

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Vegetal**

CAMILA DIAS BARROS MEDEIROS

Como a cera epicuticular interfere nas trocas gasosas e no metabolismo foliar de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (Apocynaceae) ao longo de uma cronossequência de Caatinga?

RECIFE

2015

CAMILA DIAS BARROS MEDEIROS

Como a cera epicuticular interfere nas trocas gasosas e no metabolismo foliar de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (Apocynaceae) ao longo de uma cronossequência de Caatinga?

Dissertação de apresentada 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 sob orientação do Prof. Dr. Mauro Guida dos Santos.

RECIFE

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Medeiros, Camila Dias Barros

Como a cera epicuticular interfere nas trocas gasosas e no metabolismo foliar de *Aspidosperma pyriforme* Mart. (Apocynaceae) ao longo de uma cronosequência de Caatinga?/ Camila Dias Barros Medeiros – Recife: O Autor, 2015.

77 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Mauro Guida dos Santos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, Biologia Vegetal, 2015.

Inclui bibliografia e anexo

1. Apocynaceae 2. Cutícula 3. Caatinga I. Santos, Mauro Guida dos (orientador) II. Título

583.93

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015- 70

CAMILA DIAS BARROS MEDEIROS

“COMO A CERA EPICUTICULAR INTERFERE NAS TROCAS GASOSAS E NO METABOLISMO FOLIAR DE *Aspidosperma pyrifolium* MART. (Apocynaceae) AO LONGO DE UMA CRONOSSEQUÊNCIA DE CAATINGA?”.

APROVADA EM 12/02/2015

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Mauro Guida dos Santos (Orientador) - UFPE

Dr. André Luiz Alves de Lima - UFRPE

Dr. Antônio Fernando Morais de Oliveira - UFPE

RECIFE

2015

Aos meus pais e amigos, que têm sido o meu suporte e força pra seguir sempre
em frente de cabeça erguida,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Carmem e Aprígio, por todo o suporte durante esses seis anos distante de casa. Obrigada por tudo, pelo amor, pela compreensão e pelo apoio, particularmente quando, nas horas que eu devia estar ao seu lado, estava trabalhando nesse projeto. Todo o meu esforço e trabalho é por vocês.

Ao meu orientador, que tem me acompanhando em quase seis anos de parceria, sempre à disposição, gentil, atencioso e paciente. Muito obrigada pelo apoio e pela confiança depositada em mim, que me incentivou a continuar firme mesmo nos momentos mais duros.

A Hiram, meu companheiro de aventuras nesse mestrado! Obrigado por estar sempre disposto a trabalhar, seja em campo ou laboratório, sempre colocando todo mundo pra cima e ajudando a nunca deixar a peteca cair! A Karla, Marciel e Frosi por sempre estarem por perto com palavras de apoio e incentivo. A todos e a cada um dos meus colegas do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal (LEV), que eventualmente se tornaram grandes amigos e companheiros. Esse trabalho tem um pedacinho de cada um de vocês. Muito obrigada por tudo!

Às minhas meninas lindas, Gabriela, Larissa, Carol e Maíra, e ao meu grande amigo Eliziel, que me acompanharam do início ao fim dessa jornada, me tirando um pouco do mundo da fisiologia vegetal. Vocês me ajudaram a crescer como pessoa e me ensinaram o significado da palavra amizade! Obrigada pelas risadas, abraços, conversas maravilhosas e por me fazerem uma pessoa mais feliz.

À professora Jarcilene por todo o suporte e por ter me acolhido com carinho no seu grupo de pesquisa.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal pela ótima educação que recebi e pela chance de crescer profissionalmente na área que escolhi trabalhar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro cedido para a realização da pesquisa.

“Don't worry about a thing,
'Cause every little thing is gonna be alright.”

-Bob Marley

RESUMO

A cera epicuticular tem sido apontada como uma adaptação física importante a uma grande gama de fatores ambientais, como secas, alta irradiância e herbivoria. Em um ambiente caracterizado por um regime de chuvas irregulares, como o semiárido brasileiro, ela pode atuar como um fator determinante do conjunto de espécies capazes de se estabelecer em diferentes estágios do processo de regeneração natural. Apesar de ser reconhecida como um componente importante do sistema de defesa das folhas contra a perda de água para o ambiente, ainda não foi esclarecido de que maneira a cera epicuticular interfere no metabolismo foliar. Nesse trabalho, investigamos como a cera epicuticular contribui para a redução da perda de água para o ambiente e o seu impacto nas trocas gasosas em diferentes estádios do processo de sucessão ecológica. Para tanto, utilizamos indivíduos de *Aspidosperma pyrifolium* (Mart.) de mesma idade, localizados em três áreas em diferentes estádios do processo de sucessão: inicial, intermediário e tardio. Em cada indivíduo foram avaliadas folhas intactas e folhas que sofreram remoção mecânica da cera epicuticular das faces abaxial e adaxial, utilizando uma solução de goma arábica (1,5 g. mL⁻¹). Avaliamos as trocas gasosas, o status hídrico e o teor de ceras epicuticulares, fenóis e pigmentos fotossintéticos. As medições foram realizadas no mês de Maio de dois anos consecutivos, com baixa (2013) e alta (2014) pluviosidade. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) dois fatores, seguida do teste de *Student Newman Keul's* a 5% de probabilidade. Os resultados mostraram que a cera contribui fortemente para a manutenção de altas taxas fotossintéticas nas folhas, que são capazes de manter seus estômatos abertos por mais tempo e com maior eficiência no uso da água mesmo no ano mais seco. Em 2013, o menor potencial hídrico e as maiores taxas de fotossíntese foram encontrados nos indivíduos do estágio inicial, mas em 2014 as maiores taxas fotossintéticas foram encontradas nos estádios intermediário e tardio. O teor de clorofila *a*, carotenoides e fenóis foi mais elevado no ano de 2014 e semelhante entre os diferentes estádios sucessionais. No ano de 2013, o teor de cera das folhas foi maior do estágio inicial ao tardio, mas no ano de 2014 não apresentou diferença entre os estádios sucessionais, sendo sempre igual ou inferior ao ano anterior. Nossos resultados indicam que as ceras epicuticulares ajudam a proteger as folhas contra a dessecação, pois promovem uma barreira física à perda de água, permitindo, assim, que elas mantenham seus estômatos abertos e consigam fixar mais CO₂. A cera epicuticular exerce um papel importante nas folhas de *A. pyrifolium*, contribuindo fortemente para a manutenção de

altas taxas de trocas gasosas com maior eficiência no uso da água, independentemente do estágio sucessionais.

Palavras-chave: regeneração natural; cutícula; Floresta Tropical Seca; fotossíntese.

ABSTRACT

The epicuticular wax has been named as an important physical adaptation to a great range of environmental factors as drought, high irradiance and herbivory. In a typically irregular rainfall environment, as the Brazilian semiarid, it can act as a determining factor of the set of species capable of establishing at the different stages of the natural regeneration process. Despite being known as an important element of the leaves defense system against environmental water loss, it has not been clarified how the epicuticular wax intervenes on the leaf metabolism. On the present work we investigated how the epicuticular wax contributes to the reduction of environmental water loss and its impact on gas exchanges on different stages of ecological succession. In order to do so we used same aged *Aspidosperma pyrifolium* (Mart.) subjects located on three areas at the different stages of the succession process: early, mid and late. In each subject we evaluated intact leaves and leaves that went through a mechanical removal of their adaxial and abaxial epicuticular waxes, using a Arabic gum solution (1,5 g. mL⁻¹). We evaluated gas exchanges, water status and the epicuticular wax, phenols and photosynthetic pigments contents. The measurements were performed on May from two consecutive years with low (2013) and high (2014) rainfall. Data was submitted to a factorial nested variance analysis (ANOVA) followed by a de Student Newman Keul's test at 5% probability. The results show that the wax strongly improves the maintenance of high photosynthetic rates on the leaves which are capable of keeping their stomata open longer and with higher water use efficiency even on the dryer year. In 2013 the lowest water potential and photosynthetic rates were found in the early stage individuals, but in 2014 the higher photosynthetic rates were found on the mid and late successional stages. The leaves chlorophyll *a*, carotenoids and phenols contents were higher on 2014 and similar between different successional stages. In 2013 the leaves wax content was higher from the early to the late stage, but in 2014 it was equal between successional stages, and lower than the previous year. Our results indicate that the epicuticular wax helps protect the leaves against desiccation by promoting a physical barrier against water loss, thereafter allowing them to keep their stomata open and fixate more CO₂. The epicuticular wax exerts an important role on *A. pyrifolium*'s leaves, strongly contributing to the conservation of high gas exchange rates and water use efficiency, regardless of the successional stage.

Keywords: natural regeneration; cuticle; Tropical Dry Forest; photosynthesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Precipitação mensal nos anos de 2013 e 2014 na Fazenda Tamanduá, Santa Teresinha-PB. A seta indica os meses em que foram realizadas as avaliações de campo. (Fonte: www.agritempo.gov.br).....57

Figura 2. Condutância estomática (g_s - A), assimilação líquida de CO_2 (A- B), eficiência no uso da água (EUA - C) e potencial hídrico foliar (Ψ_f - D) de *Aspidosperma pyrifolium* em folhas intactas (controle) e cuja cera foi removida nos anos de 2013 e 2014 em três diferentes estádios sucessionais de uma floresta tropical seca. Letras diferentes representam diferença estatística detectada a partir de uma ANOVA aninhada fatorial, seguida do teste de *Student Newman Keul's* ($p < 0,05$ e $n = 4 \pm EP$).....59

Figura 3. Conteúdo foliar de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B) e carotenoides (C) de *Aspidosperma pyrifolium* em folhas intactas (controle) e cuja cera foi removida nos anos de 2013 e 2014 em três diferentes estádios sucessionais de uma floresta tropical seca. Letras diferentes representam diferença estatística detectada a partir de uma ANOVA aninhada fatorial, seguida do teste de *Student Newman Keul's* ($p < 0,05$ e $n = 4 \pm EP$).....61

Figura 4. Conteúdo foliar de ceras epicuticulares (A) e fenóis (B) de *Aspidosperma pyrifolium* em folhas intactas (controle) e cuja cera foi removida nos anos de 2013 e 2014 em três diferentes estádios sucessionais de uma floresta tropical seca. Letras diferentes representam diferença estatística detectada a partir de uma ANOVA aninhada fatorial, seguida do teste de *Student Newman Keul's* ($p < 0,05$ e $n = 4 \pm EP$).....63

Figura 5. Detalhes da ultraestrutura da superfície abaxial de folhas intactas (controle) (A) e cuja cera foi removida (B) e da superfície adaxial de folhas intactas (controle) (C) e cuja cera foi removida (D) de folhas de *Aspidosperma pyrifolium* em uma floresta tropical seca.....65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Temperatura (°C), umidade do ar (%), déficit e pressão de vapor- DPV (KPa), radiação fotossinteticamente ativa incidente- PAR ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e umidade do solo (%) no momento das trocas gasosas nos anos de 2013 e 2014 em três diferentes estádios sucessionais de uma floresta tropical seca.....	55
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Assimilação Líquida de CO ₂
AFE	Área Foliar Específica
ANOVA	Análise de variância
CO ₂	Gás carbônico
DPV	Déficit de Pressão de Vapor
E.P.	Erro Padrão
EUA	Eficiência do uso da água
FTS	Floresta Tropical Seca
g_s	Condutância estomática
IRGA	Analisador de gases por infravermelho
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MS	Massa Seca
PAR	Radiação Fotossinteticamente Ativa
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPPN	Reserva Particular do Patrimônio Natural
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
°C	Graus centígrados
Ψ_f	Potencial Hídrico Foliar

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 FLORESTAS TROPICAIS SECAS	17
2.2 SUCESSÃO SECUNDÁRIA	18
2.3 MECANISMOS DE TOLERÂNCIA À RESTRIÇÃO SECA	19
2.4 CERAS EPICUTICULARES	20
3 CONCLUSÕES	22
REFERÊNCIAS	23
APÊNDICE- COMO A CERA EPICUTICULAR INTERFERE NAS TROCAS GASOSAS E NO METABOLISMO FOLIAR DE <i>Aspidosperma pyrifolium</i> MART. (APOCYNACEAE) AO LONGO DE UMA CRONOSSEQUÊNCIA DE CAATINGA?	28
Resumo	29
Introdução	30
Material e métodos	32
<i>Área de estudo e material vegetal</i>	32
<i>Remoção da cera epicuticular</i>	35
<i>Umidade do solo</i>	35
<i>Trocas gasosas e status hídrico</i>	35
<i>Pigmentos fotossintéticos</i>	36
<i>Teor de ceras epicuticulares e fenóis</i>	36
<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	37
<i>Análises estatísticas</i>	37

Resultados	38
Discussão	41
Agradecimentos	46
Referências	48
Tabela	55
Figuras	56
ANEXO- REGRAS DO PERIÓDICO OECOLOGIA.....	67

1 APRESENTAÇÃO

Ao estudar os mecanismos que determinam a substituição de espécies em ambientes de sucessão ecológica, é essencial conhecer as características ecofisiológicas das espécies (NAVAS et al., 2010). Em ambientes em sucessão secundária, seus diferentes estádios podem apresentar condições abióticas muito contrastantes, como temperatura, ventos, umidade do ar e do solo, déficit de pressão de vapor (DPV), intensidade luminosa e nutrientes minerais disponíveis no solo (ZHU et al., 2013). Assim, as espécies vegetais que se estabelecem em cada um desses estádios tendem a apresentar um conjunto diferente de atributos ecofisiológicos (GRISCOM et al., 2009).

Em áreas de sucessão inicial, as espécies predominantes são as que possuem características de pioneiras, tolerantes ao déficit hídrico e à alta incidência luminosa. Essas espécies, em geral, têm altas taxas fotossintéticas e área foliar específica, valores elevados de condutividade hidráulica e uma cutícula espessa recobrimdo as superfícies fotossintetizantes (ZHU et al., 2013). Essas espécies são, assim, chamadas de espécies de crescimento rápido, que investem primordialmente no crescimento, em detrimento da sobrevivência. Esse grupo de espécies acaba por criar condições ambientais mais amenas, como o aumento da cobertura vegetal e de nutrientes no solo, possibilitando o estabelecimento de espécies de plantas de estádios de sucessão tardia, tolerantes à sombra e de ciclo de vida longo, com taxas fotossintéticas, área foliar específica e condutividade hidráulica mais baixas (QUESADA et al., 2009, MCCULLOH et al., 2011). Essas plantas, entretanto, tendem a apresentar uma maior eficiência do uso da água e na fixação de carbono, conseguindo atingir um porte maior. São chamadas de espécies tardias, que investem prioritariamente na sobrevivência e reprodução, em detrimento do crescimento (PINEDA-GARCÍA; PAZ; MEIZER, 2013).

