

Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Biociências

Departamento de Biologia Vegetal

SILVIA CAROLINE FARIAS PEREIRA

**Efeito da remoção da cera epicuticular e disponibilidade hídrica sobre
o metabolismo fotossintético foliar de uma espécie sempre verde de
Caatinga**

RECIFE

2016

SILVIA CAROLINE FARIAS PEREIRA

**Efeito da remoção da cera epicuticular e disponibilidade hídrica sobre
o metabolismo fotossintético foliar de uma espécie sempre verde de
Caatinga**

Dissertação 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

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Pereira, Silvia Caroline Farias

Efeito da remoção da cera epicuticular e disponibilidade hídrica sobre o metabolismo fotossintético foliar de uma espécie sempre verde de Caatinga/ Silvia Caroline Farias Pereira– Recife: O Autor, 2016.

75 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Mauro Guida dos Santos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia vegetal, 2016.

Inclui referência e anexo

- 1. Fisiologia vegetal 2. Mudanças climáticas 3. Caatinga I. Santos, Mauro Guida dos (orientador) II. Título**

571.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-216

SILVIA CAROLINE FARIAS PEREIRA

**“EFEITO DA REMOÇÃO DA CERA EPICUTICULAR E
DISPONIBILIDADE HÍDRICA SOBRE O METABOLISMO
FOTOSSINTÉTICO FOLIAR DE UMA ESPÉCIE SEMPRE VERDE
DE CAATINGA”**

APROVADA EM: 23 / 02 / 2016

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Mauro Guida dos Santos (orientador) – UFPE

Dr^a. Keila Rêgo Mendes (1º titular) – UFPE

Dr^a. Jarcilene Silva Almeida Cortez (2º titular) – UFPE

Recife-PE
2016

Aos meus familiares, amigos e colegas de trabalho que estiveram comigo nesta caminhada,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família por todo apoio e paciência durante estes dois anos de certa ‘ausência’ devido aos afazeres acadêmicos. E um obrigado especial à Ivani, minha mãe, Suelen, minha irmã e Willams, meu namorado que estiveram sempre presentes nos momentos mais difíceis desse mestrado.

Ao meu orientador, que com toda paciência mais que me orientou durante esse tempo, tendo sempre as palavras certas nos momentos certos; a verdade é que se hoje eu caminho para um bom crescimento acadêmico, foi porque o apoio dele foi parte fundamental para que isso acontecesse. Mas claro, todo trabalho tem muita gente envolvida, por isso meu ‘muito obrigada’ a Karla Figueiredo e a Gilberto Couto pelas idas a campo e companheirismo nessa etapa tão sofrida, e ao professor Antônio Fernando Oliveira pela paciência em me ensinar e a disponibilidade e boa vontade em me ajudar a entender e realizar as análises ao qual eu nunca tinha lidado e que envolveram esse trabalho. Também, a todos os integrantes do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal que colaboraram com este trabalho, seja na bancada, na leitura ou na convivência do dia a dia, cada momento foi importante; mas principalmente a Gabriela Frosi, Hiram Falcão, Marciel Oliveira, Karla, Camila Dias, Natália Corte Real, Mariana Lins e Rebeca Rivas, que além de companheiros de profissão são grandes amigos.

Aos meus amigos e companheiros de turma – e agregados: Silvia Santos, Lucas Costa, Bruno Lustosa, Camila Miranda, Daniela Queiroz, Rodolfo Ferreira e Lígia Gomes, pela cumplicidade e parceria no desespero daqueles momentos mais difíceis desse caminho.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal pela oportunidade que me foi dada. Assim como, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro cedido para a realização da pesquisa.

Muito obrigada!

RESUMO

Adaptações e mecanismos de tolerância à seca são fatores fundamentais para a sobrevivência das espécies vegetais de clima árido ou semiárido. É devido a adaptações como área foliar, profundidade de raízes, manutenção do status hídrico, espessura da cutícula e densidade estomática que tais espécies obtêm sucesso neste ambiente. Contudo, diante das mudanças climáticas há a necessidade de avaliação da eficiência desses mecanismos diante de uma condição ainda mais limitante. Dessa forma, nosso objetivo foi analisar os principais mecanismos fisiológicos de tolerância a seca de *Cynophalla flexuosa* (L.) J.Presl., uma espécie lenhosa e sempre verde de uma floresta tropical sazonalmente seca, avaliando de que forma a cera epicuticular (CE) das folhas dessa espécie são eficientes diante das condições do seminário em diferentes épocas do ano. O trabalho foi realizado em três períodos (julho de 2014, dezembro de 2014 e fevereiro de 2015), ao longo de um dia em uma área de Caatinga, utilizando folhas intactas e com parte da CE removida mecanicamente. Foi calculado o balanço hídrico do solo e mensurado o potencial hídrico foliar, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, bioquímica e anatomia foliar. Foi observado que *C. flexuosa* reduz seu potencial hídrico foliar nos horários mais quentes, sendo uma espécie anisohídrica, capaz de manter sua condutância estomática mesmo diante de um balanço hídrico negativo do solo em todos os períodos de avaliação. A concentração da CE foi maior no mês de fevereiro e seu principal componente foram as cadeias de *n*-alcanos, compostos muito eficientes em manter a impermeabilidade da cutícula e proteger as folhas. O desempenho fotossintético não mostrou alterações ao longo do dia em folhas que tiveram a CE removida, além da manutenção do metabolismo bioquímico, com poucas variações nos diferentes períodos avaliados. Diante disso, *C. flexuosa* possui eficientes mecanismos de adaptação à seca, podendo suportar ambientes ainda mais limitantes, como o previsto para as próximas décadas devido às mudanças climáticas.

Palavras chaves: cutícula; ecofisiologia; escassez hídrica; metabolismo foliar; mudanças climáticas; tolerância à seca.

ABSTRACT

Adaptations and drought tolerance mechanisms are key factors for the survival of plant species in arid or semi-arid climate. It is due to adaptations such as leaf area, depth of roots, maintenance of water status, cuticle thickness and stomatal density these species succeed in this environment. However, given the climate change there is a need of efficiency evaluation of these mechanisms before a further limiting condition. Therefore, our objective was to analyze the main physiological mechanisms of drought tolerance of *Cynophalla flexuosa* (L.) J.Presl., a woody and evergreen specie in a seasonally dry tropical forest, assessing how the leaves epicuticular wax (EW) of this species are efficient before the semiarid conditions in different seasons. The study was conducted in three periods (July 2014, December 2014 and February 2015), throughout the one day in an area of Caatinga, using intact leaves and the EW removed mechanically. We calculated the the hydric balance of the soil and measured leaf water potential, gas exchange, chlorophyll fluorescence, biochemistry and leaf anatomy. It was observed that *C. flexuosa* reduces its leaf water potential at the hottest times, one anisohydric species, able to maintain its stomatal conductance in the face of a negative soil water balance in all evaluation periods, which reduced its xylem potential. The concentration of EW was higher in the month of February and its main component was *n*-alkane chains, very efficient compounds in maintaining a waterproof cuticle and protect the leaves. The photosynthetic performance showed no change throughout the day in leaves that had the EW removed, as well as maintenance the biochemical metabolism, with few variations in different periods. Therefore, *C. flexuosa* has efficient mechanisms of adaptation to drought and can withstand even more limiting environments, as predicted in the coming decades due to climate change.

