentar maior tolerância à seca. As sementes foram germinadas em baixos potenciais osmóticos 0,0; - 0,1; - 0,2; - 0,3; - 0,4 e - 0,5 MPa. Foram utilizadas plantas jovens com 50 dias após a emergência, originadas da germinação de três potenciais osmóticos 0,0; - 0,3 e - 0,4 MPa. Para cada tratamento de germinação houve dois regimes hídricos: as irrigadas (100% da capacidade de pote) e as estressadas (10% da capacidade de pote), totalizando seis tratamentos. Foram realizados dois ciclos de déficit hídrico intercalados por 10 dias de reidratação. Foram analisados os parâmetros de germinação, trocas gasosas, bioquímica, enzimática e biometria. As sementes de *M. oleifera* não germinaram em potenciais osmóticos menores que - 0,4 MPa. As plantas jovens de *M. oleifera* foram tolerantes aos ciclos recorrentes de seca em decorrência do alto conteúdo hídrico relativo (CHR), da alta eficiência do uso de água (EUA), da manutenção no conteúdo de clorofila, da síntese de novos aminoácidos, além do aumento da atividade de enzimas antioxidantes e de carotenóides. Após o primeiro ciclo a taxa fotossintética foi recuperada rapidamente, indicando a preservação do metabolismo mesofílico. As plantas estressadas provenientes do tratamento - 0,3 e - 0,4 MPa apresentaram maior tolerância ao déficit hídrico do que as plantas estressadas provenientes do tratamento 0,0 MPa. Sugerindo que as sementes submetidas a um estresse prévio, no período germinativo, tem a capacidade de adquirir memória à seca, possibilitando à *M. oleifera* uma maior tolerância a ciclos recorrentes.

Palavras-chave: estresse abiótico, oleaginosa, déficit hídrico, trocas gasosas, ROS

ABSTRACT

Moringa oleifera is a poor soil, drought tolerant tree. It can be found in arid lands, like Northeast Brazil, and is an alternative for those who live there. It is mainly used in order to clean water by coagulants and flocculating properties. The seeds have high commercial value and contain high oil percentage with high quality for biofuel production. Recent studies indicate that when the plant suffers a prior exposure to stress (priming), it has the ability to respond faster and stronger to a recurring stress event: a phenomenon known as hardening. This implies that the plants have memory (stress imprint) capacity. The goal of this essay was to assess if young plants of *Moringa oleifera* are able to keep in memory recurring hydric stress events that occurred from seed germination to the seedlings and, this way, display increased drought tolerance. The seeds were germinated on low osmotic potentials 0.0; - 0.1; - 0.2; - 0.3 and - 0.4 MPa. Young plants, 50 days after the emergency, were used (originated from the germination of three osmotic potentials: 0.0; - 0.3 and - 0.4 Mpa). For each germination treatment there were two water regimes: the irrigated (100% of the pot capacity) and the stressed ones (10% of the pot capacity), totalizing six treatments. Two cycles of water deficit were conducted, interspersed by 10 days of rehydration. The analyzed parameters were gas exchange, biochemistry, enzymatic and biometrics. The *M. oleifera* seeds didn't germinate on osmotic potentials lower than - 0.4 MPa. The young plants of *M. oleifera* are tolerant to recurring cycles of drought because of its high water content (CHR), high water use efficiency (EUA), maintenance of the chlorophyll contents, increased activity of antioxidant enzymes and carotenoids. After the first cycle, the photosynthetic rate was recovered quickly, indicating preservation of the mesophyll metabolism. The stressed plants from - 0.3 and - 0.4 MPa treatments presented greater tolerance to water deficit than stressed ones from 0.0 MPa treatment. Suggesting that seed submitted to a prior stress in germinal period, has the ability to acquire drought memory, enabling the *M. oleifera* a greater tolerance to recurring cycles.

Keywords: abiotic stress, oilseed, gas exchange, ROS

ANEXO



ENVIRONMENTAL AND EXPERIMENTAL BOTANY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.2
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0098-8472

DESCRIPTION

Environmental and Experimental Botany (EEB) publishes research papers on the physical, chemical, biological, molecular mechanisms and processes involved in the responses of plants to their environment.

In addition to research papers, the journal includes review articles. Submission is in agreement with the Editors-in-Chief.

The Journal also publishes special issues which are built by invited guest editors and are related to the main themes of EEB.