Em ambientes muito secos, como a Caatinga, as condições ambientais são ainda mais severas e constituem um desafio adicional ao crescimento e sobrevivência das plantas (SANTOS et al., 2011). Nela, são frequentemente encontradas espécies com atributos específicos para sobreviver em climas semiáridos, como a presença de uma cutícula espessa recobrimdo a epiderme das folhas. Ela atua juntamente com o controle estomático, reduzindo a perda de água da planta (FIGUEIREDO et al., 2012). A cutícula é composta de três camadas, formadas por: ceras, microfibrilas de polissacarídeos e cutina. A maior resistência à difusão de água da planta, contudo, é a fina camada hidrofóbica de ceras epicuticulares, composta por

uma mistura de diversos compostos secundários de cadeia longa, como flavonoides e triterpenos (FIGUEIREDO et al., 2012, MOHAMMADIAN; WATLING; HILL, 2007).

No atual contexto de uso e degradação de áreas naturais, fica cada vez mais clara a tendência ao desaparecimento de florestas primárias maduras (TABARELLI et al., 2012). Elas estão sendo substituídas por uma paisagem complexa, que engloba pequenos fragmentos de floresta em processo de sucessão secundária imersos em uma matriz de culturas agrícolas (LEAL et al., 2005, TABARELLI et al., 2012). Por isso, é cada vez mais importante compreender como funcionam os processos de sucessão ecológica e quais atributos das espécies nativas mudam entre os diferentes estádios sucessionais. Assim, é possível promover a criação de estratégias de conservação mais adequadas a cada tipo de ambiente, principalmente no caso das florestas tropicais secas, que permanecem sob constante pressão antrópica (GARIGLIO et al., 2010).

Na literatura, poucos trabalhos investigaram experimentalmente (com a presença de um grupo controle e um no qual a cera epicuticular estivesse ausente) a função da cera epicuticular para a sobrevivência da planta e como ela contribui para a manutenção dos seus processos fisiológicos (FIGUEIREDO et al., 2012, MOHAMMADIAN; WATLING; HILL et al., 2007). Este será o primeiro trabalho que procura, efetivamente, avaliar de forma experimental a função da cera epicuticular em um ambiente natural. Assim, o presente trabalho tem como objetivo investigar o papel da cera epicuticular nas trocas gasosas e na atividade fotossintética de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (Apocynaceae), uma planta endêmica de ambientes semiáridos em diferentes estádios sucessionais de uma Floresta Tropical Sazonalmente Seca.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FLORESTAS TROPICAIS SECAS

Aproximadamente 42% das florestas do mundo são Florestas Tropicais Secas (FTS), mas, apesar disso, são consideradas um dos ecossistemas tropicais mais ameaçados devido à alta taxa de ocupação por áreas cultivadas e expansão de áreas urbanas (QUESADA et al., 2009, GRISCOM & ASHTON, 2011). Apesar de serem menos diversas que florestas tropicais úmidas, são consideradas prioridade alta para conservação, pois têm se tornado cada vez mais raras e fragmentadas, sendo o terceiro ecossistema com maior perda de cobertura vegetal do mundo (HANSEN; STEHMAN; POTAPOV, 2010), e por conterem uma grande quantidade de espécies endêmicas e de valor econômico (SANCHEZ-AZOFEIFA et al., 2005).

A Caatinga brasileira é considerada um exemplo de FTS e é formada por um mosaico de florestas sazonalmente secas inseridas num contexto de baixa pluviosidade anual (cerca de 750 mm) concentrada em poucos meses do ano (SANTOS et al., 2011). Ela é caracterizada por uma vegetação de porte arbustivo-arbóreo e espinhosa, cujas folhas e flores são produzidas em um curto período do ano, após o qual a vegetação permanece dormente (LEAL et al., 2005). A Caatinga ocupa cerca de 800.000 km² e representa cerca de 10% da biomassa brasileira (SANTOS et al., 2011).

Entretanto, apesar da sua alta biodiversidade e riqueza de espécies endêmicas, a Caatinga está entre os ecossistemas mais ameaçados e menos conhecidos do ponto de vista científico no Brasil (MMA, 2005). Em adição ao reduzido conhecimento científico, se tem o pequeno número de unidades de conservação (LEAL; TABARELLI; SILVA, 2003) e a crescente e constante perturbação antrópica (GARIGLIO et al., 2010), que resultam na presença de diversas espécies na lista das espécies ameaçadas de extinção do IBAMA (PRADO, 2003) e nos altos níveis de fragmentação e formação de florestas secundárias (TABARELLI et al., 2010).

2.2 SUCESSÃO SECUNDÁRIA

A sucessão secundária é definida como o processo de regeneração natural de uma comunidade após um evento de perturbação que deixou vestígios da comunidade original, como é o caso de áreas de pastagem ou de cultivo abandonadas (GUARIGUATA & OSTERTAG, 2001, LEBRIJA-TREJOS et al., 2011). Nessas áreas, propágulos da floresta primária podem ainda estar presentes no solo, possibilitando uma regeneração gradual da floresta, que pode levar centenas de anos para se concluir (TABARELLI et al., 2012). O ritmo e o sentido que a sucessão secundária segue ao longo do tempo são fortemente dependentes do histórico de uso das áreas abandonadas, da matriz na qual a área está inserida e da composição da floresta primária original (GUARIGUATA & OSTERTAG, 2001, TABARELLI et al., 2012).

Nesse contexto, são formados diferentes estádios de sucessão ao longo do tempo, que apresentam características abióticas (como incidência luminosa, fertilidade do solo e disponibilidade de água) muito diferentes entre si (LEBRIJA-TREJOS et al., 2010). Esse conjunto de características ambientais é alterado de um estágio para outro devido a mudanças promovidas pelas espécies que se estabelecem e que, em geral, são parcialmente substituídas por outras ao longo do gradiente sucessional (LEBRIJA-TREJOS et al., 2010, QUESADA et al., 2009), constituindo um mecanismo de *feedback* muito forte entre o ambiente e a vegetação que o compõe (LEBRIJA-TREJOS et al., 2011).

A diferença no conjunto de condições ambientais entre os diferentes estádios de sucessão leva a alterações no metabolismo das plantas e no conjunto de atributos (como nutrientes das folhas, área foliar específica, AFE, arquitetura foliar, teor e composição das ceras epicuticulares e condutividade hidráulica) selecionados (PINEDA-GARCÍA; PAZ; MEIZER, 2013). Em áreas em sucessão inicial, que apresentam maior DPV, menor umidade do solo, maior incidência luminosa ao nível do solo e menor disponibilidade de nutrientes (SANCHEZ-AZOFEIFA et al., 2009, PINEDA-GARCÍA; PAZ; MEIZER, 2013), as espécies que conseguem se estabelecer possuem características de pioneiras (ZHU et al., 2013). Em relação às plantas de sucessão tardia, são mais tolerantes à alta incidência luminosa, têm alta AFE, maior capacidade fotossintética e de crescimento, menor ponto de perda de turgor e maior condutividade hidráulica, mas são mais vulneráveis a danos à integridade do xilema (ZHU et al., 2013, PINEDA-GARCÍA; PAZ; MEIZER, 2013).

Essa heterogeneidade é um componente importante da variabilidade ambiental e, em Florestas Tropicais Secas (FTS), tem o adicional da sazonalidade (LEBRIJA-TREJOS et al., 2011), que entre outros fatores, interfere fortemente no estabelecimento e desenvolvimento das espécies vegetais (HENNENBERG et al., 2008). Apesar da grande área ocupada por FTS, o conhecimento a respeito de como ocorre o seu processo de sucessão secundária e como as espécies mudam para conseguir se estabelecerem ao longo do gradiente sucessional, ainda é reduzido (QUESADA et al., 2009, PINEDA-GARCÍA; PAZ; MEIZER, 2013) e majoritariamente baseado em dados provenientes de trabalhos com florestas tropicais úmidas (VIEIRA & SCARIOT, 2006).

2.3 MECANISMOS DE TOLERÂNCIA À RESTRIÇÃO HÍDRICA

No cenário atual de constante e rápida degradação de sistemas naturais devido à interferência antrópica e às mudanças climáticas, estudos ecológicos que têm como objetivo estudar de forma mais ampla o funcionamento de espécies de ecossistemas secos têm se tornado cada vez mais importantes (SHIPLEY; VILE; GARNIER, 2006, ROSADO; DIAS; MATTOS, 2013). Nesse contexto, cuidado na seleção dos atributos a serem avaliados é essencial para a adequação do estudo à comunidade ou ecossistema na qual se insere e ao processo ecológico que se quer investigar (BUCCI et al., 2004, ACKERLY et al., 2000).

No caso de estudos em Florestas Tropicais Secas (FTS), como a Caatinga brasileira, os maiores *drivers* de mudanças ambientais são a restrição hídrica e a pressão antrópica (SANTOS et al., 2011). Sendo assim, os atributos mais relevantes e esclarecedores do funcionamento e estruturação de comunidades de Caatinga estão relacionados à tolerância à restrição hídrica, como a capacidade das plantas de absorver e transportar água, sua eficiência no uso de água e nutrientes, alocação de recursos e segurança/vulnerabilidade do xilema (BLACKMAN; BRODRIBB; JORDAN, 2010, SACK & SCOFFONI, 2013). As espécies que conseguem se estabelecer com sucesso nesse tipo de ecossistema possuem atributos ecofisiológicos relacionados com a tolerância ou a fuga à dessecação (BRENES-ARGUEDAS; RODDY; KURSAR, 2013). A tolerância à dessecação pode ser explicada por atributos como alta densidade da madeira, resistência ao embolismo e baixo potencial hídrico de perda de turgor (KURSAR et al., 2009, CHOAT et al., 2012). Já a fuga a dessecação pode

ser explicada pela presença de raízes profundas e estocagem de carboidratos (MARKESTEIJN et al., 2011).

Em resposta à restrição hídrica, também podem ocorrer mudanças no metabolismo primário e secundário da folha, que pode alterar tanto quantitativamente quanto qualitativamente os compostos armazenados (ALAM et al., 2010, HERNÁNDEZ et al., 2009). No metabolismo primário, em geral, ocorrem reduções nas proteínas solúveis totais (ARCOVERDE et al., 2011) e carboidratos solúveis totais armazenados (RIVAS; OLIVEIRA; SANTOS, 2013), acompanhados de um aumento nos aminoácidos livres totais (ARCOVERDE et al., 2011), a fim de contribuir para a manutenção do turgor celular. Em resposta ao aumento da incidência luminosa pode ocorrer um aumento no conteúdo de clorofilas totais e carotenoides (RIVAS; OLIVEIRA; SANTOS, 2013) que em níveis muito altos de radiação podem ser degradados.

No metabolismo secundário, há uma tendência ao aumento da produção de fenóis nas folhas, que auxiliam na proteção contra o estresse oxidativo, causado pelos altos níveis de radiação e estresse hídrico (HERNÁNDEZ et al., 2009). Em indivíduos que estão submetidos a níveis de estresse muito altos, entretanto, o acúmulo de fenóis nas folhas pode ser inibido (KARABOURNIOTIS et al., 2014), pois plantas sob condições de restrição hídrica tendem a ter taxas fotossintéticas inferiores, investindo carbono fixado no crescimento em detrimento da proteção contra a herbivoria: o conhecido dilema “fixação de carbono x economia de água”.

2.4 CERAS EPICUTICULARES

Em plantas características de ambientes semiáridos podem ser encontradas adaptações específicas que permitem o seu estabelecimento e sobrevivência, como a presença de uma camada cuticular bastante espessa (FIGUEIREDO et al., 2012, OLIVEIRA; MEIRELLES; SALATINO, 2003). Essa cutícula atua como um mecanismo não-estomático de proteção contra a perda de água na planta e a alta incidência de radiação e regula sua interação com o ambiente como um todo (BERNARDT & JOUBÈS, 2013). A atuação da cutícula na proteção contra a dessecação é frequentemente associada à sua composição e conteúdo de ceras epicuticulares (FIGUEIREDO et al., 2012), mas já se sabe que a presença da cutícula sozinha pode auxiliar na redução da perda de água, já que aumenta a espessura da camada de ar em

torno dos estômatos e limita a superfície de trocas gasosas ao poro estomático (MOHAMMADIAN; WATLING; HILL, 2007).

Essa camada de ceras epicuticulares que se depositam na superfície das folhas pode ser secretada por células da epiderme, células-guarda ou células subsidiárias em forma líquida através de micro poros presentes na cutícula, que em contato com o ar se solidificam nas mais variadas formas (REICOSKY & HANOVER, 1978). A forma e a quantidade de cera depositada pode variar de acordo com a idade da folha e a temperatura. Comumente, a maior parte da produção de ceras ocorre durante o verão e a primavera, enquanto que no inverno os cristais são degradados (MOHAMMADIAN; WATLING; HILL, 2007). Essa resposta indica que a presença de ceras epicuticulares está fortemente relacionada à fotoproteção e à redução da perda de água para o ambiente (SAMDUR et al., 2003).

Já existe uma literatura extensa que confirma que quando submetidas a estresse hídrico grande parte das espécies vegetais tendem a aumentar o teor de ceras epicuticulares depositadas (SANCHEZ et al., 2001, CAMERON; TEECE; SMART, 2006). Esse maior teor de ceras epicuticulares é negativamente correlacionado à transpiração cuticular, ou seja, quanto mais espessa a camada de ceras, menos água a folha perde por unidade de área (CAMERON; TEECE; SMART, 2006, NI et al., 2012). Além de contribuir para o aumento da eficiência no uso da água as ceras são responsáveis por aproximadamente 25% da reflectância da superfície foliar (MOHAMMADIAN; WATLING; HILL, 2007), promovem uma redução da temperatura interna do mesofilo (REICOSKY & HANOVER, 1978), inibem o acúmulo de partículas patogênicas e água na superfície da folha, devido a sua natureza hidrofóbica (NEINHUIS & BARTHLOTT, 1997) e constituem uma barreira à herbivoria, devido a sua composição rica em compostos não palatáveis ou tóxicos (BUSCHHAUS; HERZ; JETTER, 2007).

3 CONCLUSÕES

- A cera epicuticular exerce um papel importante nas folhas de *A. pyrifolium*, contribuindo fortemente para a manutenção de altas taxas de trocas gasosas com maior eficiência no uso da água;
- A remoção da cera epicuticular não causou dano imediato ao metabolismo interno da folha;
- A cera epicuticular é igualmente importante para a manutenção das trocas gasosas em *A. pyrifolium* nos diferentes estádios da regeneração natural;
- *A. pyrifolium* apresenta alta resiliência a condições de seca, recuperando suas taxas de trocas gasosas após um curto período chuvoso.

REFERÊNCIAS

ACKERLY, D. et al. The evolution of plant ecophysiological traits: recent advances and future directions. **BioScience**, v. 50, p. 979-995, 2000.

ALAM, I. et al. Proteome analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress. **Plant and Soil**, v. 333(1), p. 491-505, 2010.

ARCOVERDE, G.B. et al. Water relations and some aspects of leaf metabolism of *Jatropha curcas* young plants under two water deficit levels and recovery. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.23(2), p. 123-130, 2011.

BERNARD, A.; JOUBÈS, J. *Arabidopsis* cuticular waxes: Advances in synthesis, export and regulation. **Progress in Lipid Research**, v. 52, p. 110–129, 2013.

BLACKMAN, C.J.; BRODRIBB, T.J.; JORDAN, G.J. Leaf hydraulic vulnerability is related to conduit dimensions and drought resistance across a diverse range of woody angiosperms. **New Phytologist**, v. 188, p. 1113-1123, 2010.