Key words: climate changes; cuticle; drought tolerance; ecophysiology; leaf metabolism; water deficits.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dados ambientais da área estudada. Balanço hídrico do solo entre janeiro de 2014 e fevereiro de 2015 (A) e umidade do solo (B) referente a indivíduos de *Cynophalla Flexuosa* no município de Serra Talhada, nos meses de junho e novembro de 2014 e janeiro de 2015, histórico anual de precipitação e de temperatura médias no intervalo dos anos de 2009 a 2015 (C), e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) ao longo do dia nos dias de coleta dos meses de julho e dezembro de 2014 e fevereiro de 2015 no município de Serra Talhada, PE, Brasil.....55

Figura 2. Déficit de pressão de vapor (DPV) (A) e potencial hídrico do xilema (ψ_{ramo} , B) de *Cynophalla flexuosa* ao longo do dia nos dias de coleta dos meses de julho e dezembro de 2014 e fevereiro de 2015. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os meses e letras minúsculas indicam diferença entre os horários pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$) ($n = 3 \pm \text{EP}$).....56

Figura 3. Trocas gasosas de *Cynophalla flexuosa*. Temperatura foliar ($^{\circ}\text{C}$, A, B, C), condutância estomática (gs, D, E, F), taxa de assimilação líquida de CO_2 (P_N , G, H, I) e eficiência do uso da água (EUA, J, K, L) de *Cynophalla flexuosa* ao longo do dia nos dias de coleta dos meses de julho e dezembro de 2014 e fevereiro de 2015 de folhas controle e com cera epicuticular (CE) removida. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os meses e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$) ($n = 4 \pm \text{EP}$).....57

Figura 4. Fluorescência da Clorofila a de *Cynophalla flexuosa*. Eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m , A, B, C), eficiência operacional do fotossistema II (F_q'/F_m' , D, E, F), quenching fotoquímico (q_p , G, H, I), quenching não-fotoquímico (NPQ, J, K, L) e taxa de transporte de elétrons (ETR, M, N, O) de *Cynophalla flexuosa* ao longo do dia nos dias de coleta dos meses de julho e dezembro de 2014 e fevereiro de 2015 de folhas controle e com cera epicuticular (CE) removida. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os meses e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$) ($n = 4 \pm \text{EP}$).58

Figura 5. Metabolismo bioquímico de *Cynophalla flexuosa*. Concentrações foliares de açúcares solúveis (AS, A), sacarose (B), frutose (C), aminoácidos livres totais (ALT, D), prolina (E), proteínas solúveis totais (PST, F) em *Cynophalla flexuosa* nos dias de coleta dos meses de julho e dezembro de 2014 e fevereiro de 2015 de folhas controle e com cera epicuticular (CE) removida. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os meses e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$) ($n = 4 \pm \text{EP}$).....59

Figura 6. Metabolismo antioxidativo de *Cynophalla flexuosa*. Concentrações foliares de superóxido dismutase (SOD, A), peróxido de hidrogênio (H₂O₂, B) catalase (CAT, C), aldeído malônico (MDA, D) e ascorbato peroxidase (E) em *Cynophalla flexuosa* nos dias de coleta dos meses de julho e dezembro de 2014 e fevereiro de 2015 de folhas controle e com cera epicuticular (CE) removida. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os meses e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$) ($n = 4 \pm EP$).....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constituintes da cera epicuticular (CE) em folhas controle e sem CE, e porcentagem de CE removida de *Cynophalla flexuosa* coletadas nos meses de julho e dezembro de 2014 e fevereiro de 2015 ($n = 3 \pm EP$).....61

Tabela 2. Atributos anatômicos de folhas de *Cynophalla flexuosa* coletadas nos meses de julho e dezembro de 2014 e fevereiro de 2015. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os meses minúsculas indicam diferença entre as faces ou tipos de parênquima pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$) ($n = 20 \pm EP$).....62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Aminoácidos livres totais
ANOVA	Análise de variância
APX	Ascorbato peroxidase
AS	Açúcares solúveis
CAT	Catalase
CE	Cera epicuticular
CO ₂	Gás carbônico
DPV	Déficit de Pressão de Vapor
EP	Erro Padrão
ETR	Taxa de Transporte de Elétrons
EUA	Eficiência do Uso da Água
FTSS	Floresta Tropical Sazonalmente Seca
F_q'/F_m'	Eficiência operacional do FSII
FSII	Fotossistema II
F_v/F_m	Eficiência quântica máxima do FSII
g_s	Condutância estomática
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
NPQ	Quenching não fotoquímico
q_p	Quenching fotoquímico

MDA Aldeído malônico

P_N Assimilação líquida de CO_2

PST Proteínas solúveis totais

SOD Superóxido dismutase

Ψ_{ramo} Potencial hídrico do xilema

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 FLORESTA TROPICAL SAZONALMENTE SECA.....	15
2.1.1 Caatinga.....	15
2.2 MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO	16
2.2.1 Potencial hídrico do xilema (ψ_{ramo})	16
2.2.2 Metabolismo fotossintético	17
2.2.4 Metabolismo fotoquímico	18
2.2.5 Metabolismo bioquímico e antioxidativo	18
2.2.6 Anatomia foliar	19
2.2.7 Cera epicuticular	20
2.3 ESPÉCIE	21
2.3.1 <i>Cynophalla flexuosa</i> (L.) J.Presl	21
REFERÊNCIAS	22
ARTIGO.....	27
ANEXO - REGRAS DO PERIÓDICO PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY	63

1 APRESENTAÇÃO

Compreender como as espécies de regiões secas são capazes de sobreviver as condições limitantes, como déficit hídrico e radiação elevada, é essencial para identificar quais adaptações e características serão mais importantes e deterministas para um possível cenário de alterações ambientais como se espera acontecer frente aos efeitos das mudanças climáticas. Diante disso, os estudos ecofisiológicos buscam identificar quais os principais mecanismos que são capazes de influenciar o desempenho das espécies em seu ambiente, com seus fatores bióticos e abióticos.

A Caatinga é uma floresta tropical sazonalmente seca encontrada em quase sua totalidade no Nordeste brasileiro, caracterizada por chuvas irregulares, altas temperaturas e intensidade luminosa, sendo normalmente subjugada quanto a necessidade de proteção devido a uma ideia equivocada de que apresenta baixa diversidade. A Caatinga exibe uma grande variedade de espécies que apresentam diferentes estratégias fenológicas, principalmente a caducifolia e a perenifolia. Espécies perenifólias, ou sempre verdes, se apresentam em menor número em regiões secas devido a escassez hídrica e a dificuldade de manter as folhas com a falta de água. Assim, a flora de regiões como esta foi muito pressionada pela natureza no decorrer do tempo evolutivo, principalmente as espécies sempre verdes, que foram “obrigadas” a desenvolver características particularmente eficientes para superar as condições.