The areas covered by the Journal include:

- (1) Responses of plants to heavy metals and pollutants
- (2) Plant/water interactions (salinity, drought, flooding)
- (3) Responses of plants to radiations ranging from UV-B to infrared
- (4) Plant/atmosphere relations (ozone, CO₂, temperature)
- (5) Ecophysiology of Northern plants under global change and environmental stress

Each submitted manuscript related to these areas should be based on an explicitly elaborated mechanistic hypothesis.

The following types of manuscripts are not suitable for EEB: purely descriptive studies, use of unicellular or micro-organisms as models, agricultural investigations, phytopathological studies, ecological reports, studies of plant biology without considering environmental factors.

AUDIENCE

Plant scientists, physiologists and molecular biologists.

IMPACT FACTOR

2010: 2.699 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
 Biological & Agricultural Index
 Current Contents
 EMBiology
 Elsevier BIOBASE
 Environmental Periodicals Bibliography
 GEOBASE
 INSPEC
 PASCAL/CNRS
 Science Citation Index
 Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief

J.-C. Kader, Université Pierre et Marie Curie, Sorbonne Universités, Paris, France
K. Taulavuori, University of Oulu, Oulu, Finland

Editorial Board

C. Abdelly, INRST, Hammam-Lif, Tunisia
J. Abe, University of Tokyo, Bunkyo-Ku, Japan
C. Arrese-Igor, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, Spain
J. Barcelo, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Spain
G.B. Begonia, Jackson State University, Jackson, MS, USA
J.P. Bennett, University of Wisconsin at Madison, Madison, WI, USA
J.W. Bjerke, Norwegian Institute for Nature Research- NINA, Tromsø, Norway
J.F. Bornman, Curtin University, Perth, WA, Australia
A. Calatayud, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada, Spain
D. Close, University of Tasmania, Hobart, TAS, Australia
J.A.G. da Silveira, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - Ceará, Brazil
J.F. Dat, Université de Franche-Comté, Besançon, France
T.A. Day, Arizona State University, Tempe, AZ, USA
Th.A. Dueck, AB-DLO, Wageningen, Netherlands
J. Flexas, Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, Spain
J.L. Garcia-Hernandez, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), Torreon, Coahuila, Mexico
D.P. Häder, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany
S.P. Hardegree, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Boise, ID, USA
J. He, Nanyang Technological University, Singapore, Singapore
B. Heuer, Agricultural Research Organization (ARO), Bet Dagan, Israel
H-W. Koyro, Justus-Liebig-Universität Gießen, Giessen, Germany
F.R. Larher, Université de Rennes I, Rennes Cedex, France
J. Leipner, Zürich, Switzerland
C. Lütz, Botanical Institute, Innsbruck, Austria
A. Lux, Comenius University in Bratislava, Bratislava, Slovakia
L.Q. Ma, University of Florida, Gainesville, FL, USA
A. Massacci, National Research Council (CNR), Roma, Italy
B.L. McMichael, Crop Syst. Research Laboratory, Lubbock, TX, USA
S. Munne-Bosch, University of Barcelona, Barcelona, Spain
S.R. Pezeshki, University of Memphis, Memphis, TN, USA
L.-J. Qu, Peking University, Beijing, China
F. Rivas, National Agricultural Research Institute, Salto, Uruguay
L. Sanita' di Toppi, Università di Parma, Parma, Italy
D. Savvas, Agricultural University of Athens, Athens, Greece
H. Schat, Vrije Universiteit Amsterdam, Amsterdam, Netherlands
A. Sellin, University of Tartu, Tartu, Estonia
R. Serraj, ICARDA, Aleppo, Syrian Arab Republic

A.K. Shanker, National Research Centre for Agroforestry, Jhansi, Uttar Pradesh, India
C. Tang, La Trobe University, Melbourne, VIC, Australia
E. Taulavuori, University of Oulu, Oulu, Finland
T.J. Tschaplinski, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, USA
I. Turkan, Ege University, Izmir, Turkey
J.C.V. Vu, University of Florida, Gainesville, FL, USA
F. Wechsung, Potsdam Institut für Klimafolgenforschung, Potsdam, Germany
C. Wei, Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China
R.R. Wise, University of Wisconsin at Oshkosh, Oshkosh, WI, USA
M. Wisniewski, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Kearneysville, WV, USA
T. Yoshihara, Central Research Institute of Electric Power Industry (CRIEPI), Chiba, Japan
W.-H. Zhang, Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Aims and Scope of the Journal *Environmental and Experimental Botany*

Environmental and Experimental Botany (EEB) publishes research papers on the physical, chemical, biological, molecular mechanisms and processes involved in the responses of plants to their environment.