BRENES-ARGUEDAS, T.; RODDY, A.B.; KURSAR, T.A. Plant traits in relation to the performance and distribution of woody species in wet and dry tropical forest types in Panama. **Functional Ecology**, v. 27, p. 392–402, 2013.

BUCCI, S.J. et al. Functional convergence in hydraulic architecture and water relations of tropical savanna trees: from leaf to whole plant. **Tree Physiology**, v. 24, p. 891-899, 2004.

BUSCHHAUS, C.; HERZ, H.; JETTER, R. Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on adaxial sides of *Rosa canina* leaves. **Annals of Botany**, v. 100, p. 1557–1564, 2007.

CAMERON, K.D.; TEECE, M.A.; SMART, L.B. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. **Plant Physiology**, v. 140, p. 176-183, 2006.

CHOAT, B. et al. Global convergence in the vulnerability of forests to drought. **Nature**, v. 491, p. 752–755, 2012.

FIGUEIREDO, K.V. et al. Epicuticular-wax removal influences gas exchange and water relations in the leaves of an exotic and native species from a Brazilian semiarid region under induced drought stress. **Australian Journal of Botany**, v. 60, p. 685–692, 2012.

GARIGLIO, M.A. et al. **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da Caatinga**. Ministério do Meio Ambiente, Serviço Florestal Brasileiro, Brasília, 2010.

GRISCOM, H.P.; ASHTON, M.S. Restoration of dry tropical forests in Central America: A review of pattern and process. **Forest Ecology and Management**, v.261, p.1564–1579, 2011.

GRISCOM, H.P.; GRISCOM, B.W.; ASHTON, P.M.S. Forest regeneration from pasture in the dry tropics of Panama: effects of cattle, exotic grass, and forested riparia. **Restoration Ecology**, v. 17, p. 117–126, 2009.

GUARIGUATA, M.R.; OSTERTAG, R. Neotropical secondary succession: changes in structural and functional characteristics. **Forest Ecology and Management**, v. 148, p. 185–206, 2001.

HANSEN, M.C.; STEHMAN, S.V.; POTAPOV, P.V. Quantification of global gross forest cover loss. **PNAS**, v. 107(19), p. 8650–8655, 2010.

HENNENBERG, K.J. et al. Detection of seasonal variability in microclimatic borders and ecotones between forest and savanna. **Basic and Applied Ecology**, v. 9, p. 275–285, 2008.

HERNÁNDEZ, I. et al. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? **Trends in Plant Science**, v. 14(3), p. 125–132, 2009.

KARABOURNIOTIS, G. et al. “Carbon gain vs. water saving, growth vs. defence”: Two dilemmas with soluble phenolics as a joker. **Plant Science**, v. 227, p. 21–27, 2014.

KURSAR, T.A. et al. Tolerance to low leaf water status of tropical tree seedlings is related to drought performance and distribution. **Functional Ecology**, v. 23, p. 93–102, 2009.

LEAL, I.R et al. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1(1), p. 140-146, 2005.

LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2003.

LEBRIJA-TREJOS, E. et al. Pathways, mechanisms and predictability of vegetation change during tropical dry forest succession. **Perspectives in Plant Ecology**, v. 12, p. 267–275, 2010.

LEBRIJA-TREJOS, E. et al. Environmental changes during secondary succession in a tropical dry forest in Mexico. **Journal of Tropical Forests**, v. 27, p. 477–489, 2011.

MARKESTEIJN, L. et al. Hydraulics and life history of tropical dry forest tree species: coordination of species' drought and shade tolerance. **New Phytologist**, v. 191, p. 480–495, 2011.

MCCULLOH, K.A. et al. Comparative hydraulic architecture of tropical tree species representing a range of successional stages and wood density. **Oecologia**, v. 167, p. 27–37, 2011.

MMA. **Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, Brasil, 2005.

MOHAMMADIAN, M.; WATLING, J.R.; HILL, R.S. The impact of epicuticular wax on gas-exchange and photoinhibition in *Leucadendron lanigerum* (Proteaceae). **Acta Oecologica**, v. 31, p. 93-101, 2007.

NAVAS, M.L. et al. Suites of plant traits in species from different stages of a Mediterranean secondary succession. **Plant Biology**, v. 12, p. 183–196, 2010.

NEINHUIS, C., BARTHLOTT, W. Characterization and distribution of water-repellent, self-cleaning plant surfaces. **Annals of Botany**, v. 79, p. 667–677, 1997.

NI, Y. et al. Leaf cuticular waxes and physiological parameters in alfalfa leaves as influenced by drought. **Photosynthetica**, v. 50(3), p. 458-466, 2012.

OLIVEIRA, A.F.M.; MEIRELLES, S.T.; SALATINO, A. Epicuticular waxes from Caatinga and Cerrado species and their efficiency against water loss. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, p. 431–439, 2003.

PINEDA-GARCÍA, F.; PAZ, H.; MEINZER, F.C. Drought resistance in early and late secondary successional species from a tropical dry forest: the interplay between xylem resistance to embolism, sapwood water storage and leaf shedding. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, p. 405–418, 2013.

PRADO, D. **As caatingas da América do Sul**. In: LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. Ecologia e conservação da Caatinga. Recife, Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

QUESADA, M. et al. Succession and management of tropical dry forests in the Americas: review and new perspectives. **Forest Ecology and Management**, v. 258, p. 1014–1024, 2009.

REICOSKY, D.A.; HANOVER, J.W. Physiological effects of surface waxes. **Plant Physiology**, v. 62, p. 101–104, 1978.

RIVAS, R.; OLIVEIRA, M.T.; SANTOS, M.G. Three cycles of water deficit from seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 63, p. 200–208, 2013.

ROSADO, B.H.P.; DIAS, A.T.C.; MATTOS, E.A. Going back to basics: Importance of Ecophysiology when choosing functional traits for studying communities and ecosystems. **Natureza e Conservação**, v. 11(1), p. 15-22, 2013.

SACK, L.; SCOFFONI, C. Leaf venation: structure, function, development, evolution, ecology and applications in the past, present and future. **New Phytologist**, v. 198(4), p. 983-1000, 2013.

SAMDUR, M.Y. et al. Genotypic differences and waterdeficit induced enhancement in epicuticular wax load in peanut. **Crop Science**, v. 43,p. 1294–1299, 2003.

SANCHEZ-AZOFEIFA, G.A. et al. Need for integrated research for a sustainable future in tropical dry forests. **Conservation Biology**, v. 19, p. 285–286, 2005.

SANCHEZ, F.J. et al. Residual transpiration rate, epicuticular wax load and leaf color of pea plants in drought conditions. Influence on harvest index and canopy temperature. **European Journal of Agronomy**, v. 15, p. 57–70, 2001.

SANTOS, J.C. et al. Caatinga: the scientific negligence experienced by a dry tropical forest. **Tropical Conservation Science**, v. 4(3), p. 276-286, 2011.

SHIPLEY, B.; VILE, D.; GARNIER, E. From plant traits to plant communities: A statistical mechanistic approach to biodiversity. **Science**, v. 314 p. 812-814, 2006.

TABARELLI, M. et al. Effects of pioneer tree species hyperabundance on forest fragments in northeastern Brazil. **Conservation Biology**, v. 24(6), p. 1654–1663, 2010.

TABARELLI, M. et al. Secondary forests as biodiversity repositories in human-modified landscapes: insights from the Neotropics. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, v. 7(3), p. 319-328, 2012.

VIEIRA, L.M.D.; SCARIOT, A. Principles of natural regeneration of tropical dry forests for restoration. **Restoration Ecology**, v. 14, p. 11–20, 2006.

ZHU, S. et al. Plant hydraulics and photosynthesis of 34 woody species from different successional stages of subtropical forests. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, p. 879–891, 2013.

APÊNDICE- COMO A CERA EPICUTICULAR INTERFERE NAS TROCAS GASOSAS E NO METABOLISMO FOLIAR DE *Aspidosperma pyrifolium* MART. (APOCYNACEAE) AO LONGO DE UMA CRONOSSEQUÊNCIA DE CAATINGA?

1

2 CAMILA D. MEDEIROS^{1,2*}; HIRAM M. FALCÃO^{1,2}; KARLA V. FIGUEIREDO^{1,2};
3 DÉBORA Y. A. C. SANTOS⁴, JARCILENE ALMEIDA-CORTEZ^{2,3}; MAURO G.
4 SANTOS^{1,2}

5

6 ⁽¹⁾ Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade
7 Federal de Pernambuco, Recife-PE 50670-901, Brasil.

8 ⁽²⁾ Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica,
9 Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE 50670-901, Brasil.

10 ⁽³⁾ Laboratório de Interações Multitróficas, Departamento de Botânica, Universidade
11 Federal de Pernambuco, Recife-PE 50670-901, Brasil.

12 ⁽⁴⁾ Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo,
13 São Paulo-SP 05508-090, Brasil.

14

15

16 *Email do autor correspondente: camila.dbmedeiros@gmail.com

17 * Autor correspondente. Telefone: +55 81 21268844;

18 Fax: +55 81 21267803

19

20

21 **Manuscrito a ser submetido para o periódico Oecologia.**

22

23 **Resumo**

24 A cera epicuticular pode atuar como um fator determinante do conjunto de espécies
25 capazes de se estabelecer ao longo do processo de regeneração natural. Nesse trabalho,
26 investigamos como a cera epicuticular foliar de *Aspidosperma pyrifolium* contribui para
27 a redução da dessecação e o seu impacto nas trocas gasosas em diferentes estádios da
28 sucessão ecológica. Foram selecionadas três áreas em diferentes estádios do processo de
29 sucessão: inicial, intermediário e tardio em Santa Teresinha-PB, Brasil. Foram avaliadas
30 folhas intactas e folhas que sofreram remoção mecânica da cera epicuticular. As
31 medições foram realizadas no mês de Maio de dois anos consecutivos, com baixa
32 (2013) e alta (2014) pluviosidade. Os resultados mostraram que a cera contribui
33 fortemente para a manutenção de altas taxas fotossintéticas nas folhas, que são capazes
34 de manter seus estômatos abertos por mais tempo e uma maior eficiência no uso da
35 água, mesmo no ano mais seco. Não observamos um padrão claro de alteração no teor
36 de clorofila *a*, *b*, carotenoides e fenóis nas folhas sem cera, que indica que apesar de
37 causar redução nas trocas gasosas, a remoção da cera não causou danos ao metabolismo
38 foliar. No ano de 2013, o teor de cera foi maior do estágio inicial ao tardio, mas no ano
39 de 2014 não apresentou diferença entre estádios. As folhas que tiveram a cera removida
40 apresentaram sempre menores taxas de *A_g* e EUA nos três estádios de regeneração
41 natural, mesmo no ano mais chuvoso, o que nos permite concluir que a cera epicuticular
42 é igualmente importante para a manutenção das trocas gasosas e do metabolismo foliar
43 em *A. pyrifolium* nos diferentes estádios da regeneração natural.

44 *Palavras-chave:* regeneração natural; cutícula; floresta tropical seca; fotossíntese.

45 **Introdução**

46 A baixa disponibilidade hídrica é o principal fator ambiental que limita o
47 crescimento e produtividade vegetal no mundo, pois reduz o balanço de carbono da
48 planta, que é diretamente dependente da fotossíntese (Flexas et al. 2009). Isso ocorre
49 porque quando há pouca água disponível para a planta no solo, ela tende a fechar seus
50 estômatos para evitar a perda de água para a atmosfera, limitando fortemente, em
51 contrapartida, a fotossíntese (Souza et al. 2010, Figueiredo et al. 2012). Essa limitação
52 na disponibilidade de água acaba atuando como um filtro ambiental importante, que
53 pode levar à mortalidade de árvores, declínio de florestas e alterações rápidas das
54 fitofisionomias (Allen et al. 2010, Eilmann e Rigling 2012).

55 Espécies que conseguem se estabelecer em ambientes com limitação de água
56 constantemente apresentam um conjunto de atributos relacionados à tolerância hídrica,
57 como folhas com alta área foliar específica (Zhu et al. 2013), baixa condutividade
58 hidráulica e potencial hídrico de perda de turgor, alta resistência à cavitação (Bartlett et
59 al. 2012) e cutícula espessa (Bell et al. 2007). A camada cuticular, composta de três
60 camadas, formadas por ceras, microfibrilas de polissacarídeos e cutina, é depositada
61 sobre a epiderme e atua em conjunto com o controle estomático para reduzir a perda de
62 água para o ambiente. Entretanto, a maior resistência à difusão de água da planta é a
63 fina camada hidrofóbica de ceras epicuticulares, composta por uma mistura de diversos
64 compostos secundários alifáticos de cadeia longa, como alcanos (Figueiredo et al.
65 2012).

66 Essa camada hidrofóbica formada pelas ceras epicuticulares sobre a superfície
67 foliar além de evitar que a água se acumule na superfície da folha reduz a translocação

68 CO₂ (Figueiredo et al. 2012), evita a deposição de partículas que podem causar
69 infecções e reduzir as taxas fotossintéticas, aumenta a camada limítrofe, reduzindo a
70 perda de água para a atmosfera, pois limita as trocas gasosas aos estômatos e reduz a
71 incidência de radiação absorvida pelas folhas, diminuindo a temperatura interna do
72 mesófilo (Mohammadian et al. 2007). Quando submetidas a estresse hídrico, as folhas
73 podem aumentar a deposição dessas ceras epicuticulares, que em conjunto com o
74 controle estomático, reduzem a transpiração cuticular e aumentam a eficiência no uso da
75 água (EUA) (Ni et al. 2012).

76 As Florestas Tropicais Sazonalmente Secas, como o semiárido brasileiro,
77 apresentam ciclos anuais de chuvas irregulares e secas prolongadas, que promovem uma
78 dinâmica de comunidades diferente das florestas úmidas (Lebrija-Trejos et al. 2010,
79 Santos et al. 2014). Elas comportam um conjunto diferente de espécies, com menor
80 diversidade e uma arquitetura tridimensional mais simples (Lebrija-Trejos et al. 2011).
81 Devido aos altos níveis de perturbação antrópica, essas florestas estão cada vez mais
82 degradadas e grande parte de sua área se encontra em diferentes estádios do processo de
83 regeneração natural (Quesada et al. 2009, Tabarelli et al. 2012). Esse processo envolve
84 um mecanismo de *feedback* entre a vegetação e o ambiente: o ambiente afeta o
85 estabelecimento e produtividade da comunidade de plantas, que, em contrapartida,
86 modifica as características do ambiente e interfere no conjunto de espécies que
87 conseguirão se estabelecer nos estágios subsequentes do processo sucessional (Lebrija-
88 Trejos et al. 2010, Lebrija-Trejos et al. 2011).