Sendo a água essencial para a manutenção da vida das plantas, ambientes muito secos representam um desafio à sobrevivência de muitas espécies. Assim, o desenvolvimento dos estômatos e de uma barreira que evite a perda excessiva de água e que seja capaz de refletir parte da radiação que chega a superfície da folha, são de suma importância para manutenção do processo vital às plantas: a fotossíntese. Os estômatos e a cutícula surgiram como caracteres primordiais para as plantas terrestres, e as ceras epicuticulares, que fazem parte da cutícula são muito importantes para manter as folhas protegidas do ambiente externo. As ceras são capazes de se modificar de acordo com o ambiente, dessa forma uma análise detalhada dessa estrutura, juntamente com a resposta fisiológica dos estômatos, diante da sua remoção em um ambiente seco é capaz de responder perguntas de como a planta está superando o ambiente. É nesta perspectiva que surge esse trabalho, abordando a relação entre a cera epicuticular e o o déficit hídrico uma espécie sempre verde do semiárido.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FLORESTA TROPICAL SAZONALMENTE SECA

As florestas tropicais sazonalmente secas (FTSS) ocorrem em regiões tropicais e são caracterizadas pela sazonalidade pronunciada na distribuição da precipitação, que resulta em vários meses de seca (MOONEY; BULLOCK; MEDINA, 1995). A América do Sul detém mais da metade das FTSS, com 54,2%, que está dividida em duas grandes áreas, uma está localizada no Nordeste brasileiro e outra se encontra no sudeste da Bolívia, Paraguai e norte da Argentina (MILES et al., 2006). Em uma análise de risco realizada por Miles e colaboradores (2006) em FTSS, a América do Sul registrou 37% de ameaça, apenas considerando as mudanças climáticas, devido principalmente pela diminuição da precipitação prevista nos modelos divulgados. Alterações climáticas futuras já são esperadas para os próximos anos, uma vez que o Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC), no ano de 2014, divulgou diferentes cenários que podem ser esperados para regiões de clima semiárido, que apresentam alterações que incluem mudanças na precipitação, elevação de temperaturas e aumento na concentração atmosférica de CO₂ (IPCC, 2014). Segundo informações publicadas pelo Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas (PBMC), regiões semiáridas tenderão a se tornar áridas devido às secas mais prolongadas.

2.1.1 Caatinga

A Caatinga é uma região semiárida, está dentro da classificação de FTSS devido a suas temperatura e precipitação, é caracterizada por diferentes tipos de vegetação e está distribuída em cerca de 735.000 km² dentro do território brasileiro (ALBUQUERQUE et al., 2012). É uma região com altas intensidades luminosas o ano inteiro, dessa forma a temperatura média anual varia em uma faixa entre 25 e 30 °C; a disponibilidade hídrica é bastante variável devido as chuvas irregulares e concentradas entre 3 a 5 meses (300 a 800 mm por ano) com períodos longos de seca (GARIGLIO et al., 2010). Esses fatores ambientais combinados a outros causam o alto índice de evapotranspiração do solo e dos vegetais (SOUZA et al., 2010; TROVÃO et al., 2007), dessa forma a

vegetação da Caatinga desenvolveu diferentes estratégias anatômicas e morfológicas para viver nesse ambiente (TROVÃO et al., 2007).

Sua vegetação é composta de árvores e arbustos xerófilos de clima tropical, podendo ser frondosa com uma copa fechada e baixa ou esparsa e mais aberta, de acordo com a umidade do solo. Porém, a maioria da vegetação geralmente é limitada pelas condições desfavoráveis do ambiente e pela antropização, se mantendo com mais arbustos e árvores com pouco mais de 10 metros de altura. Devido à disponibilidade hídrica limitada que restringe o crescimento das plantas, esse ecossistema é capaz de possuir uma grande diversidade florística e alto grau de endemismo (GARIGLIO et al., 2010). Contudo, raras são as espécies que mantêm suas folhas durante todo ano na Caatinga, devido a alta demanda evaporativa, principalmente no período seco. De acordo com Leal, Tabarelli e Silva (2003), assim, em determinados locais, espécies sempre verdes chegam a compor apenas 18% da estrutura vegetacional, em comparação a 82% de espécies decíduas (LEAL; TABARELLI; SILVA, 2003).

2.2 MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO

A respeito das dificuldades encontradas pelas espécies vegetais em condições severas de um ambiente como a Caatinga, as plantas são capazes de apresentar uma série de adaptações fisiológicas, anatômicas, morfológicas e de história de vida que irão garantir a capacidade das plantas de manter um status hídrico adequado para a sobrevivência e reprodução (RIEDERER; SCHREIBER, 2001). Estas adaptações incluem alterações do potencial xilemático, no metabolismo fotossintético envolvendo a produção de fotoassimilados e suas utilizações, ainda modificações nos metabolismos fotossintético e fotoquímico, e ainda anatomia foliar, dentre outras. Segue abaixo algumas delas.

2.2.1 Potencial hídrico do xilema (ψ_{ramo})

Fatores ambientais como temperatura e umidade do ar, bem como a umidade do solo são determinantes do potencial hídrico do xilema (ψ_{ramo}) das plantas (SANTOS et al., 2014). Através da temperatura e umidade relativa do ar podemos calcular também o

déficit de pressão de vapor (DPV), permitindo avaliar a demanda evaporativa do local, onde os valores em regiões como a Caatinga costuma ser elevado durante boa parte do ano (SANTOS et al., 2014). Diante disso, muitas espécies regulam seu ψ_{ramo} de forma a superar essas condições, tendo os estômatos, papel principal nessa regulação. É possível perceber diferentes comportamentos quanto à manutenção diária do ψ_{ramo} como os comportamentos isohídrico, onde algumas espécies mantem o ψ_{ramo} em níveis mais altos mesmo nas horas mais quentes do dia, e o anisohídrico, onde o ψ_{ramo} cai nas horas mais quentes do dia, permitindo maior captação de água permitindo a manutenção de uma alta gs (PANTIN et al., 2013).

2.2.2 Metabolismo fotossintético

Ao longo do tempo, as plantas terrestres desenvolveram muitas adaptações para se manter fora da água e os estômatos e a cutícula são as peças fundamentais para toda resposta de trocas gasosas entre a planta e a atmosfera, considerado os maiores responsáveis pelo controle dos processos vitais da planta (RODRIGUES et al., 2011). A condutância estomática se relaciona diretamente com a intensidade luminosa e o grau de hidratação foliar, dependendo também da interação da planta com os fatores ambientais como, por exemplo, a temperatura e o déficit de pressão de vapor (DPV) (COSTA; MARENCO, 2007; RODRIGUES et al., 2011). O DPV é a causa e a consequência do movimento de água através da planta (TARDIEU; SIMONNEAU, 1998). Kallarackal e Somen (1997) relatam que há maior condutância estomática pela manhã, quando o DPV e a radiação solar estão em níveis menores. Assim, a condutância estomática, moldada de acordo com as atuais condições ambientais, é uma estratégia evolutiva das plantas para maximizar sua eficiência do uso da água, controlando a transpiração simultânea e a absorção de CO_2 , bem como definindo sua estratégia de sobrevivência (RODRIGUES et al., 2011). Quando se trata do processo fotossintético, o déficit hídrico combinado com elevada temperatura e radiação, mais proeminentes nos períodos secos de regiões sazonais, provocam a diminuição nas trocas gasosas (SANTOS et al., 2014); uma redução na condutância estomática e assimilação de CO_2 , por exemplo, permite que as plantas mantenham em funcionamento seu metabolismo na época mais severa, evitando a perda de água por transpiração diante de sua escassez (FRANKS; BEERLING, 2009).

2.2.4 Metabolismo fotoquímico

O princípio subjacente ao uso da fluorescência da clorofila como um indicador do estado fisiológico das plantas é relativamente simples. Energia luminosa absorvida excita moléculas de clorofila e a excitação desta energia é alcançada principalmente através de três processos concorrentes: fotoquímica (quenching fotoquímico, q_p), perda radiativa de fótons ou dissipação de energia térmica não-radiativa (quenching não fotoquímico, NPQ) (CENDRERO-MATEO et al., 2015).