In addition to research papers, the journal includes review articles. Submission is in agreement with the Editors-in-Chief.

The Journal also publishes special issues which are built by invited guest editors and are related to the main themes of EEB.

The areas covered by the Journal include:

- (1) Responses of plants to heavy metals and pollutants
- (2) Plant/water interactions (salinity, drought, flooding)
- (3) Responses of plants to radiations ranging from UV-B to infrared
- (4) Plant/atmosphere relations (ozone, CO₂, temperature)
- (5) Ecophysiology of Northern plants under global change and environmental stress

Each submitted manuscript related to these areas should be based on an explicitly elaborated mechanistic hypothesis.

The following types of manuscripts are not suitable for EEB: purely descriptive studies, use of unicellular or micro-organisms as models, agricultural investigations, phytopathological studies, ecological reports, studies of plant biology without considering environmental factors.

Types of paper

1. Original full papers (Regular Papers)
2. Review articles on Environmental Issues in Plant Science.

Original papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Reviews should be related to an area covered by the journal. These are written on invitation or after initial contact with the Editor-in-Chief.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EU Directive 2010/63/EU for animal experiments* http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have

entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/eeb/>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 5 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Authors and Editor(s) are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Database linking and Accession numbers

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below.

Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: **Database ID: xxxx**

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- **GenBank**: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
- **PDB**: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- **CCDC**: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
- **TAIR**: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
- **NCT**: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- **OMIM**: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- **MINT**: Molecular INTeractions database (MINT ID: 6166710)
- **MI**: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)
- **UniProt**: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

Math Formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics.

Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text).

Subscripts and superscripts should be clear.

Greek letters and other non-Roman or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l.

Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are: *P <0.05, **P <0.01 and ***P <0.001.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g., Ca²⁺, not as Ca⁺⁺. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ¹⁸O.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference

Note: Authors are strongly encouraged to check the accuracy of each reference against its original source.

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer,1989, pp. 12-16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates -- publications of the same author with one co-author -- publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1994a, 1994b, etc.
5. Use the following system for arranging your references, please note the proper position of the punctuation:
 - a. *For periodicals* Chettri, M.K., Sawidis, T., Zachariadis, G.A., Stratis, J.A., 1997. Uptake of heavy metals by living and dead Cladonia thalli. *Environ. Exp. Bot.*37, 39-42.
 - b. *For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical* Rice, K., 1992. Theory and conceptual issues. In: Gall, G.A.E., Staton, M. (Eds.), *Integrating Conservation Biology and Agricultural Production. Agriculture, Ecosystems and Environment* 42, 9-26.

c. *For books* Gaugh, Jr., H.G., 1992. *Statistical Analysis of Regional Field Trials*. Elsevier, Amsterdam.

d. *For multi-author books* DeLacy, I.H., Cooper, M., Lawrence, P.K., 1990. Pattern analysis over years of regional variety trials: relationship among sites. In: Kang, M.S. (Ed.), *Genotype by Environment Interaction and Plant Breeding*. Louisiana State University, Baton Rouge, LA, pp. 189-213.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references according to the Bibliographic Guide for Editors and Authors (The Chemical Abstracts Service, The Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA).

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Roman alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;

2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;

3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Journal abbreviations source

Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references according to the Bibliographic Guide for Editors and Authors (The Chemical Abstracts Service, The Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA).

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Linking to and depositing data at PANGAEA

Electronic archiving of supplementary data enables readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in your paper. We recommend that data should be deposited in the data library PANGAEA (<http://www.pangaea.de>). Data are quality controlled and archived by an editor in standard machine-readable formats and are available via Open Access. After processing, the author receives an identifier (DOI) linking to the supplements for checking. As your data sets will be citable you might want to refer to them in your article. In any case, data supplements and the article will be automatically linked as in the following example: doi:10.1016/0016-7037(95)00105-9. Please use PANGAEA's web interface to submit your data (<http://www.pangaea.de/submit/>).

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>