89 O conhecimento acerca das mudanças que ocorrem nas trocas gasosas e no
90 status hídrico das plantas e como isso está relacionado à sua capacidade de sobreviver
91 ao longo do processo de sucessão ecológica já é consolidado para florestas tropicais

92 úmidas. Ao longo da sucessão em florestas tropicais sazonalmente secas as condições
93 ambientais podem mudar drasticamente (Falcão et al. 2015), mas existe muito pouca
94 informação, entretanto, a respeito de como esses processos ecofisiológicos se
95 desenvolvem em ambientes secos; uma lacuna que buscamos preencher com esse
96 trabalho (Lebrija-Trejos et al. 2011, Pineda-García et al. 2013). Na literatura poucos
97 trabalhos (Mohammadian et al. 2007, Figueiredo et al. 2012) investigaram *in vivo* a
98 função da cera epicuticular para a sobrevivência da planta e como ela contribui para a
99 manutenção dos seus processos fisiológicos. Este será o primeiro trabalho que procura,
100 efetivamente, avaliar *in vivo* e em condições de campo a função da cera epicuticular.

101 Assim, o presente trabalho tem como objetivo: investigar o papel da cera
102 epicuticular nas trocas gasosas de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (Apocynaceae), uma
103 planta endêmica de ambientes semiáridos em diferentes estádios sucessionais de uma
104 Floresta Tropical Sazonalmente Seca.

105

106 **Material e métodos**

107 *Área de estudo e material vegetal*

108 O estudo foi realizado no Município de Santa Terezinha, na Paraíba, Brasil
109 (06°59'13"–07°00'14" Sul e 37°18'08"–37°20'38" Oeste). A área estudada possui mais
110 de 900 hectares preservados, o que corresponde a cerca de um terço de sua área total,
111 que contém uma reserva legal e uma Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN)
112 de 325 hectares criada em julho de 1998. A região está inserida no “Polígono da Seca”
113 brasileiro, uma região prioritária para pesquisas científicas devido ao alto risco de

114 desertificação (MMA, 2005). A área fica localizada na Depressão Sertaneja, numa
115 altitude média de 240 metros em um escudo de embasamento cristalino, com solos rasos
116 e de fertilidade baixa. O clima é do tipo *Bsh* de acordo com a classificação de Köppen,
117 com uma estação seca pronunciada entre os meses de Junho e Fevereiro (Alvares et al.
118 2014). A média anual de precipitação é de cerca de 600 mm, concentrada entre os meses
119 de Março e Maio, e a temperatura média anual é de 32,8°C (Falcão et al. 2015).

120 Para o estudo, foram selecionadas três áreas em diferentes estádios sucessionais:
121 inicial, intermediário e tardio. Segundo Freitas et al. 2012, a área em estágio inicial de
122 sucessão foi desmatada em 1965 para o estabelecimento de uma plantação de algodão.
123 Em 1970 passou a ser dominada por *Cenchrus ciliaris* L. (Poaceae) e utilizada como
124 pasto até 1992, quando foi abandonada. A área em estágio intermediário de sucessão
125 também foi desmatada em 1965 para o estabelecimento de uma plantação de algodão,
126 mas foi abandonada em 1970. A área de sucessão tardia não teve corte ou grandes
127 perturbações relatadas desde 1950. A área inicial foi abandonada há 21 anos, a área
128 intermediária há 43 anos e a tardia há 63 anos, não havendo registro de aplicação de
129 fertilizantes ou agrotóxicos em nenhuma das áreas estudadas. Em 2007 todas as parcelas
130 foram cercadas para prevenir contra a entrada de animais de médio e grande porte. Cada
131 estágio sucessionar está representado por uma área, na qual foi estabelecida uma parcela
132 de 50 x 20 m (1000 m²) com uma área de amortecimento de 5 m em cada um dos quatro
133 lados. A área inicial de sucessão tem um total de três famílias e seis espécies com uma
134 biomassa aérea de 29,92 Mg.ha⁻¹, a intermediária, 10 famílias e 15 espécies, com uma
135 biomassa aérea de 37,56 Mg.ha⁻¹ e a tardia, 12 famílias e 21 espécies, com uma
136 biomassa aérea de 49,47 Mg.ha⁻¹ (Cabral et al. 2013). Dados detalhados sobre a

137 composição química e física dos solos e a fitofisionomia estão disponíveis em Freitas et
138 al. 2012 e Cabral et al. 2013, respectivamente.

139 A espécie utilizada como modelo neste estudo foi o pereiro, *Aspidosperma*
140 *pyrifolium* Mart. (Apocynaceae). *A. pyrifolium* é uma das espécies mais características
141 das regiões semiáridas do nordeste brasileiro, presente em grande abundância nos seus
142 nove estados. Ela foi selecionada para o trabalho devido a sua importância ecológica
143 como espécie pioneira, que ajuda a promover o andamento do processo de regeneração
144 natural (Pereira et al. 2001). Apesar de ser classificada como pioneira, *A. pyrifolium*
145 pode ser encontrado em áreas em estágio intermediário e tardio do processo sucessional.
146 Em cada parcela foram avaliados quatro indivíduos de *A. pyrifolium*, padronizados de
147 acordo com a área basal e altura, afim de evitar variações fenotípicas dependentes da
148 idade nos atributos foliares (Valladares et al. 2007). Entre as espécies arbóreas
149 dominantes de Caatinga, *A. pyrifolium* é uma das poucas que apresenta folhas simples
150 de limbo inteiro, uma característica essencial para viabilizar a remoção da cera
151 epicuticular *in vivo* em condições de campo. Seus estômatos estão localizados
152 principalmente na face abaxial da folha, enquanto os tricomas e a cutícula mais espessa
153 estão distribuídos na face adaxial.

154 As medidas de campo foram realizadas em indivíduos adultos de *A. pyrifolium*,
155 plenamente expostos à incidência de luz e em fase vegetativa, tanto em folhas intactas
156 (que a partir desse momento serão chamadas de “controle”) quanto em folhas que
157 passaram por uma remoção mecânica da cera epicuticular. As avaliações ocorreram nos
158 meses de Maio de 2013 e 2014, durante a estação chuvosa. Nos dois anos, a
159 precipitação total foi mais elevada que a média histórica. Em 2013, a precipitação total
160 foi de 834,18 mm, sendo que 398,8 destes ocorreram de Janeiro a Maio. Em 2014 a

161 precipitação total foi de 1364,4, sendo que 1238,67 ocorreram de Janeiro a Maio (Fig.
162 1). As precipitações pluviométricas mensais foram registradas em estação
163 meteorológica instalada na área de estudo. A temperatura ($^{\circ}\text{C}$), umidade do solo e do ar
164 (%), déficit de pressão de vapor (DPV- KPa) e radiação fotossinteticamente ativa (PAR)
165 foram registradas no momento das medições em campo e estão descritas na Tabela 1.

166 *Remoção da cera epicuticular*

167 A cera epicuticular foi removida mecanicamente das superfícies abaxial e
168 adaxial de cinco folhas de cada um dos quatro indivíduos de cada área, utilizando uma
169 solução de goma arábica ($1,5 \text{ g.mL}^{-1}$). Às 0500 h, foi aplicada uma fina camada de
170 goma na superfície foliar, numa razão de $0,1 \text{ mL.cm}^{-2}$, com auxílio de um pincel. Após
171 2 horas, o filme formado pela goma aderida à cera epicuticular foi cuidadosamente
172 removido (Figueiredo et al. 2012).

173 *Umidade do solo*

174 A umidade do solo foi medida nas três áreas, próximo às bases dos quatro
175 indivíduos utilizados no experimento a uma profundidade média de 30 cm, com auxílio
176 de Medidor Eletrônico de Umidade do Solo (HFM2010, HidroFarm).

177 *Trocas gasosas e status hídrico*

178 A condutância estomática (g_s) e a assimilação líquida de CO_2 (A) foram
179 mensuradas com o auxílio de um analisador portátil de gases por infravermelho, modelo
180 IRGA (ADC, modelo LCI, Hoddesdon, UK) em cinco folhas controle e cuja cera
181 epicuticular foi removida de quatro indivíduos por área, utilizando a radiação
182 fotossinteticamente ativa ambiente. A eficiência intrínseca do uso da água (EUA_i) foi

183 obtida pela relação entre assimilação líquida de CO₂ e condutância estomática (A/g_s). As
184 medidas foram realizadas duas horas e 30 minutos após a remoção da cera epicuticular,
185 às 0930 h em dias ensolarados e sem nuvens, nas folhas controle e nas que tiveram a
186 cera epicuticular removida. As variáveis ambientais no momento das medições foram
187 registradas e estão descritas na Tabela 1.

188 Para acessar o status hídrico das plantas foram realizadas medições em campo
189 do potencial hídrico foliar (Ψ_f) em quatro folhas de quatro indivíduos por área,
190 utilizando uma câmara de pressão de Schölander (Soil Moisture Equipment Corp., Santa
191 Barbara, CA, USA) (Schölander et al. 1965). As avaliações foram realizadas no período
192 da antemanhã, às 0500 h, em folhas intactas e totalmente expandidas.

193 *Pigmentos fotossintéticos*

194 Amostras de material foliar de quatro plantas (controle e cuja cera foi removida)
195 de cada área foram coletadas às 1500 h (horário de maior acúmulo de carboidratos),
196 congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer à temperatura de -20°C.
197 Foram realizadas quantificações das clorofilas *a* e *b* e carotenoides de acordo com a
198 metodologia descrita em Lichtenthaler (1982) e os resultados estão expressos em $g.kg^{-1}$
199 de massa seca.

200 *Teor de ceras epicuticulares e fenóis*

201 A cera epicuticular foi extraída e analisada segundo Oliveira e colaboradores
202 (2003). Sete folhas intactas de três indivíduos de cada área foram submetidas a três
203 extrações sucessivas com diclorometano durante 30 segundos sob agitação constante.
204 Os extratos obtidos foram filtrados, concentrados sob pressão reduzida e mantidos em

205 dessecador até atingir peso constante. O teor médio de cera epicuticular foi calculado
206 pela razão entre a quantidade de cera obtida (μg) e a área das folhas (cm^2) e expresso
207 em $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Para a quantificação de compostos fenólicos foliares foram utilizados 20
208 mg de folhas secas e pulverizadas de três indivíduos (controle e sem cera) das três áreas.
209 A análise foi executada de acordo com a metodologia de Folin-Ciocalteu, descrita em
210 Velioglu e colaboradores (1998) e os resultados estão expressos em $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de massa
211 seca.

212 *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

213 Para verificar a eficiência da metodologia de remoção mecânica da cera
214 epicuticular, às 1500 h foram coletados fragmentos de aproximadamente 1 cm^2 de
215 tecido de folhas controle e cuja cera foi removida de duas folhas por indivíduo de três
216 indivíduos de cada estágio sucessional. Os fragmentos foram montados em *stubs* com
217 auxílio de uma fita aderente de carbono e os *stubs* foram banhados em uma fina camada
218 de ouro. Os fragmentos foram observados em aumentos de 50 a 3000x em um
219 microscópio eletrônico de varredura (Mohammadian et al. 2007).

220 *Análises estatísticas*

221 Afim de testar a hipótese de que a cera epicuticular interfere positivamente na
222 atividade fotossintética de *A. pyrifolium*, apresentando maior influência sobre ela nas
223 áreas mais expostas à incidência luminosa e de maior DPV, foi utilizada uma análise de
224 variância (ANOVA fatorial) aninhada seguida do teste de *Student Newman Keul's* a 5%
225 de probabilidade sempre que detectada alguma diferença. As áreas, anos e a presença/
226 ausência da cera epicuticular foram utilizadas como variáveis independentes. Todas as

227 análises estatísticas foram executadas com o software STATISTICA 8.0 (Statsoft Inc.,
228 Tulsa, USA).

229 **Resultados**

230 A remoção da cera epicuticular causou alterações nas trocas gasosas dos
231 indivíduos estudados nos três estádios sucessionais nos dois anos do estudo (Fig. 2). A
232 g_s mais elevada foi encontrada nas folhas controle dos estádios intermediário e tardio no
233 ano de 2014 (Fig. 2a). Nos estádios inicial e tardio, a g_s foi mais elevada nas folhas
234 controle que nas folhas sem cera durante os dois anos do estudo, mas no estádio
235 intermediário só foi mais elevada em 2014. A magnitude da diferença entre a g_s das
236 folhas controle e sem cera, entretanto, foi menor que a da A. As folhas controle
237 apresentaram taxas de g_s 2 e 2,5 vezes mais elevadas que as folhas sem cera nos
238 estádios inicial e tardio em 2013 e 2, 4 e 2 vezes mais elevadas que as folhas sem cera
239 nos estádios inicial, intermediário e tardio em 2014, respectivamente ($P < 0,001$;
240 $F_{6;1} = 35,110$).

241 No ano de 2013, com menor pluviosidade e umidade do solo (Tabela 1), A foi
242 menor nos três estádios sucessionais. As folhas controle tiveram taxas de A cerca de
243 cinco, três e sete vezes mais elevadas que as folhas que tiveram a cera removida nos
244 estádios inicial, intermediário e tardio, respectivamente ($P < 0,001$; $F_{6;1} = 99,662$). No ano
245 de 2014, tanto as folhas controle como as folhas que tiveram sua cera removida
246 apresentaram uma elevação da A nos estádios intermediário e tardio. No estádio inicial,
247 entretanto, o aumento na água disponível no solo não causou elevação da A (Fig. 2b).
248 Nesse ano, as folhas controle apresentaram taxas de A 10, quatro e três vezes mais
249 elevadas que as folhas sem cera nos estádios inicial, intermediário e tardio,

250 respectivamente ($P < 0,001$; $F_{6;1} = 99,662$). No ano de 2013, a maior taxa de A foi
251 encontrada no grupo controle do estágio inicial, enquanto em 2014 as maiores taxas de
252 assimilação líquida de CO_2 foram encontradas nos controles dos estágios intermediário
253 e tardio ($P < 0,001$; $F_{6;1} = 99,662$).

254 Em relação a 2014, no ano de 2013 (Fig. 2c) foi observada uma redução
255 marcante da EUA_i nos três estágios sucessionais ($P < 0,001$; $F_{6;1} = 40,562$). No estágio
256 intermediário, entretanto, as folhas controle apresentaram a maior EUA_i encontrada ao
257 longo do estudo, de $1183,5 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. Em 2014 (Fig. 2c), apenas no estágio inicial foi
258 observada diferença na EUA , que foi 80% mais elevada nas folhas controle em relação
259 às folhas cuja cera foi removida ($P < 0,001$; $F_{6;1} = 36,659$).

260 No ano de 2013, o potencial hídrico das folhas (Ψ_f) foi mais elevado nos estágios
261 intermediário e tardio (Fig. 2d), mas no ano de 2014, o Ψ_f diminuiu três vezes
262 ($P < 0,001$; $F_{6;1} = 142,029$). No estágio inicial de sucessão, entretanto, o Ψ_f em 2014 foi
263 mais elevado que em 2013. Nos dois anos os indivíduos da área inicial de sucessão
264 mantiveram os Ψ_f mais baixos e os indivíduos da área tardia de sucessão mantiveram os
265 Ψ_f mais elevados ($P < 0,001$; $F_{6;1} = 142,029$).