Quando em condições de luz excessiva, a atividade fotoquímica será diminuída a fim de minimizar impactos ao fotossistema II devido a abundância de energia (RIBEIRO et al., 2009). Essa análise pode ser realizada através da observação de parâmetros como o F_v/F_m e o F_q'/F_m' que são bons indicadores da capacidade fotossintética. O F_v/F_m por exemplo, reflete a eficiência quântica potencial do FSII e costuma ser utilizado como indicativo do desempenho fotossintético da planta (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Este parâmetro tem valores ideais em torno de 0,8, valores mais baixos indicam estresse por fotoinibição (BJÖRKMAN; DEMMIG, 1987). O F_q'/F_m' é um método rápido para explicar a eficiência operacional do fotossistema II sob diferentes condições de luz e outros fatores ambientais; o F_q'/F_m' ainda é utilizado para calcular a taxa de transporte de elétrons (ETR) que é direcionada para a fotossíntese (BAKER, 2008). O quenching não fotoquímico (NPQ) costuma aumentar durante o estresse hídrico, o que indica que a atividade de processos fotoprotetores, como dissipação térmica, aumenta nessa situação (BALAGUER et al., 2002; FLECK et al., 1998).

2.2.5 Metabolismo bioquímico e antioxidativo

O estresse hídrico, combinado com alta temperatura e radiação pode provocar alterações no metabolismo bioquímico, interferindo na produção e armazenamento dos compostos da planta, como diminuição dos açúcares e das proteínas solúveis combinados com o aumento dos aminoácidos livres totais para manutenção do turgor nas células (ARCOVERDE et al., 2011; RIVAS; OLIVEIRA; SANTOS, 2013). Os pigmentos também apresentam papel importante diante do aumento da luminosidade, elevando o conteúdo de clorofilas totais e carotenoides para alcançar maiores taxas

162 fotossintéticas, contudo, é importante ressaltar que um aumento excessivo da radiação
163 também pode provocar a degradação desses pigmentos (ALMEIDA et al., 2004;
164 ARCOVERDE et al., 2011)

165 A escassez hídrica também ocasiona o acúmulo de espécies reativas de oxigênio
166 (EROs) como superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e formas
167 reduzidas de superóxido (O_2^-), onde resulta em estresse oxidativo (SHARMA; DUBEY,
168 2005; TALBI et al., 2015). Ainda é possível que o desequilíbrio causado pelo estresse
169 oxidativo cause danos celulares que afetarão as membranas celulares, as proteínas,
170 clorofilas, carboidratos e atividade da catalase (CAT) (BLOKHINA, 2003;
171 HALLIWELL; GUTTERINGE, 2007). Diante da peroxidação lipídica, o aldeído
172 malônico (MDA) aumenta, caracterizando dano à membrana celular, principalmente em
173 épocas mais secas (OLIVEIRA et al., 2014). A superóxido dismutase (SOD) é uma
174 importante enzima no combate as EROs, apresentando uma rápida resposta ao déficit
175 hídrico (TALBI et al., 2015). As plantas que vivem em ambientes extremos são bons
176 modelos para os estudos dos mecanismos para a tolerância de restrição hídrica (TALBI
177 et al., 2015).

179 2.2.6 Anatomia foliar 180

181 Os fatores ambientais são capazes de moldar a fisiologia das espécies vegetais, e
182 isso pode acontecer em curto, médio ou longo prazo. No caso da estrutura anatômica,
183 ela pode se modificar em resposta a uma alteração ambiental mais demorada ou ainda,
184 uma única planta é capaz de alternar a conformação de suas folhas de acordo com o
185 período do ano, como por exemplo, as espécies sazonais. A estrutura formada tem por
186 objetivo melhorar o aparato fotossintético, no aproveitamento da captação de luz, por
187 exemplo (MARTINS et al., 2009). As espécies podem também diminuir a área foliar e
188 aumentar a espessura foliar, a fim de reduzir a superfície de contato da folha diante da
189 radiação em locais com muita intensidade luminosa, evitando danos ao aparato
190 fotossintético. Mesmo com um controle estomático maior em época de seca, a
191 densidade e tamanho dos estômatos podem variar com o ambiente para um melhor
192 ajuste à condição (FRANKS; BEERLING, 2009).

2.2.7 Cera epicuticular

Dentre as adaptações que permitem que as plantas sobrevivam em ambientes adversos, cutícula e estômatos são os principais responsáveis pela manutenção do status hídrico foliar da planta. Juntos, eles formam um sistema integrado de funções estruturais e fisiológicas que otimiza a atividade fotossintética e as trocas gasosas como um todo (OLIVEIRA; MEIRELLES; SALATINO, 2003; RIEDERER; SCHREIBER, 2001). A cutícula auxilia os estômatos nesse desafio de controlar a perda de água para a atmosfera e representa a principal barreira contra a perda de água nas folhas por um controle não estomático (FIGUEIREDO et al., 2012). Ao mesmo tempo, permite a entrada de radiação na folha e, assim, a realização da fotossíntese, pois é responsável pela absorção inicial da radiação que incidente na superfície foliar (GRANT et al., 2003).

A cutícula é uma membrana que é composta por uma matriz de polímeros insolúvel (cutina) associada a lipídeos solventes-solúveis, que são as ceras cuticulares. Por sua vez, as ceras são divididas em cera epicuticular, que cobre a superfície externa, e a cera intracuticular, que está imersa na matriz de cutina (LEIDE et al., 2011). Os componentes químicos e a forma da cera na superfície foliar são muito importantes para a compreensão de como ocorre a interação da planta com o seu ambiente biótico e abiótico e, assim, a sua fisiologia específica e as funções ecológicas (MAARSEVEEN; JETTER, 2009; YIN et al., 2011). As ceras são caracterizadas, principalmente, por apresentarem uma complexa mistura de compostos alifáticos com diferentes grupos funcionais, como ácidos alconóicos, alcanos, aldeídos, alcanóis e outros (LEIDE et al., 2011). Em muitas espécies, há uma camada relativamente fina e macia de cera epicuticular, mas em outras, a cera tem formato de cristais salientes que deixam a superfície foliar microscopicamente rígida (WEN; BUSCHHAUS; JETTER, 2006). Com uma alta radiação, como em ambientes árido e semiárido, as folhas podem desenvolver uma cutícula mais cerosa que permita uma maior reflectância, aumentando a fotoproteção quando há excesso de luz (ROBINSON; LOVELOCK; OSMOND, 1993). A temperatura também afeta a deposição de cera na superfície epidérmica foliar, onde no verão a deposição de cera aumenta, sugerindo uma função que se relaciona à temperatura, evitando a perda de água e promovendo a fotoproteção (MOHAMMADIAN; WATLING; HILL, 2007; NI; XIA; LI, 2014). O sistema de fotoproteção da cera epicuticular controla o grau de difusão e reflexão, e torna tolerável

a intensidade de radiação que alcança o fotossistema ativo no mesofilo (RIEDERER, 2006), diminuindo o risco de fotooxidação dos centros de reação causado pelo excesso de luz (ROBINSON; LOVELOCK; OSMOND, 1993).

2.3 ESPÉCIE ESTUDADA

2.3.1 *Cynophalla flexuosa* (L.) J.Presl

Cynophalla flexuosa, anteriormente conhecida como *Capparis flexuosa* L., pertence à família Capparaceae e possui um porte arbustivo-arbóreo. Também conhecida como feijão-bravo, é nativa do Brasil e se desenvolve no semiárido nordestino e em outras áreas. Os indivíduos podem medir de 2-5 metros de altura e servem de alimento para animais no período de estiagem (ALMEIDA NETO et al., 2011). É uma espécie sempre verde da Caatinga e tem sua produção vegetativa durante a estação seca, possuindo uma alta eficiência do uso da água nessa época, sendo, dessa forma, relativamente pouco dependente do ciclo de chuvas (FABRICANTE; ANDRADE; OLIVEIRA, 2009; SANTOS et al., 2014). O sistema radicular das espécies da família Capparaceae é profundo e elas têm estratégias adaptativas para lugares áridos, como estruturas de armazenamento de água, diminuição da área foliar específica e alta densidade de madeira (LIMA; RODAL, 2010; SOBRADO; CUENCA, 1979). Além disso, *C. flexuosa* apresenta cutícula espessa que, segundo Torrecilla; Castro; Lapp (2008), é uma característica que pode estar associada à condição perene da espécie, uma vez que uma cutícula altamente desenvolvida fornecerá resistência mecânica durante a estação seca.