266 Não foi detectada diferença no conteúdo de clorofila a entre as folhas controle e
267 as que tiveram a cera epicuticular removida nos dois anos de estudo (Fig. 3a). No ano de
268 2014, entretanto, o teor de clorofila a foi mais elevado que em 2013 nos indivíduos dos
269 três estágios sucessionais ($P < 0,001$; $F_{6;1} = 19,322$) e os indivíduos do estágio
270 intermediário foram os que apresentaram o maior teor desse pigmento. O teor de
271 clorofila b (Fig. 3b) não sofreu alteração ($P < 0,05$; $F_{6;1} = 3,140$) entre anos ou tratamentos
272 nos indivíduos dos estágios inicial e intermediário de sucessão. No estágio tardio, no

273 ano de 2013, o teor de clorofila *b* foi cerca de 50% menor nas folhas cuja cera
274 epicuticular foi removida ($P<0,05$; $F_{6;1}=3,140$). Nos três estádios sucessionais
275 estudados, o teor de carotenoides (Fig. 3c) foi mais elevado no ano de 2014 ($P<0,05$;
276 $F_{6;1}=3,143$). Só houve alteração no acúmulo de carotenoides entre tratamentos nos
277 indivíduos do estágio inicial, que apresentaram 33% menos carotenoides nas folhas cuja
278 cera foi removida.

279 No ano de 2013 o teor de ceras epicuticulares aumentou ao longo do processo
280 sucessional (Fig. 4a). Os indivíduos apresentaram teores de aproximadamente 91, 144 e
281 225 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, nos estádios inicial, intermediário e tardio, respectivamente. Em 2014, o
282 teor de ceras foi de 80,67, 60,81 e 60,63 nos estádios inicial, intermediário e tardio,
283 respectivamente ($P<0,001$; $F_{3;1}=20,182$) e sofreu redução de 58 e 73% com relação a
284 2013 nos estádios intermediário e tardio.

285 O conteúdo foliar de fenóis foi mais elevado no ano de 2014 nos indivíduos dos
286 três estádios sucessionais (Fig. 4b). No estágio intermediário em 2013 houve um
287 acúmulo de fenóis 30% maior nas folhas cuja cera foi removida e no estágio tardio, em
288 2014, foi detectado um acúmulo 36% maior sob a mesma condição ($P<0,05$;
289 $F_{6;1}=4,563$). No ano de 2013 não houve diferença entre os estádios sucessionais, mas
290 em 2014 os indivíduos do estágio inicial apresentaram o maior acúmulo de fenóis nas
291 folhas.

292 Investigações das secções foliares com auxílio do MEV permitiram identificar
293 que as folhas de *A. pyrifolium* são hipoestomáticas, ou seja, apresenta estômatos apenas
294 na superfície abaxial das folhas (Fig. 5). A MEV também mostrou a presença de ceras
295 epicuticulares depositadas tanto na superfície abaxial quanto adaxial, sendo mais

296 espessa na face abaxial das folhas. De acordo com a classificação de ceras
297 epicuticulares de Barthlott et al. (1998), a cera de *A. pyrifolium* é do tipo filme. A
298 análise confirmou que a goma arábica foi efetiva na remoção da cera epicuticular nas
299 duas superfícies das folhas e que não houve dano em sua estrutura quando comparada
300 com as folhas controle (Fig. 5).

301

302 **Discussão**

303 Os resultados mostraram que a precipitação do ano, a ausência de cera e o
304 estágio sucessional induziram alterações nas trocas gasosas e no metabolismo foliar de
305 *A. pyrifolium*. Nos dois anos e nos três estádios sucessionais a remoção da cera induziu
306 um mecanismo de autopreservação das folhas. As folhas que tiveram a cera removida
307 sempre tiveram quedas elevadas na A , na g_s e na EUA, o que reforça a importância da
308 cera epicuticular como barreira mecânica à dessecação, já que quando ela está ausente o
309 controle estomático passa a ser o principal responsável por regular as trocas gasosas
310 foliares e, conseqüentemente, a *A* sofre uma elevada redução em relação às folhas
311 intactas (Figueiredo et al. 2012). Essa queda das taxas fotossintéticas parece ocorrer
312 principalmente pela redução da abertura estomática, pela elevação da temperatura
313 interna das folhas e pela diminuição da camada limítrofe (Ni et al. 2012). Resultados
314 semelhantes foram encontrados por Figueiredo e colaboradores (2012), em folhas de
315 *Jatropha curcas* e *J. molissima* (Euphorbiaceae) cultivadas em de casa de vegetação.
316 Nesse trabalho, as folhas que tiveram a cera removida apresentaram uma queda
317 acentuada das trocas gasosas nos primeiros dias, e apresenta resultados contrários aos
318 encontrados por Mohammadian e colaboradores (2007). No primeiro trabalho, as

319 espécies utilizadas eram nativas de ambientes semiáridos e no segundo, nativas de
320 florestas tropicais úmidas. Essa resposta diferente à remoção da cera pode ter se dado
321 pela diferença inata da fisiologia das espécies, já que espécies de ambientes úmidos
322 quando mantidas em condições adequadas de hidratação tendem a apresentar taxas
323 fotossintéticas mais elevadas quando se elimina a barreira física imposta às trocas
324 gasosas pela camada de ceras epicuticulares, e pelas condições ambientais no momento
325 das medidas (Mohammadian et al. 2007, Ni et al. 2012).

326 À medida que se avança o processo sucessional, as características do ambiente
327 são alteradas, tanto abióticas como umidade do ar e do solo, quanto bióticas, como
328 competição inter-específica e predação (dados complementares em Cabral et al. 2013).
329 Os nossos dados corroboram Zhu et al. (2013), mostrando que as taxas de trocas
330 gasosas de *A. pyrifolium* sofrem alterações ao longo do processo de regeneração natural,
331 mas também deixam clara a importância da água disponível no solo para a manutenção
332 da fotossíntese (Markesteyn et al. 2011a, Santos et al. 2014). No ano de 2013, que teve
333 uma precipitação até o mês de avaliação 67% menor que em 2014 e com menor
334 umidade do solo (Tabela 1), as trocas gasosas foram inferiores nos estádios
335 intermediário e tardio, mas não no inicial. A área inicial é menos densa e tem uma copa
336 mais aberta que as demais, mantendo um microclima de intensa radiação ao nível do
337 solo ao longo do dia, o que acaba levando a um menor teor de água disponível no solo
338 (Tabela 1). Os indivíduos que se estabeleceram nessa área apresentaram um
339 comportamento fotossintético mais produtivo em 2013, provavelmente por estarem
340 adaptadas a ciclos mais intensos de seca do que os indivíduos estabelecidos nos estados
341 mais avançados de sucessão (Zhu et al. 2013). Assim, mesmo no ano mais seco
342 apresentaram taxas fotossintéticas altas, pois já possuem um mecanismo consolidado de

343 uso eficiente da água (Rivas et al. 2013). Esses indivíduos apresentaram potenciais
344 hídricos foliares mais baixos que os indivíduos estabelecidos nos estádios intermediário
345 e tardio, o que parece permitir que consigam absorver água do solo mais eficientemente
346 e, portanto, possam investir fortemente na fixação de carbono, mesmo que à custa de
347 moléculas de água (Lebrija-Trejos et al. 2011, Pineda-García et al. 2013). No ano de
348 2013, nos estádios intermediário e tardio, os indivíduos de *A. pyrifolium* apresentaram
349 uma estratégia mais conservadora de uso da água, mantendo os seus potenciais hídricos
350 mais elevados, mas abrindo mão de taxas fotossintéticas mais altas. Dessa forma,
351 reduziram a perda de água por transpiração, mantendo a eficiência do uso da água alta
352 (Zhu et al. 2013).

353 No ano mais úmido (2014), as trocas gasosas mais elevadas foram observadas
354 nos estádios intermediário e tardio. Falcão et al. (2015) encontrou resultados
355 semelhantes em *Poincianella pyramidalis* (Fabaceae), uma espécie endêmica do
356 semiárido brasileiro, que apresentou taxas fotossintéticas mais elevadas no estádio
357 tardio quando houve maior disponibilidade hídrica. Quando há mais água disponível no
358 solo, as plantas podem aumentar sua condutividade hidráulica, já que o risco de
359 embolismo é menor (Markesteyn et al. 2011b, Choat et al. 2012). Quando em condições
360 adequadas de hidratação, a maioria das espécies consegue manter a fotossíntese com
361 potenciais hídricos foliares próximos ao ponto de perda de turgor (Choat et al. 2012) e
362 para maximizar a g_s e a A , devem operar o mais próximo possível do seu ponto de falha
363 hidráulica (Sperry 1995). Nesse contexto, as ceras epicuticulares exerceram o mesmo
364 grau de influência nas trocas gasosas em diferentes estádios sucessionais e nos
365 diferentes anos. Isso deixa claro que, mesmo em indivíduos bem hidratados, a cera

366 epicuticular é um componente importante dos mecanismos de tolerância hídrica para *A.*
367 *pyrifolium*.

368 No nosso trabalho, não conseguimos distinguir um padrão claro de alteração no
369 teor de pigmentos fotossintéticos das folhas após a remoção da cera epicuticular, já que
370 a ausência da cera epicuticular não afetou o conteúdo de clorofilas em nenhum dos
371 estádios sucessionais nos dois anos de estudo. As clorofilas são compostos celulares
372 caros para a planta, já que têm um conteúdo alto de nitrogênio e carbono, e por isso, em
373 situações de estresse hídrico, as plantas tendem a degradar suas clorofilas e alocar os
374 recursos assimilados para o crescimento e reprodução (Shangguam et al. 2000). No
375 estágio inicial, o conteúdo de clorofila a se manteve constante nos dois anos avaliados,
376 mas nos estádios intermediário e tardio, seu teor foi mais elevado no ano de 2014. Nos
377 estádios intermediário e tardio a densidade de espécie arbóreas é alta (Cabral et al.
378 2013) e, conseqüentemente, há uma maior competição pela radiação solar. No ano mais
379 úmido, os indivíduos puderam dispende recursos para aumentar a concentração de
380 clorofila nas folhas, aumentando, assim, sua capacidade fotossintética, como foi
381 observado nas taxas de *A*.

382 O conteúdo foliar de carotenoides, apesar de não ter diferido entre folhas intactas
383 e folhas sem cera, apresentou um aumento de cerca de três vezes do ano de 2013 para o
384 ano de 2014 nos três estádios sucessionais. O baixo teor de carotenoides nas folhas no
385 ano mais seco é um sinal de que as plantas estavam sofrendo estresse hídrico, pois a
386 degradação de proteínas é um das primeiras respostas ao dano causado por espécies
387 reativas de oxigênio (ROS) (Keunen et al. 2013, Oliveira et al. 2014). A ausência de um
388 padrão forte nos parâmetros bioquímicos investigados pode ter ocorrido pelo intervalo
389 curto entre a remoção da cera e a coleta das folhas, que pode não ter sido suficiente para

390 causar danos irreversíveis aos fotossistemas, como foi observado por Figueiredo e
391 colaboradores (2012).

392 É bem retratado na literatura que espécies sob condições de restrição hídrica
393 apresentam maior teor de ceras epicuticulares (Sanchez et al. 2001, Samdur et al. 2003).
394 No ano de 2014, o teor de ceras epicuticulares foi de cerca de $70 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ nos três
395 estádios sucessionais, mas no ano mais seco ele aumentou para aproximadamente 90,
396 150 e $225 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ nos estádios inicial, intermediário e tardio, respectivamente. Esse
397 maior acúmulo de ceras epicuticulares nos estádios mais avançados da regeneração
398 natural pode ser um indicativo do nível de estresse ao qual as plantas estavam
399 submetidas (Mohammadian et al. 2007). Como observado nas trocas gasosas, os
400 indivíduos dos estádios intermediário e tardio apresentaram menor tolerância hídrica
401 que os indivíduos do estádio inicial e, conseqüentemente, produziram uma camada mais
402 espessa de ceras.

403 Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas, e
404 diferentemente dos metabólitos primários, são produzidos em resposta a estímulos
405 ambientais (Herms e Mattson 1992). Duas das principais funções dos fenóis nas folhas
406 são a proteção contra herbivoria e dano oxidativo, causado por espécies reativas de
407 oxigênio- ROS (Ashraf e Harris 2013). No nosso trabalho não encontramos um padrão
408 forte de acúmulo de fenóis nas folhas que tiveram a cera removida, sendo que o teor de
409 fenóis se apresentou mais elevado em relação ao controle no estádio intermediário, em
410 2013 e no estádio tardio, em 2014. Contudo, esse acúmulo de fenóis nas folhas sem cera
411 pode ter ocorrido como um mecanismo de fotoproteção, a fim de reduzir os danos
412 causados pelas ROS (Karabourniotis et al. 2014). Encontramos um padrão consistente
413 na resposta à pluviosidade, já que, ao contrário do esperado, no ano de 2014 houve um

414 acúmulo mais elevado de fenóis nas folhas dos três estádios sucessionais. Essa resposta
415 pode indicar que no ano mais seco, 2013, as plantas investiram mais fortemente no
416 crescimento e estocagem dos produtos da fotossíntese. Esse *trade-off* entre proteção e
417 crescimento é bastante reportado na literatura e está relacionado ao dilema da “fixação
418 de carbono x economia de água” (Karabourniotis et al. 2014), que diz que plantas sob
419 condições de restrição hídrica tendem a ter taxas fotossintéticas inferiores, investindo
420 carbono fixado no crescimento em detrimento da proteção contra a herbivoria.

421 As folhas que tiveram a cera removida apresentaram sempre menores taxas de A ,
422 g_s e EUA_i nos três estádios de regeneração natural, mesmo no ano mais chuvoso, o que
423 nos permite concluir que a cera epicuticular é igualmente importante para a manutenção
424 das trocas gasosas em *A. pyrifolium* nos diferentes estádios da regeneração natural. Em
425 condições ambientais desfavoráveis, os indivíduos do estágio inicial apresentam uma
426 performance fotossintética mais eficiente que os dos estádios intermediário e tardio.
427 Também pudemos observar a alta resiliência de *A. pyrifolium* a condições de seca, já
428 que com apenas um ano de alta pluviosidade os indivíduos foram capazes de recuperar
429 suas taxas de trocas gasosas.

430 O nosso trabalho mostra a importância de estudos que levam em consideração
431 um conjunto maior de atributos das plantas para o entendimento da performance
432 fotossintética ao longo do processo de regeneração natural. O fato de ter sido realizado
433 em condições naturais nos dá um retrato mais realista da função da cera epicuticular e
434 de como ela atua na interface planta-atmosfera, pois mostra com clareza a queda na
435 EUA das folhas que tiveram a cera removida.

436

437 Agradecimentos

438 Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Pesquisas- CNPq-Brasil
439 (Proc. 563304/2010-3) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-
440 FAPEMIG– Brasil (Proc. CRA APQ-00001-11). C.D. Medeiros e H.M. Falcão
441 agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior- CAPES
442 e K.V. Figueiredo agradece a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de
443 Pernambuco- FACEPE pela concessão de bolsas para a realização de pesquisa.
444 D.Y.A.C. Santos, J.S. Almeida-Cortez e M.G. Santos agradecem ao CNPq pelo
445 financiamento.

446 Nós agradecemos ao pessoal do Instituto Tamanduá, que nos deu hospedagem e
447 permitiu nosso acesso à Fazenda Tamanduá, além de todo o suporte logístico nas
448 excursões a campo.