REFERÊNCIAS

- 252
253
- 254 ALBUQUERQUE, U. P. et al. Caatinga Revisited: Ecology and Conservation of an
255 Important Seasonal Dry Forest. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–18, 2012.
- 256 ALMEIDA, L. P. DE et al. Crescimento inicial de plantas de *Cryptocaria*
257 *aschersoniana* Mez. submetidas a níveis de radiação solar. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1,
258 p. 83–88, 2004.
- 259 ALMEIDA NETO, J. et al. Crescimento e bromatologia do feijão-bravo (*Capparis*
260 *flexuosa* L.) em área de Caatinga no Curimataú paraibano, Brasil. **Revista Ciência**
261 **Agrônômica**, v. 42, n. 2, p. 488–494, 2011.
- 262 ARCOVERDE, G. B. et al. Water relations and some aspects of leaf metabolism of
263 *Jatropha curcas* young plants under two water deficit levels and recovery. **Brazilian**
264 **Society of Plant Physiology**, v. 23, n. 2, p. 123–130, 2011.
- 265 BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. **Annual**
266 **Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 89–113, 2008.
- 267 BALAGUER, L. et al. Ecophysiological significance of chlorophyll loss and reduced
268 photochemical efficiency under extreme aridity in. **Plant and Soil**, v. 240, n. 2, p. 343–
269 352, 2002.
- 270 BJÖRKMAN, O.; DEMMIG, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll
271 fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, v.
272 170, n. 4, p. 489–504, 1987.
- 273 BLOKHINA, O. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a
274 Review. **Annals of Botany**, v. 91, n. 2, p. 179–194, 2003.
- 275 CENDRERO-MATEO, M. P. et al. Dynamic response of plant chlorophyll fluorescence
276 to light, water and nutrient availability. **Functional Plant Biology**, v. 42, p. 746–757,
277 2015.
- 278 COSTA, G. F. DA; MARENCO, R. A. Fotossíntese, condutância estomática e potencial
279 hídrico foliar em árvores jovens de andiroba (*Carapa guianensis*). **Acta Amazonica**, v.
280 37, n. 2, p. 229–234, 2007.

- 281 FABRICANTE, J. R.; ANDRADE, L. A.; OLIVEIRA, L. S. B. Fenologia de *Capparis*
 282 *flexuosa* L. (Capparaceae) no Cariri Paraibano. **Revista Brasileira de Ciências**
 283 **Agrárias**, v. 4, n. 2, p. 133–139, 2009.
- 284 FIGUEIREDO, K. V. et al. Epicuticular-wax removal influences gas exchange and
 285 water relations in the leaves of an exotic and native species from a Brazilian semiarid
 286 region under induced drought stress. **Australian Journal of Botany**, v. 60, n. 8, p. 685,
 287 2012.
- 288 FLECK, I. et al. Photosynthesis and photoprotection in *Quercus ilex* resprouts after fire.
 289 **Tree physiology**, v. 18, n. 8-9, p. 607–614, 1998.
- 290 FRANKS, P. J.; BEERLING, D. J. Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects
 291 on stomatal size and density over geologic time. **Proceedings of the National**
 292 **Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 25, p. 10343–10347,
 293 2009.
- 294 GARIGLIO, M. et al. **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da**
 295 **Caatinga**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Serviço Florestal Brasileiro, 2010.
- 296 GRANT, R. H. et al. Ultraviolet leaf reflectance of common urban trees and the
 297 prediction of reflectance from leaf surface characteristics. **Agricultural and Forest**
 298 **Meteorology**, v. 120, n. 1-4, p. 127–139, 2003.
- 299 HALLIWELL, B.; GUTTERINGE, J. M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4.
 300 ed. Oxford: Clarendon Press, Oxford, UK, 2007.
- 301 IPCC, 2014. **Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part**
 302 **B: Regional Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment**
 303 **Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. [BARROS, V.R., C.B.
 304 FIELD, D.J. DOKKEN, M.D. MASTRANDREA, K.J. MACH, T.E. BILIR, M.
 305 CHATTERJEE, K.L. EBI, Y.O. ESTRADA, R.C. GENOVA, B. GIRMA, E.S.
 306 KISSEL, A.N. LEVY, S. MACCRACKEN, P.R. MASTRANDREA, AND L.L.
 307 WHITE (eds.)].: Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New
 308 York, NY, USA, 2014.
- 309 KALLARACKAL, J.; SOMEN, C. K. An ecophysiological evaluation of the suitability
 310 of *Eucalyptus grandis* for planting in the tropics. **Forest Ecology and Management**, v.

- 311 95, n. 1, p. 53–61, 1997.
- 312 LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e Conservação da**
 313 **Caatinga**. Recife: Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife,
 314 Brasil, 2003.
- 315 LEIDE, J. et al. The positional sterile (ps) mutation affects cuticular transpiration and
 316 wax biosynthesis of tomato fruits. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 9, p. 871–
 317 877, 2011.
- 318 LIMA, A. L. A.; RODAL, M. J. N. Phenology and wood density of plants growing in
 319 the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 74, n.
 320 11, p. 1363–1373, 2010.
- 321 MAARSEVEEN, VAN C.; JETTER, R. Composition of the epicuticular and
 322 intracuticular wax layers on *Kalanchoe daigremontiana* (Hamet et Perr. de la Bathie)
 323 leaves. **Phytochemistry**, v. 70, n. 7, p. 899–906, 2009.
- 324 MARTINS, J. R. et al. Anatomia foliar de plantas de alfavaca-cravo cultivadas sob
 325 malhas coloridas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 82–87, 2009.
- 326 MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence-a practical guide.
 327 **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000.
- 328 MILES, L. et al. A global overview of the conservation status of tropical dry forests.
 329 **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 3, p. 491–505, 2006.
- 330 MOHAMMADIAN, M. A.; WATLING, J. R.; HILL, R. S. The impact of epicuticular
 331 wax on gas-exchange and photoinhibition in *Leucadendron lanigerum* (Proteaceae).
 332 **Acta Oecologica**, v. 31, n. 1, p. 93–101, 2007.
- 333 MOONEY, H. A.; BULLOCK, S. H.; MEDINA, E. Introduction. In: BULLOCK, S. H.;
 334 MOONEY, H. A.; MEDINA, E. (Eds.). **Seasonally dry tropical forests**. Cambridge:
 335 Cambridge University Press, Cambridge, 1995. p. 1–8.
- 336 NI, Y.; XIA, R.; LI, J. Changes of epicuticular wax induced by enhanced UV-B
 337 radiation impact on gas exchange in *Brassica napus*. **Acta Physiologiae Plantarum**, p.
 338 2481–2490, 2014.