449

450 **Referências**

451

452 Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowelle N, Vennetier M,
453 Kitzberger T, Rigling A, Breshears DD, Hoggj EH, Gonzalez P, Fenshaml R,
454 Zhangm Z, Castro J, Demidova N, Limp JH, Allard G, Runningr SW, Semerci
455 A, Cobb N (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality
456 reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecol Manag* 259:660-
457 684

458 Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G (2014) Köppen's
459 climate classification map for Brazil. *Meteorol Z* 22(6):711-728

460 Ashraf M, Harris PJC (2013) Photosynthesis under stressful environments: an overview.
461 *Photosynthetica* 51:163-190

462 Bartlett MK, Scoffoni C, Sack L (2012) The determinants of leaf turgor loss point
463 and prediction of drought tolerance of species and biomes: a global meta-
464 analysis. *Ecol Lett* 15:393-405

465 Bell LW, Williams AH, Ryan MH, Ewing MA (2007) Water relations and adaptations
466 to increasing water deficit in three perennial legumes, *Medicago sativa*,
467 *Dorycnium hirsutum* and *Dorycnium rectum*. *Plant Soil* 290:231-243

468 Cabral GAL, Sampaio EVSB, Almeida-Cortez JS (2013) Estrutura espacial e biomassa
469 da parte aérea em diferentes estádios sucessionais de Caatinga, em Santa
470 Terezinha, Paraíba. *Rev Bras Geog Fis* 6:566–574

- 471 Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP, Osorio ML, Carvalho
472 I, Faria T, Pinheiro C (2002). How plants cope with water stress in the field:
473 photosynthesis and growth. *Ann Bot-London* 89:907-916
- 474 Choat B, Jansen S, Brodribb TJ, Cochard H, Delzon S, Baskhar R, Bucci SJ, Field TS,
475 Gleason SM, Hacke UG, Jacobsen AL, Lens F, Maherali H, Martínez-Vilalta J,
476 Mayr S, Mencuccini M, Mitchell PJ, Nardini A, Pittermann J, Pratt RB, Sperry
477 JS, Wostoby M, Wright IJ, Zanne AE (2012) Global convergence in the
478 vulnerability of forests to drought. *Nature* 491:752-755
- 479 Eilmann B, Rigling A (2012) Tree-growth analyses to estimate tree species' drought
480 tolerance. *Tree Physiol* 32:178-187
- 481 Falcão HM, Medeiros CD, Silva BLR, Sampaio EVSB, Almeida-Corte JS, Santos MG
482 (2015) Phenotypic plasticity and ecophysiological strategies in a tropical dry
483 forest chronosequence: A study case with *Poincianella pyramidalis*. *Forest Ecol*
484 *Manag* 340:62-69
- 485 Figueiredo KV, Oliveira MT, Oliveira AFM, Silva GC, Santos MG (2012)
486 Epicuticular-wax removal influences gas exchange and water relations in the
487 leaves of an exotic and native species from a Brazilian semiarid region under
488 induced drought stress. *Aust J Bot* 60:685-692
- 489 Flexas J, Barón M, Bota J, Ducruet J-M, Gallé A, Galmés J, Jiménez M, Pou A, Ribas-
490 Carbó M, Sajnani C, Tomàs M, Medrano H (2009) Photosynthesis limitations
491 during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted *Vitis* hybrid
492 Richter-110 (*V. berlandieri* x *V. rupestris*). *J Exp Bot* 60(8):2361-2377

- 493 Freitas ADS, Sampaio EVSB, Silva BLR, Almeida-Cortez JS, Menezes RSC (2012)
494 How much nitrogen is fixed by biological symbiosis in tropical dry
495 forests? 2. Herbs. *Nutr Cycl Agroecosys* 94:181-192
- 496 Herms DA, Mattson WJ (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Q Rev Biol*
497 67:283-335
- 498 Karabourniotis G, Liakopoulos G, Nikolopoulos D, Bresta P, Stavroulaki V, Sumbele S
499 (2014) “Carbon gain vs. water saving, growth vs. defence”: Two dilemmas with
500 soluble phenolics as a joker. *Plant Sci* 227:21-27
- 501 Keunen E, Peshev D, Vangronsveld J, Ende WVD, Cuypers A (2013) Plant sugars are
502 crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the
503 traditional concept. *Plant Cell Environ* 36:1242-1255
- 504 Lebrija-Trejos E, Meave JÁ, Poorter L, Pérez-García EA, Bongers F (2010)
505 Pathways, mechanisms and predictability of vegetation change during tropical
506 dry forest succession. *Perspect Plant Ecol* 12:267-275
- 507 Lebrija-Trejos E, Pérez-García EA, Meave JÁ, Poorter L, Bongers F (2011)
508 Environmental changes during secondary succession in a tropical dry forest in
509 Mexico. *J Trop For* 27:477-489
- 510 Lichtentaler HK (1982) Synthesis of phenyl lipids in vascular plants (including
511 chlorophylls, carotenoids, prenyl quinones). In: Zaborsky OR, Mitsui A, Black
512 Jr. CC (eds) *CRC Handbook of Biosolar Resources, Vol. I, Part. I: Basic*
513 *Principles*. CRC Press, Boca Ratón, pp 405-421

- 514 Markesteijn L, Poorter L, Bongers F, Paz H, Sack L (2011a) Hydraulics and life history
515 of tropical dry forest tree species: coordination of species' drought and shade
516 tolerance. *New Phytol* 191:480-495
- 517 Markesteijn L, Poorter L, Paz H, Sack L, Bongers F (2011b) Ecological differentiation
518 in xylem cavitation resistance is associated with stem and leaf structural traits
519 *Plant Cell Environ* 34:137-148
- 520 MMA (2005) Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações
521 prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de
522 benefícios da biodiversidade brasileira. Ministério do Meio Ambiente,
523 Brasília, Brazil.
- 524 Mohammadian M, Watling JR, Hill RS (2007) The impact of epicuticular wax on gas-
525 exchange and photoinhibition in *Leucadendron lanigerum* (Proteaceae). *Acta*
526 *Oecol* 31:93-101
- 527 Ni Y, Guo YJ, Guo YJ, Han L, Tang H, Conyers M (2012) Leaf cuticular waxes and
528 physiological parameters in alfalfa leaves as influenced by drought.
529 *Photosynthetica* 50(3):458-466
- 530 Oliveira AFM, Meirelles ST, Salatino A (2003) Epicuticular waxes from Caatinga and
531 Cerrado species and their efficiency against water loss. *An Acad Bras Ciênc*
532 75:431-439
- 533 Oliveira MT, Matzek V, Medeiros CD, Rivas R, Falcão HM, Santos MG (2014) Stress
534 tolerance and ecophysiological ability of an invader and a native species in a
535 seasonally dry tropical forest. *PLoS ONE* 9(8):1-11

- 536 Pereira IM, Andrade LA, Costa JRM, Dias JM (2001) Regeneração natural em um
537 remanescente de caatinga sob diferentes níveis de perturbação, no agreste
538 Paraibano. Acta Bot Bras 15(3):25-32
- 539 Pineda-García F, Paz H, Meinzer FC (2013) Drought resistance in early and late
540 secondary successional species from a tropical dry forest: the interplay between
541 xylem resistance to embolism, sapwood water storage and leaf shedding. Plant
542 Cell Environ 36:405-418
- 543 Quesada M, Sanchez-Azofeifa GA, Alvarez-Anorve M, Stoner KE, Avila-
544 Cabadilla L, Calvo-Alvarado J, Castillo A, Espirito-Santo MM, Fagundes
545 M, Fernandes GW, Gamo J, Lopezaraiza-Mikel M, Lawrence D, Morellato
546 LPC, Powers JS, Neves F.D, Rosas-Guerrero V, Sayago R, Sanchez-Montoya G
547 (2009) Succession and management of tropical dry forests in the Americas:
548 review and new perspectives. Forest Ecol Manag 258:1014-1024
- 549 Rivas R, Oliveira MT, Santos MG (2013) Three cycles of water deficit from seed to
550 young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. Plant
551 Physiol Bioch 63:200-208
- 552 Samdur MY, Manivel P, Jain VK, Chikani BM, Gor HK, Desai S, Misra JB (2003)
553 Genotypic differences and waterdeficit induced enhancement in epicuticular wax
554 load in peanut. Crop Sci 43:1294-1299
- 555 Sanchez FJ, Manzanares M, de Andres EF, Tenorio JL, Ayerbe L (2001) Residual
556 transpiration rate, epicuticular wax load and leaf colour of pea plants in drought

- 557 conditions. Influence on harvest index and canopy temperature. *Eur J Agron*
558 15:57-70
- 559 Santos MG, Oliveira MT, Figueiredo KV, Falcão HM, Arruda E., Almeida-Cortez JS,
560 Sampaio EVSB, Ometto JPHB, Menezes RSC, Oliveira AFM, Pompelli MF,
561 Antonino ACD (2014) Caatinga, the Brazilian dry tropical forest: can it tolerate
562 climate changes? *Theor Exp Plant Physiol* 26:83-99
- 563 Schölander PF, Hammel HT, Bradstrees ED, Hemmingsen EA (1965) Sap
564 pressure in vascular plants. *Science* 148:339-346
- 565 Shangguan Z, Shao M, Dyckmans J (2000) Effects of nitrogen nutrition and water
566 deficit on net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in winter wheat.
567 *J Plant Physiol* 156:46-51
- 568 Souza BD, Rodrigues BM, Meiado MV, Santos MG (2010) Water relations and
569 chlorophyll fluorescence responses of two leguminous trees from the Caatinga to
570 different watering regimes. *Acta Physiol Plant* 32:235-244
- 571 Sperry JS (1995) Limitations on stem water transport and their consequences. In:
572 Gartner BL (ed) *Plant Stems: Physiological and Functional Morphology*.
573 Academic Press, San Diego, pp 105-124
- 574 Tabarelli M, Santos BA, Arroyo-Rodríguez V, Melo FPL (2012) Secondary forests as
575 biodiversity repositories in human-modified landscapes: insights from the
576 Neotropics. *Bol Mus Para Emílio Goeldi sér Ciências Naturais* 7(3):319-328
- 577 Valladares F, Gianoli E, Gómez JM (2007) Ecological limits to plant phenotypic
578 plasticity. *New Phytol* 176:749-763

- 579 Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD (1998) Antioxidant activity and total
580 phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J Agr Food Chem*
581 46:4113-4117
- 582 Zhu S, Song J, Li R, Ye Q (2013) Plant hydraulics and photosynthesis of 34 woody
583 species from different successional stages of subtropical forests. *Plant Cell*
584 *Environ* 36:879-891

Tabelas

Tabela 1. Temperatura (°C), umidade do ar (%), déficit e pressão de vapor- DPV (KPa), radiação fotossinteticamente ativa incidente- PAR ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e umidade do solo (%) no momento das trocas gasosas nos anos de 2013 e 2014 em três diferentes estádios sucessionais de uma floresta tropical seca.

	Estádio Sucessional					
	Inicial		Intermediário		Tardio	
	2013	2014	2013	2014	2013	2014
Temperatura (°C)	33,2	32,5	31,2	34,6	38,9	31,5
Umidade (%)	52	45	57	48	38	55
DPV (KPa)	2,11	2,26	1,55	2,63	2,32	2,54
PAR ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	1800	1700	1600	1600	1400	1600
Umidade do solo (%)	2,41±0,27	3,28±0,57	3,74±0,45	3,25±0,69	3,98±0,33	4,19±0,27 ^{ns}

Figuras

Figura 1. Precipitação mensal nos anos de 2013 e 2014 na Fazenda Tamanduá, Santa Teresinha-PB. A seta indica os meses em que foram realizadas as avaliações de campo. (Fonte: www.agritempo.gov.br).

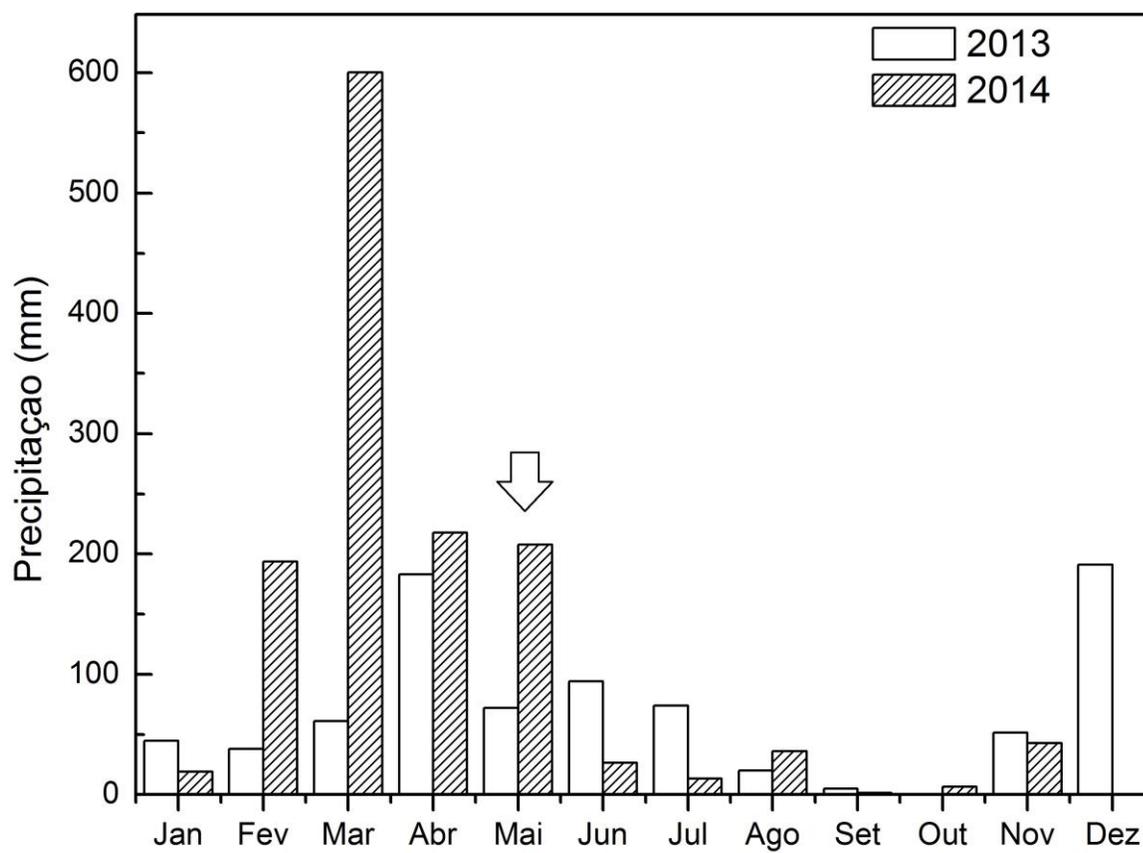


Figura 1

Figura 2. Condutância estomática (g_s - A), assimilação líquida de CO_2 (A- B), eficiência no uso da água (EUA_i - C) e potencial hídrico foliar (Ψ_f - D) de *Aspidosperma pyrifolium* em folhas intactas (controle) e cuja cera foi removida nos anos de 2013 e 2014 em três diferentes estádios sucessionais de uma floresta tropical seca. Letras diferentes representam diferença estatística detectada a partir de uma ANOVA aninhada fatorial, seguida do teste de *Student Newman Keul's* ($p < 0,05$ e $n = 4 \pm EP$).

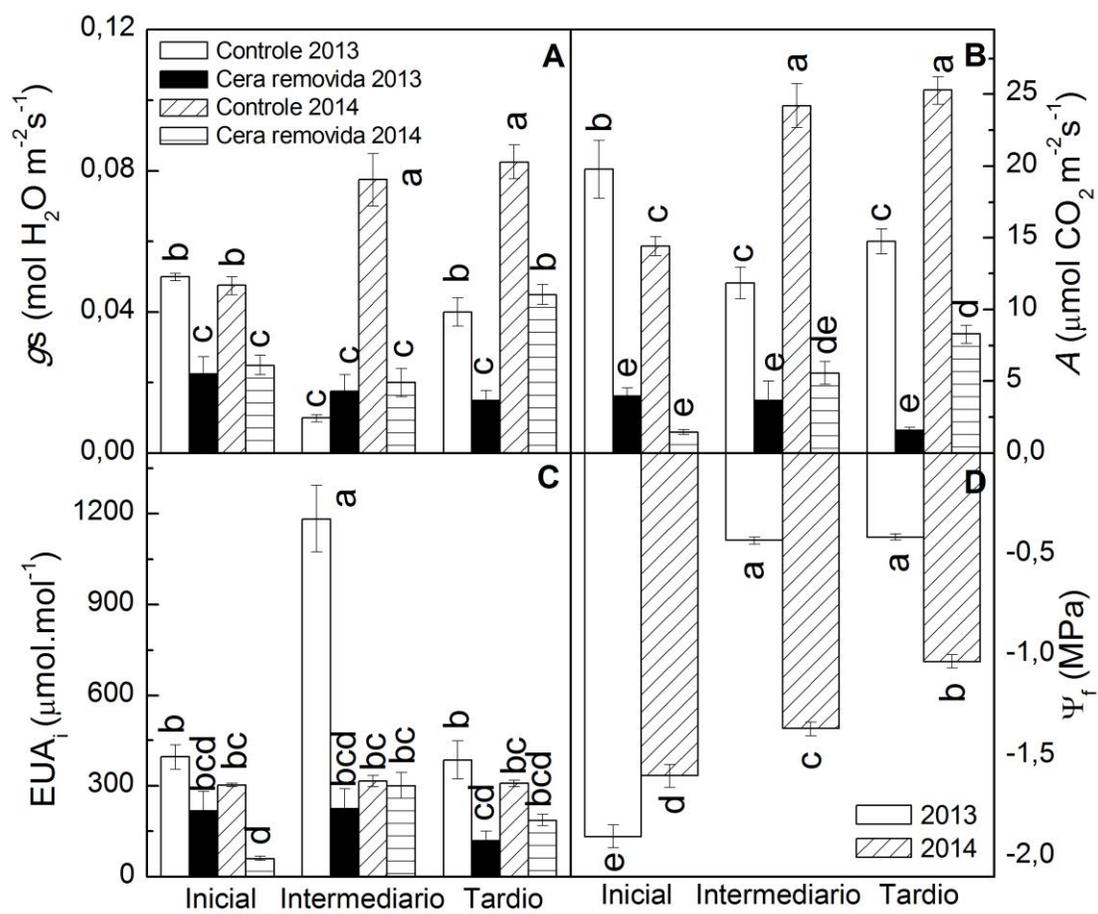


Figura 2

Figura 3. Conteúdo foliar de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B) e carotenoides (C) de *Aspidosperma pyrifolium* em folhas intactas (controle) e cuja cera foi removida nos anos de 2013 e 2014 em três diferentes estádios sucessionais de uma floresta tropical seca. Letras diferentes representam diferença estatística detectada a partir de uma ANOVA aninhada fatorial, seguida do teste de *Student Newman Keul's* ($p < 0,05$ e $n = 4 \pm EP$).

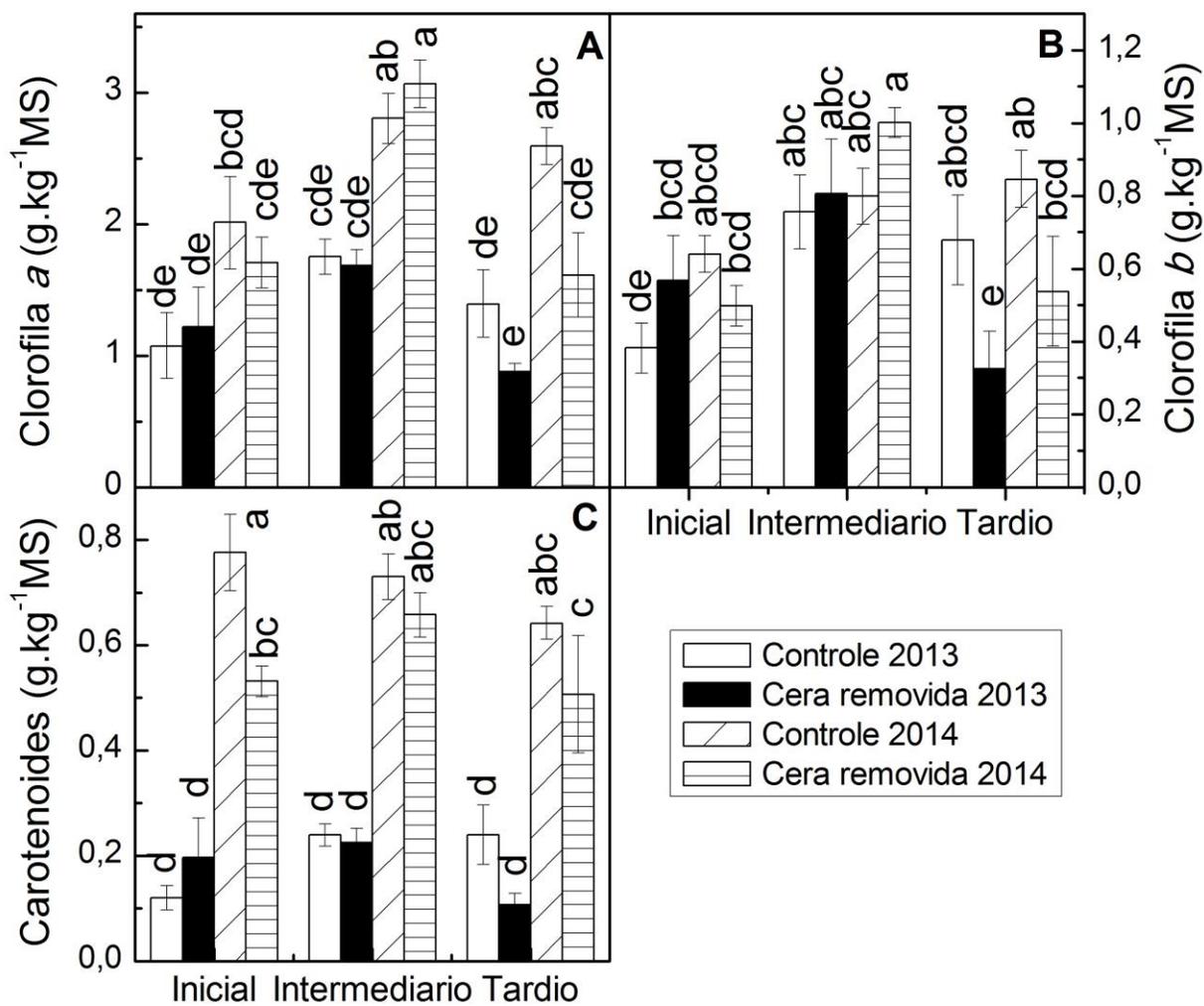


Figura 3

Figura 4. Conteúdo foliar de ceras epicuticulares (A) e fenóis (B) de *Aspidosperma pyrifolium* em folhas intactas (controle) e cuja cera foi removida nos anos de 2013 e 2014 em três diferentes estádios sucessionais de uma floresta tropical seca. Letras diferentes representam diferença estatística detectada a partir de uma ANOVA aninhada fatorial, seguida do teste de *Student Newman Keul's* ($p < 0,05$ e $n = 3 \pm EP$).

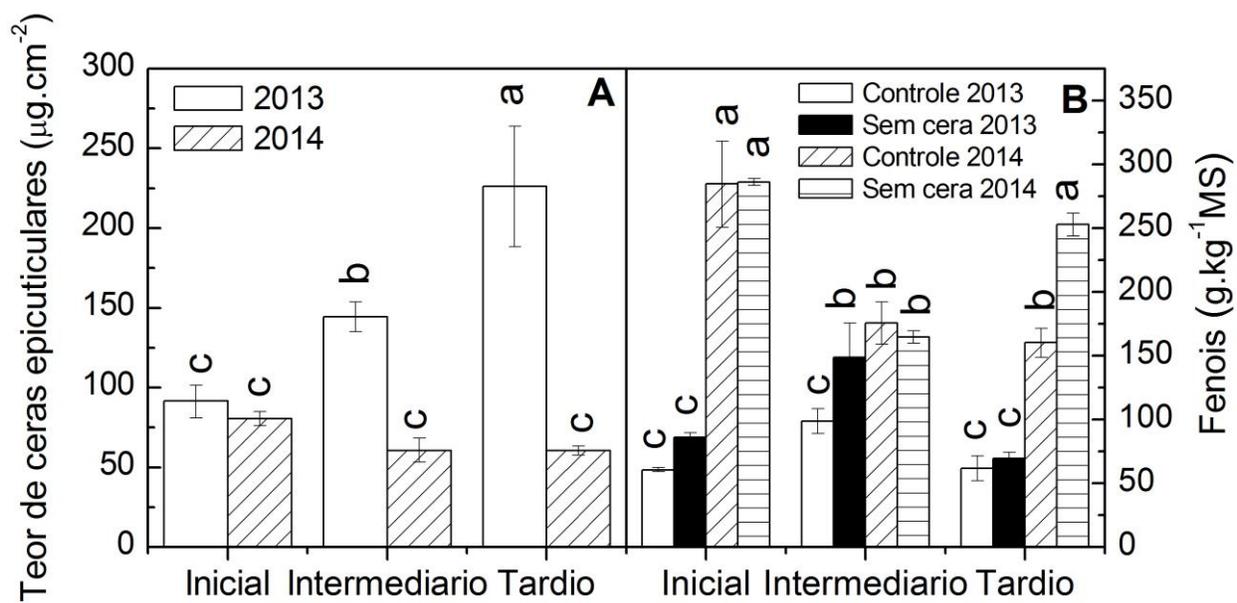


Figura 4

Figura 5. Detalhes da ultraestrutura da superfície abaxial de folhas intactas (controle) (A) e cuja cera foi removida (B) e da superfície adaxial de folhas intactas (controle) (C) e cuja cera foi removida (D) de folhas de *Aspidosperma pyriformium* no estágio intermediário de uma floresta tropical seca.

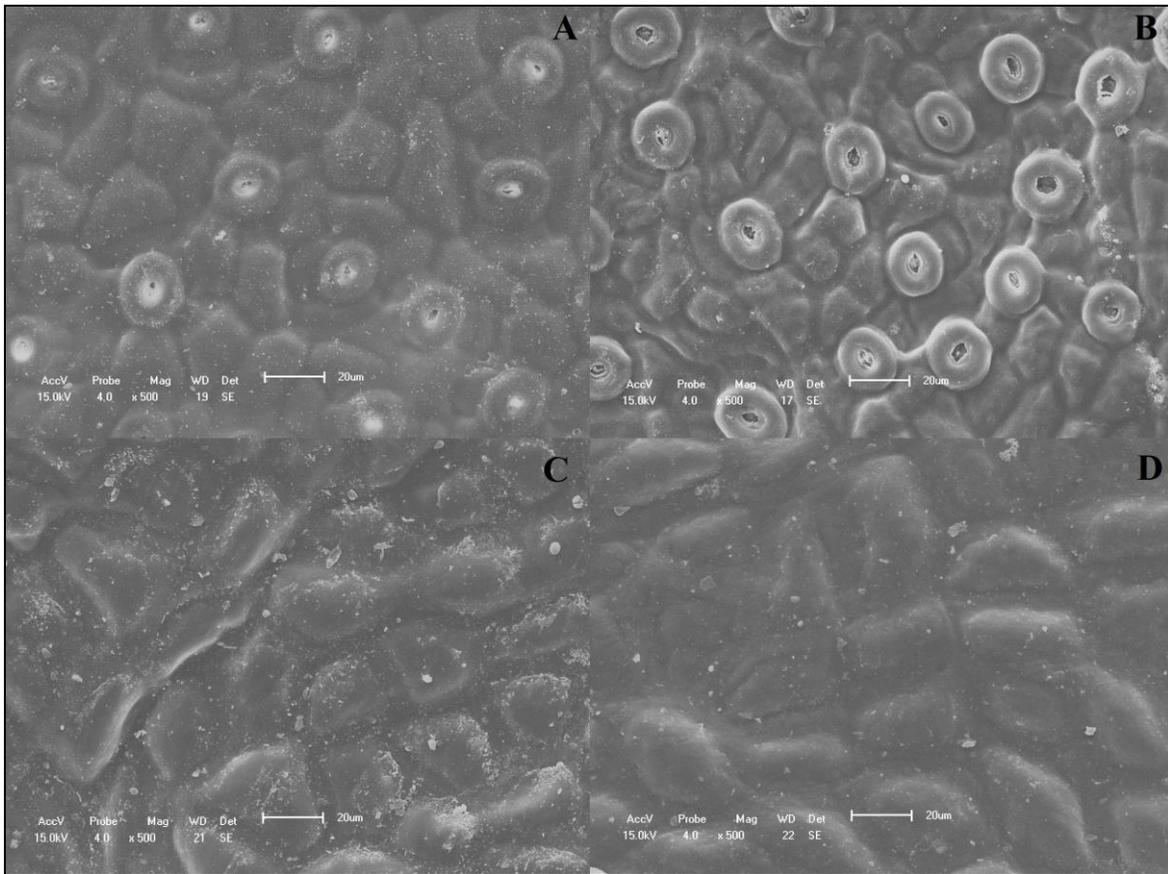


Figura 5

ANEXO- REGRAS DO PERIÓDICO OECOLOGIA

Oecologia: Author Instructions – Manuscript Guidelines

Instructions for authors at Springer.com do not include all formatting expectations for Oecologia submissions. Oecologia's Editors-in-Chief have combined all of Springer's instructions along with their additional detailed expectations into two user-friendly files; "Manuscript Guidelines" and "Artwork Instructions". Please prepare submissions to Oecologia according to the instructions in these two files. Submissions that do not follow these guidelines may be returned to authors or their review may be delayed.