- 339 OLIVEIRA, A. F. M.; MEIRELLES, S. T.; SALATINO, A. Epicuticular waxes from
340 Caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss. **Anais da**
341 **Academia Brasileira de Ciencias**, v. 75, p. 431–439, 2003.
- 342 OLIVEIRA, M. T. et al. Stress tolerance and ecophysiological ability of an invader and
343 a native species in a seasonally dry tropical forest. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105514,
344 2014.
- 345 PANTIN, F. et al. The dual effect of abscisic acid on stomata. **New Phytologist**, v. 197,
346 n. 1, p. 65–72, 2013.
- 347 RIBEIRO, R. V. et al. Seasonal and diurnal changes in photosynthetic limitation of
348 young sweet orange trees. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, n. 2, p.
349 203–211, 2009.
- 350 RIEDERER, M. Biology of the Plant Cuticle. In: RIEDERER, M.; MÜLLER, C. (Eds.).
351 Germany: Blackwell Publishing Ltd Editorial, 2006. p. 462.
- 352 RIEDERER, M.; SCHREIBER, L. Protecting against water loss: analysis of the barrier
353 properties of plant cuticles. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 363, p. 2023–
354 2032, 2001.
- 355 RIVAS, R.; OLIVEIRA, M. T.; SANTOS, M. G. Three cycles of water deficit from
356 seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance.
357 **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 63, p. 200–208, 2013.
- 358 ROBINSON, S.; LOVELOCK, C.; OSMOND, C. Wax as a mechanism for protection
359 against photoinhibition - A study of *Cotyledon orbiculata*. **Botanica Acta**, v. 106, n. 4,
360 p. 307–312, 1993.
- 361 RODRIGUES, H. J. B. et al. Variabilidade sazonal da condutância estomática em um
362 ecossistema de manguezal amazônico e suas relações com variáveis meteorológicas.
363 **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 26, n. 2, p. 189–196, 2011.
- 364 SANTOS, M. G. et al. Caatinga, the Brazilian dry tropical forest: can it tolerate climate
365 changes? **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 83–99, 2014.
- 366 SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Drought induces oxidative stress and enhances the
367 activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Growth Regulation**,

- 368 v. 46, p. 209–221, 2005.
- 369 SOBRADO, M.; CUENCA, G. Aspectos del uso de agua de especies deciduas y
370 siempreverdes en un bosque seco tropical de Venezuela. **Acta Científica Venezolana**,
371 v. 30, p. 302–308, 1979.
- 372 SOUZA, B. D. et al. Water relations and chlorophyll fluorescence responses of two
373 leguminous trees from the Caatinga to different watering regimes. **Acta Physiologiae**
374 **Plantarum**, v. 32, n. 2, p. 235–244, 2010.
- 375 TALBI, S. et al. Drought tolerance in a Saharian plant *Oudneya africana*: Role of
376 antioxidant defences. **Environmental and Experimental Botany**, v. 111, p. 114–126,
377 2015.
- 378 TARDIEU, F.; SIMONNEAU, T. Variability among species of stomatal control under
379 fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and
380 anisohydric behaviours. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. Special, p. 419–
381 432, 1998.
- 382 TORRECILLA, P.; CASTRO, M.; LAPP, M. Morfoanatomía Foliar En Especímenes
383 Creciendo En Tres Localidades. **ERNSTIA**, v. 19, n. 1, p. 35–54, 2008.
- 384 TROVÃO, D. M. D. B. M. et al. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies
385 da Caatinga. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 83, p.
386 307–311, 2007.
- 387 WEN, M.; BUSCHHAUS, C.; JETTER, R. Nanotubules on plant surfaces: chemical
388 composition of epicuticular wax crystals on needles of *Taxus baccata* L.
389 **Phytochemistry**, v. 67, n. 16, p. 1808–1817, 2006.
- 390 YIN, Y. et al. Chemical composition and antifungal activity of cuticular wax isolated
391 from Asian pear fruit (cv. Pingguoli). **Scientia Horticulturae**, v. 129, n. 4, p. 577–582,
392 2011.

ARTIGO

Dinâmica da concentração da cera epicuticular e disponibilidade hídrica sobre o metabolismo fotossintético foliar de uma espécie lenhosa e sempre verde do semiárido

Silvia C. F. Pereira ^a, Karla V. Figueiredo ^a, Antônio Fernando M. Oliveira ^a, Mauro Guida dos Santos ^{a,*}

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Recife, PE 50670-901, Brasil

Abreviações: ALT, aminoácidos livres totais; APX, ascorbato peroxidase; AS, açúcares solúveis; CAT, catalase; CE, cera epicuticular; DPV, déficit de pressão de vapor; ETR, taxa de transporte de elétrons; EUA, eficiência do uso da água; FSII, fotossistema II; F_q'/F_m' , eficiência operacional do FSII; FTSS, floresta tropical sazonalmente seca; F_v/F_m , eficiência quântica máxima do FSII; gs, condutância estomática; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; NPQ, quenching não fotoquímico; q_p , quenching fotoquímico; MDA, aldeído malônico; P_N , assimilação líquida de CO_2 ; PST, proteínas solúveis totais; SOD, superóxido dismutase.

*Corresponding author; phone: +55 81 21268844, fax: +55 81 21267803, e-mail: mauro.gsantos@ufpe.br

Resumo

Ceras epicuticulares (CE) tem um importante papel na fisiologia das plantas, sendo uma eficiente barreira protetora e efetivo fator de adaptação a estresses abióticos, principalmente em espécies de regiões secas. Assim, esse trabalho objetivou caracterizar o desempenho ecofisiológico de *Cynophalla flexuosa* (L.) J.Presl., espécie sempre verde, avaliando o papel da CE na manutenção das trocas gasosas, status hídrico foliar, metabolismo bioquímico e fotoprotetor em diferentes períodos do ano. O trabalho foi realizado em três períodos (julho/2014, dezembro/2014 e fevereiro/2015), ao longo do dia numa área de Caatinga onde foram analisadas folhas intactas e com a CE removida mecanicamente. Essa espécie reduziu consideravelmente seu potencial hídrico do xilema nos horários mais quentes, sendo caracterizada como uma espécie anisohídrica, capaz de manter sua condutância estomática mesmo diante de um balanço hídrico do solo negativo. A concentração de CE foi maior no mês de fevereiro e seu principal componente foram cadeias de *n*-alcanos. *C. flexuosa* não alterou seu desempenho fotossintético ao longo do dia, em folhas que tiveram CE removida. Também manteve seu metabolismo bioquímico com poucas variações nos diferentes períodos. É provável que, para esta espécie, sua adaptação ao clima semiárido, com maior investimento em CE de *n*-alcanos de cadeia longa, que são eficientes em manter a impermeabilidade da cutícula, e o seu comportamento anisohídrico, proporcionem uma maior tolerância à incidência luminosa intensa e à deficiência hídrica prolongada.

Palavras chaves: cutícula; déficit hídrico; ecofisiologia; metabolismo foliar; mudanças climáticas; tolerância à seca.

Abstract

Epicuticular waxes (EW) plays an important role in plant physiology, with an efficient protective barrier and an effective adaptation factor to abiotic stress, particularly in species of dry regions. Thus, this study aimed to characterize the ecophysiological performance of *Cynophalla flexuosa* (L.) J.Presl., evergreen specie, evaluating the role of the EW in maintenance of gas exchange, leaf water status, biochemical metabolism and sunscreen at different times of year. The study was conducted in three periods (July/2014 December/2014 and February/2015), throughout the one day in a Caatinga area where were analyzed intact leaves and the EW removed mechanically. This specie has considerably reduce its water potential of the xylem in the hottest hours, being characterized as a anisohydric species, able to maintain its stomatal conductance even facing a negative water balance of the soil. The concentration of EW was higher in February and its main component was *n-alkane* chains. *C. flexuosa* did not alter its photosynthetic performance throughout the day, in leaves that had the EW removed. It also maintained its biochemical metabolism with little variation in different periods. It is likely that, for this specie, its adaptation to semi-arid climate, with greater investment in EW *n-alkane* long chain, which are effective in keeping the impermeability of cuticle, and its anisohydric behavior, provide greater tolerance to intense light incidence and to prolonged drought.

Key words: climate changes; cuticle; drought tolerance; ecophysiology; leaf metabolism; water deficits.

1. Introdução

Nas últimas décadas, áreas de clima semiárido tem recebido mais atenção devido as previsões do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) destacarem, em um cenário pessimista, a ocorrência de eventos de seca mais frequentes e duradouros e aumento de até 4,5° C na temperatura média até 2050, podendo afetar a resiliência da vegetação dessas regiões.

A Caatinga, localizada na região semiárida, é uma floresta tropical sazonalmente seca (FTSS) que ocupa grande parte do Nordeste brasileiro (Gariglio et al., 2010). As espécies que vivem nessas regiões foram capazes de se adaptar às condições locais, que permitiram às plantas se desenvolverem em ambientes adversos para manutenção do status hídrico e a consequente sobrevivência e reprodução durante os períodos de baixa disponibilidade hídrica, incluindo adaptações fisiológicas, anatômicas e morfológicas. Na parte aérea, entre essas características a cutícula surgiu como um importante fator adaptativo, onde localizam-se as ceras epicuticulares (CE) como uma camada mais externa, desempenhando um importante papel na fisiologia e ecologia das plantas, sendo a principal interface entre a epiderme e a atmosfera (Figueiredo et al., 2012). Além de ser uma eficiente barreira protetora, pois reduz a infecção por patógenos e atua controlando a perda de água, íons e nutrientes (Guhling et al., 2005), também atuam diante de estresses ambientais, incluindo seca e alta irradiância (Riederer e Schreiber 2001). As CE controlam o grau de difusão e reflexão, e torna tolerável a intensidade de radiação que alcança o fotossistema ativo no mesófilo (Riederer 2006).

Diante da escassez hídrica e da radiação intensa, condições comuns na Caatinga, a deposição e composição da CE também sofrem mudanças a fim de controlar a perda de vapor de água e manter a eficiência do uso da água (Riederer 2006), também diminuir o risco de foto-oxidação dos centros de reação causado pelo excesso de luz (Robinson et

al., 1993). Baixa disponibilidade hídrica e alta radiação, fatores abióticos típicos do semiárido, levam a mudanças da anatomia foliar, redução da atividade fotoquímica das plantas e o aumento dos processos fotoprotetores, tal como a dissipação térmica (Fleck et al., 1998). As trocas gasosas são afetadas reduzindo a condutância estomática e consequentemente a assimilação líquida de CO₂ (Santos et al., 2014), e tudo isso pode causar um desequilíbrio no metabolismo bioquímico das plantas provocando estresse oxidativo, que irá resultar em danos celulares (Blokhina et al., 2003). Portanto, a habilidade das espécies em ajustarem seu metabolismo para manutenção de alta performance diante dos diferentes ambientes.

O importante papel da cutícula sobre o bom funcionamento do aparato fotossintético e manutenção da fotossíntese justificam estudos relacionados sob condições de campo em plantas nativas de FTSS. Dos estudos envolvendo ecofisiologia de espécies lenhosas florestais, a maior parte é sobre floresta tropical úmida, dos poucos trabalhos realizados a minoria ocorreu sob condições de campo (Santos et al., 2014). Dessa forma, se as previsões de secas mais prolongadas e temperatura média ainda maior em ambientes semiáridos se confirmarem, a habilidade de tolerar estas condições será fundamental para a sobrevivência das espécies. Também é importante ressaltar que quando tratamos de um ambiente sazonal percebemos que a maioria das espécies lenhosas apresentam hábito caducifólio no período de seca, poucas são as espécies sempre verdes que conseguem atravessar seis a oito meses sem precipitação mantendo suas folhas. Dessa forma, o principal objetivo deste estudo foi avaliar o papel da cera epicuticular na manutenção do metabolismo fotossintético e bioquímico foliar sob a influência da disponibilidade hídrica em condições de campo na Caatinga em espécie lenhosa tropical e sempre verde *Cynophalla flexuosa* (L.) J.Presl. Por ser uma espécie

sempre verde, nós hipotetizamos que a cera epicuticular se apresenta de forma diferente dependendo da época do ano, se moldando ao ambiente.

2. Material e métodos

2.1 Material vegetal e local de estudo: Foi escolhida como modelo para o estudo a espécie lenhosa sempre verde *Cynophalla flexuosa* (L.) J.Presl. (Capparaceae), nativa do Brasil, que possui hábito arbustivo-arbóreo e se desenvolve no semiárido nordestino.

O estudo foi desenvolvido em uma região semiárida no nordeste brasileiro 7°55'36.91"S e 38°29'72.31"W, a uma altitude de 511 metros em uma área de Caatinga aberta, na cidade de Serra Talhada a cerca de 450 km de Recife. O clima da região é do tipo Bsh, de acordo com a classificação de Köppen, com uma estação chuvosa de janeiro a maio, uma estação seca de junho a dezembro e precipitação média anual em torno de 750 mm e os tipos de solos predominantes da área são os Neossolos Litólicos e Luvissolos.

Foram marcados no início do estudo quatro indivíduos adultos diferentes com aproximadamente três metros de altura e localizados na mesma mancha de solo. As amostragens foram realizadas nos meses de julho e dezembro de 2014 e fevereiro de 2015, a fim de avaliar diferentes épocas do ano. Dessa forma, de acordo com a série histórica de precipitação (Fig. 1) as medidas foram planejadas para ocorrerem no período de transição da estação chuvosa para a seca (julho), durante a estação seca (dezembro) e durante a estação chuvosa (fevereiro).

Nos indivíduos foram analisadas as folhas intactas, totalmente expandidas, com cera e com a cera removida, ambas estavam localizadas no mesmo ramo lado a lado ou alternadamente, ou seja, apresentando as mesmas condições físicas.

2.2 Umidade do solo e potencial hídrico do xilema (ψ_{ramo}): Para medir a umidade do solo foram coletadas amostras de solo representativas de cada indivíduo numa profundidade de 20 cm. O solo foi pesado quando úmido e depois colocado em estufa a 60 °C até atingir peso constante e então foi pesado novamente. A umidade foi dada pela diferença entre o peso do solo úmido pelo seco.

A medida de potencial hídrico do xilema (ψ_{ramo}) foi realizada para verificação do *status* hídrico das plantas, através da câmara de pressão Schölander, em três plantas por tratamento ao longo do dia, às 4, 10, 13, 16 e 18 horas.

2.3 Remoção da cera epicuticular (CE): A CE das folhas foi removida por aplicação de uma solução de goma arábica (1,5 g. mL⁻¹) em dez folhas completamente expandidas de produção recente, porém maduras, de diferentes ramos. Uma fina camada da solução foi aplicada na face da folha mais exposta ao sol (face adaxial), numa razão de 0,1 mL cm⁻², com auxílio de um pincel. Após pelo menos uma hora e secagem total da goma, a mesma foi removida, de acordo com a metodologia proposta por Jetter e Schäfer (2001). As medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a foram realizadas 48 horas após a remoção da CE das folhas.

2.4 Trocas gasosas: Nas medidas de trocas gasosas foram mensuradas a assimilação líquida de CO₂ (P_N), condutância estomática (g_s) e eficiência do uso da água (EUA), obtida pela relação de P_N/E (E – transpiração), com o analisador de gases do infravermelho (IRGA) (ADC, modelo LCI, Hoddesdon, UK) em folhas controle e com CE removida completamente expandidas e do mesmo ramo. As medidas foram feitas em um dia de cada mês de coleta ao durante o dia inteiro com intervalos de duas horas, tendo início às 6 h e término às 18:00 h, em quatro indivíduos de *C. flexuosa*. Também foi medida a temperatura foliar de forma simultânea em todas as folhas utilizadas nas

medidas de trocas gasosas com auxílio de um termômetro por infravermelho, posicionando a 30 cm da folha.