- Aims and scope

Legal and ethical requirements Manuscript submission and preparation Manuscript contents

- After acceptance

Aims and scope

Oecologia publishes innovative ecological research of general interest to a broad international audience. We publish several types of manuscripts in many areas of ecology:

- Categories:

Concepts, Reviews and Synthesis Views and Comments

Methods

Physiological ecology – Original research Behavioral ecology – Original research
Population ecology – Original research

Plant-animal interactions – Original research Community ecology – Original research
Ecosystem ecology – Original research Global change ecology – Original research
Conservation ecology – Original research Special Topic

In general, studies that are purely descriptive, mathematical, documentary, and/or natural history will not be considered.

In the Concepts, Reviews and Syntheses section, we seek papers on emerging issues in ecology, especially those that cross multiple boundaries in ecology, provide synthesis of important bodies of work or delve into new combinations of theory and observations with the potential to create new paradigms or challenge existing paradigms. These papers are usually invited, but we welcome unsolicited contributions. In the Views and Comments section we seek short papers with the intent to provide contrary and/or broader perspectives on papers recently published in Oecologia. Alternatively, pairs of short papers which present opposing views on a topic of high interest in the ecological

research community will be published in this section, with the intent to stimulate open debate. In both cases, the papers must be relatively short (up to 5 printed pages in the case of opposing view pairs of papers, or up to 3 printed pages in the case of comments on previously-published work), and to contain not only an opinion or criticism on methods or statistics, but also relevant data or original analyses that support the opposing view or comment. Manuscripts or letters intended for the Views and Comments section will be reviewed by one of the Editors-in-Chief and a Handling Editor in the field appropriate to the submission. Special Topics are a collection of integrated papers on a critical topic of broad interest. Proposals for Special Topics should be submitted to one of the Editors- in-Chief. Methods are papers that outline new approaches that address standing questions in the discipline. Original Research papers are published by subject; they provide the core of our journal and represent original investigations that offer new insights into ecological systems.

- Legal and ethical requirements

Ethical responsibilities of authors:

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal and ultimately the entire scientific endeavor. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which includes:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the authors own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received from all co-authors and responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out before the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

- Changes of authorship or in the order of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.
- Requests to add or delete authors at revision stage or after publication is a serious matter, and may be considered only after receipt of written approval from all authors and detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. The decision on accepting the change rests with the Editors-in-Chief of the journal.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been proven, this may result in the Editors-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.
- The author's institution may be informed.
- Disclosure of potential conflict of interests

Authors must disclose all relationships or interests that could influence or bias the work. Although an author may not feel there are conflicts, disclosure of relationships and interests affords a more transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of real or perceived conflicts of interests is a

perspective to which the readers are entitled and is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found here . The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

- See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

- If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

- Statement of Human and Animal Rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the institutional and/or national guidelines for the care and use of animals were followed.

For studies with animals, the following statement should be included:

“All applicable institutional and/or national guidelines for the care and use of animals were followed.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, Springer recommends including the following sentence:

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

For retrospective studies, please add the following sentence: “For this type of study formal consent is not required.”

- Declaration of authorship

Authorship means holding responsibility for a written piece of text or artwork. In science, it implies personal involvement in the design, conduct and reporting of new research. An author must have participated in the research, understand the data and the text, and be able to present the contents to others. Principles of authorship are sometimes neglected, leading to questionable assignment of authorship and diminution of the credit for those who deserve authorship.

Providing funds, supervising or hosting researchers, belonging to a research consortium, attending a meeting or a workshop, offering access to samples, organisms or sites, providing technical assistance or preparation of diagrams and tables deserve appropriate acknowledgement, but do not commonly entitle one to authorship. Exceptions are contributions that involve highly technical skills (methodology) or intellectual input (e.g. statistical expertise) that was key to the final product.

All *Oecologia* submissions are required to include a declaration of authorship, including submissions with a single author. The declaration must include an explanation of the contribution or activity of each author to the final product. Submit the declaration of authorship as a footnote on the manuscript title page, using capital initials of authors. When two or more authors share the same initials spell out the last (or middle) name of each to distinguish them.

- Please follow the format of the following examples:

Author Contributions: AJT and SSW conceived and designed the experiments. AJT and CR performed the experiments. AJT, CR, FKB analyzed the data. AJT, CR, SSW wrote the manuscript; other authors provided editorial advice.

Author Contributions: JM originally formulated the idea, BLZ developed methodology, PDT conducted fieldwork, BLZ generated sequencing data and molecular analyses, TT and BLZ collaborated in imaging analysis, ISS developed the mathematical models, BLZ and ISS performed statistical analyses, and BLZ and ISS wrote the manuscript.

For manuscripts with a single author, please use the following statement:

Author Contributions: SGJ conceived, designed, and executed this study and wrote the manuscript. No other person is entitled to authorship.”

The Editors-in-Chief reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above- mentioned requirements. The author(s) will be held responsible for false statements or for failure to fulfill the above-mentioned requirements.

- Manuscript submission

Authors must submit their articles to Oecologia online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing, review and publication time. After passing a pre-review assessment for journal eligibility by an Editor-in-Chief and a Handling Editor, submitted manuscripts are subject to peer review and copy editing. Please log directly onto the link below

and upload your manuscript following the on-screen instructions. For the review process, the manuscript may be submitted as one single file (PDF, Microsoft Word or Rich Text Format with embedded illustrations, tables, etc.). If the manuscript is accepted, original files (not pdf or html) of the final version of the manuscript must be uploaded for production. Online appendices (Electronic Supplementary Material, ESM) must be submitted in a separate file.

There is a total file size limit of 60 MB for a manuscript submission, including ESM. If ESM (e.g., video) exceeds this size, please contact the appropriate Editor-in-Chief directly.

Submit Online

- Manuscript preparation

- The length of articles should not exceed 10 printed pages (equivalent to approximately 35 submitted pages) including all references, tables, figures, and figure legends. Views and Comments submissions must be limited to 3 to 5 printed pages. One printed page corresponds to approximately 3 submitted pages, 850 words text, or 3 illustrations with their legends, or 55 references. There will be a charge of 100 €, plus 19% VAT, for each page exceeding this limit. Editors typically return manuscripts prior to review that are likely to exceed the page limit.

- Manuscripts must be written in English and double-spaced throughout (including references) with at least 2.5 cm (1 inch) margins. Please write in the active voice using the past tense only for methods and results sections.

- Page numbers are optional but should not be included on tables and figures. Pages in Electronic Supplementary Material (ESM) should be numbered separately.

- Line numbers are required and should run consecutively throughout the text, from the abstract through the figure legends. Do not number lines in tables, figures or ESM.

- Use a normal, plain font (e.g. Times New Roman) for text. Genus and species names should be in italics. The common names of organisms should not be capitalized
 - Abbreviations should only be used for terms repeated at least 3 times. Abbreviations should be defined at first mention in the abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter.
 - Format dates as day-month-year with months abbreviated: e.g., 01-Jan-2008
 - Use the equation editor of a word processing program or MathType for equations. (Note: If you use Word 2007, do not create equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.) Symbols for parameters should be italicized.
 - Report values in equations, tables, figures and statistics with the number of digits that matches the precision of the data.
 - Please always use Unicode (<http://www.unicode.org>) font for non-Roman characters. Use internationally accepted signs and symbols following the Standard International System of Units (SI, <http://physics.nist.gov/cuu/Units/units.html>) throughout the manuscript (in the text, tables and figures). Avoid complex units wherever possible (e.g. use “no. m⁻²” instead of “no. per 16 m²”). Units should use exponent notation and avoid multiplication and division symbols (e.g., “*”, “/”, “x”): i.e., “no. m⁻²” and not “no./m²”).
 - Footnotes should not be used, except on the title page or in Tables.
 - For indents, use tab stops or other commands, not the space bar.
- Manuscript contents (in order)
 - Title page The title should be concise and informative and less than 200 characters. Short titles (< 15 words) are best and are more often cited. The concept, problem or hypothesis to be tested should be clear from the title. The use of full taxonomic names in the title is discouraged; no taxonomic authorities should appear in titles. On the title page, include name(s) of author(s), the affiliation(s) of the author(s), and the e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author. A declaration of authorship is required to be included as a footnote on the title page.
 - Abstract The abstract should include the following elements: introduction, hypothesis/objective, methods, results, conclusions and significance. It should not exceed 250 words in length. Each component should be restricted in length to 1-3 sentences. Allocate the greatest number of words to the results (~ 3 sentences) and less

to each of the other sections (~1 sentence each). Include key quantitative data in the results. Do not repeat the title in the first sentence and avoid phrases such as ‘is discussed’ and “needs further research”. Write for a general audience; avoid jargon, undefined abbreviations and literature references.

- **Key words:** Five key words should be supplied, indicating the scope of the paper and not repeating terms already used in the title. Each keyword should not contain more than two compound words, preferably only one.
- **Introduction**
- **Materials and methods:** Some submissions, such as reviews, may depart from the typical format of Methods-Results-Discussion.
- **Results:** Avoid “Results are shown in Figure 3”. Instead, say for example, “Biodiversity declined with the addition of nitrogen (Fig. 3).” Be specific: e.g., “positively correlated” instead of “correlated”. Refer to magnitudes of effects (e.g. give effect sizes and confidence intervals) rather than just P-values.
- **Discussion**
- **Acknowledgements:** Please keep this section as short as possible. Acknowledgements of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full. Compliance with ethical standards may be stated in the cover letter rather than the acknowledgements section.
- **References:** Literature citations in the text should be ordered chronologically and indicate the author's surname with the year of publication in parentheses, e.g. Carlin (1992); Brooks and Carlin (1992). If there are more than two authors, only the first author should be named, followed by "et al." For example, “Carlin (1992), Brooks and Carlin (2004, 2005), Jones et al. (2007) demonstrated...” OR “... well studied (Carlin 1992; Brooks and Carlin 2004, 2005; Jones et al. 2007)”. References at the end of the paper should be listed in alphabetical order by the first author's name. If there is more than one work by the same author or team of authors in the same year, a, b, etc. is added to the year both in the text and in the list of references. References should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Alphabetize the list of references by the last names of the first author of each work. If available, the Digital Object Identifier (DOI) of the cited literature should be added at the end of each reference. Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations (www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php). Reference examples:

Journal papers: name(s) and initial(s) of all authors; year; full title; journal title abbreviated in accordance with international practice; volume number; first and last page numbers

i.e.: Savidge WB, Blair NE (2004) Patterns of intramolecular carbon isotopic heterogeneity within amino acids of autotrophs and heterotrophs. *Oecologia* 139:178-189 doi: 10.1007/s00442-004-1500-z

Chapter in a book: name(s) and initial(s) of all authors; year; title of article; editor(s); title of book; edition; volume number; publisher; place of publication; page numbers.

i.e.: Hobson KA (2003) Making migratory connections with stable isotopes. In: Berthold P, Gwinner E, Sonnenschein E (eds) *Avian migration*. Springer, Berlin, pp 379-391.

Book: name and initial(s) of all authors; year; title; edition; publisher; place of publication

i.e.: Körner C (2003) *Alpine plant life*, 2nd edn. Springer, Berlin

Theses: name and initial(s) of author; year; type (e.g., “Master thesis” or “PhD dissertation”); department; institution; place of publication.

i.e.: Wilson JA (2004) *Habitat quality, competition and recruitment processes in two marine gobies*. PhD dissertation, Department of Zoology, University of Florida, Gainesville, Florida, USA.

- Tables: Each table should be submitted on a separate page, with the title (heading) above the table. Tables should be understandable without reference to the manuscript text. Restrict your use of tables to essential material. All tables must be cited in the manuscript text and numbered consecutively with Arabic numerals. Provide dimensions or units for all numbers. Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table heading. Tables will be printed with horizontal separation lines only (one below the table’s header, one below the column headers, and one at the end of the table); no vertical lines will be printed. Use tab stops to align columns and center numbers around decimals when appropriate. Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). The number of decimals presented should be sensible and match the precision of the data. Acceptable file formats for tables include Microsoft Word (.doc), Rich Text Format (.rtf) and Excel (.xls).

- **Figure legends:** All figure legends (captions) should be assembled onto a separate page(s) preceding the figures. Each caption should be brief but sufficient to explain the figure without reference to the text. All figures must be cited in the manuscript text and numbered consecutively with Arabic numerals. Please click here for journal-specific instructions and examples.

- **Figures:** Each figure should appear on a separate page, with its figure number but without the figure legend. Figure preparation is critical. Please click here for journal-specific instructions and examples.

- **Electronic Supplemental Material (ESM):** ESM are on-line appendices and may consist of information that is more convenient in electronic form (e.g. sequences, spectral data); large quantities of original data that relate to the manuscript (e.g. maps, additional tables and illustrations); and any information that cannot be printed (animations, video clips, sound recordings). Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability. Figures embedded within the ESM text are fine. If spreadsheets are to be interactive, they should be submitted as .xls files (Microsoft Excel), otherwise submit as PDF. Always use MPEG-1 (.mpg) format for audio, video and animation. It is possible to submit multiple files in a .zip or .gz file. Name the ESM files consecutively, e.g. "ESM3.mpg". ESM must be numbered and referred to as "Online Resource". The manuscript text must make specific mention of the ESM material as a citation, similar to that of figures and tables, e.g., ". . . as shown in the animation (Online Resource 3)". ESM is not subject to copyediting and will be published as received from the author. Authors should format the ESM material exactly as they want it to appear; manuscript title, authors, and contact information for the corresponding authors should be included. Do not include line numbers. ESM will be available in color at no additional charge. Reference to ESM will be included in the printed version.

- **After acceptance**

- **Proofs of accepted manuscripts:** The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Authors of manuscripts accepted for publication are informed by e-mail that a temporary URL has been created from which they can obtain their proofs. Proofreading is the responsibility of the author. Authors should make their proof corrections (formal corrections only) on a printout of the pdf file supplied, checking that the text is complete and that all figures and tables are included. Substantial changes in content (e.g. new results, corrected values, title and authorship) are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case please contact the Editorial Office that handled the review before returning the proofs to the publisher. After online publication, corrections can only be made in exceptional cases and in the form of an Erratum which will be hyperlinked to the paper. ESM will not be included in proofs

(because ESM is not copy edited and will be made available exactly as it was provided by the authors).

- **Copyright Transfer Statement:** If a manuscript is accepted after review the "Copyright Transfer Statement" must be signed and returned to the publisher prior to publication. Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws. See Springer's "Instructions for Authors" for more information.
- **Online First:** Accepted papers will be published online about one week after receipt of the corrected proofs. Papers published online can be cited by their DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.
- **Reprints:** Twenty-five reprints (offprints) of each contribution are supplied free of charge. If you wish to order additional offprints you must return the order form which is provided with the proofs and return it together with the corrected proofs.
- **Springer Open Choice:** In addition to our traditional publication process, Springer also provides an alternative open-access publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular article, and in addition is made freely available through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before free access publication. Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author Springer Open Choice.

Once a paper has been accepted for publication in *Oecologia*, authors are invited to send photographs that highlight their work and might be appropriate to be featured on the cover of *Oecologia*. High resolution digital images of the photographs should be sent electronically to Carlos Ballare (ballare@ifeva.edu.ar), the Editor-in-Chief in charge of choosing *Oecologia* cover photos. Please include a full listing of the photographer who produced the image, including their institution or company and their e-mail address.