2.5 Fluorescência da clorofila a: As análises foram processadas em duas folhas completamente expandida e sadias, controle e sem CE, com auxílio do Fluorômetro FluorPen modelo FP100. Foram feitas medidas de fluorescência de clorofila *a* do claro e do escuro, onde, para a obtenção da última, as folhas foram pinçadas com um clip de adaptação ao escuro, por um período mínimo de 30 minutos. Foram abordados os parâmetros de eficiência operacional do FSII (F_q'/F_m'), eficiência quântica máxima do FSII (F_v/F_m), quenching fotoquímico (q_p), quenching não fotoquímico (NPQ) e taxa de transporte de elétrons (ETR), de acordo com Maxwell e Johnson (2000). As medidas foram feitas simultaneamente às medidas de trocas gasosas, em intervalos de duas horas em folhas do mesmo ramo que as folhas utilizadas nas trocas gasosas.

2.6 Análises bioquímicas e de avaliação do estresse oxidativo: Foram coletadas folhas controle e sem CE dos quatro indivíduos. As folhas coletadas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer à temperatura de -80 °C.

Foram determinados açúcares solúveis (AS) (Dubois et al., 1956), açúcares fracionados (sacarose e frutose) (Handel 1968, Foreman et al., 1973), aminoácidos livres totais (ALT) (Moore e Stein 1948), prolina (Bates et al., 1973), proteínas solúveis totais (PST) (Bradford 1976), clorofilas *a* e *b* (Chl*a* e Chl*b*), e carotenóides (Lichtenthaler 1987). Para as análises de açúcares solúveis, sacarose, frutose e aminoácidos foram obtidos extrato etanólico da folha utilizando etanol a 80% (Trethwey et al., 1998, Robbins e Pharr 1988). O padrão para a construção da curva foi glicose anidrida 180 $\mu\text{g ml}^{-1}$, sendo a leitura da absorbância feita a 490nm.

Foram analisados também os principais compostos do ciclo antioxidativo das folhas controle e sem CE, determinando a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD EC 1.15.1.1) (Giannopolitis e Reis 1977), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) e catalase (CAT, EC 1.11.1.6) (Nakano e Asada 1981). As atividades da CAT e da APX foram determinadas pela decomposição de H_2O_2 e ascorbato, respectivamente, por espectrofotômetro com delta absorbância em 1 minuto. E para verificar a peroxidação lipídica de membrana plasmática foi avaliada a acumulação de aldeído malônico (MDA) e a espécie reativa de oxigênio (ROS), H_2O_2 , na folha seguindo metodologia descrita por Cakmak e Horst (1991) e Alixieva et al., (2001), respectivamente. Para o cálculo da concentração do MDA foi utilizado o coeficiente de extinção molar ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Todas as análises foram determinadas com espectrofotômetro modelo Genesys 10s UV – Vis da marca Thermo Scientific, ajustado ao comprimento de onda específico para cada composto orgânico.

2.7 Extração e análise cromatográfica da CE: Duas folhas com e sem CE dos quatro indivíduos foram coletadas e submetidas a três extrações sucessivas com clorofórmio durante 30 segundos em uma área delimitada de $1,13 \text{ cm}^2$. A composição química e a quantidade de ceras cuticulares extraída foi medida por cromatografia gasosa (GC), com injeção direta na coluna (ZB-5HT 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). A temperatura do forno foi programada a $150^\circ \text{C}/3 \text{ min}$, aumentando $10^\circ \text{C} / \text{min}$ até 280°C e mantida a 280°C durante 34 min. As temperaturas de injetor e do detector foram de 250°C e 290°C , respectivamente. Utilizou-se hélio como o gás de arraste com uma velocidade de fluxo de 1 ml/min. Antes das análises, um padrão interno de *n*-tetracosano (C24) foi adicionado a cada amostra diretamente após a extração. A reação foi derivada com N,N-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (BSTFA) em piridina (30 min a 70°C). Os compostos da CE foram identificados por cromatografia gasosa com espectrometria de

massas (GC-MS; Thermo Scientific, Trace 1300, ISQ - single quadrupole MS, 70 eV). O teor médio de CE foi calculado pela razão entre a quantidade de CE obtida (μg) e área foliar (cm^2) e expresso $\mu\text{g cm}^{-2}$. É importante ressaltar que a CE removida por este método não garante a remoção total da CE em todos os casos, dessa forma trabalhamos com a remoção parcial da CE.

2.8 Análises anatômicas: Foram coletadas duas folhas de produção recente, porém maduras, para garantir a característica da estação. As amostras coletadas foram fixadas em FAA₅₀ – formaldeído, ácido acético, etanol 50%, na proporção de 1:1:18, respectivamente – onde permaneceram por 72 horas, e logo em seguida foram transferidas para o etanol 70% para sua preservação. A microscopia óptica (MO) se concentrou em duas etapas: 1) seccionamento transversal e 2) dissociação. Para a realização do seccionamento transversal as amostras foram submetidas a uma série de desidratação etanol-butanol terciário (50 a 100%), sendo transferidas ao butanol puro (*overnight*). Após essa etapa foi realizada a infiltração e inclusão em parafina em série butanol-parafina (3:1, 1:1, 1:3), sendo posteriormente transferidas à parafina pura efetuando-se mais 2-3 trocas. As amostras foram cortadas a 10 μm de espessura no micrótomo rotativo Zeiss modelo HYRAX M55, logo após foram fixados nas lâminas com auxílio de solução de bissing e chapa aquecedora. Os cortes obtidos foram desparafinizados e corados em dupla coloração composta por azul de Alcian e safranina e montados em lâminas permanentes com Bálsamo do Canadá. A dissociação foi utilizada para análise da superfície foliar, onde foi realizada com auxílio de uma solução de Franklin – peróxido de hidrogênio e ácido acético na proporção de 1:1. Após estes processos, as amostras foram coradas com safranina 1% e montadas em lâminas semi-permanentes com glicerina 50%.

As observações e registros do material foram feitas em um fotomicroscópio de luz Leica modelo DM500. A partir dessas imagens adquiridas foram realizadas análises micromorfométricas de espessura de mesofilo (e seus parênquimas), espessura das epidermes abaxial e adaxial e espessura total da folha; ainda foram contados os estômatos para a determinação da densidade estomática por área ($0,5 \text{ mm}^2$); todo processo de análise foi realizado com auxílio do software ImageJ.

2.9 Análises estatísticas: Para que a hipótese fosse testada foi realizada uma análise de variância (ANOVA) fatorial, tendo como variáveis categóricas, para os parâmetros fisiológicos, folhas controle e sem CE e os meses de coleta, e para os parâmetros anatômicos, os meses de coleta e as faces adaxial e abaxial da folha. Quando detectadas as diferenças, o teste de Student Newman Keul's a 5% de probabilidade foi utilizado, ambos os testes através do *software* STATISTICA 8.0 (Statsoft Inc., 228 Tulsa, USA).

3. Resultados

3.1 Condições ambientais: Com chuvas ainda mais irregulares que o comum, o balanço hídrico do solo da área foi negativo durante todo o período de estudo (Fig. 1A, C), caracterizando uma seca severa. Embora a precipitação total entre janeiro 2014 a fevereiro 2015 tenha sido de aproximadamente 630 mm, a distribuição dos eventos pluviométricos foi irregular. Isso foi refletido na umidade do solo que em julho foi de 1,8% e no mês com a menor precipitação, em dezembro, chegou a aproximadamente 5,5% (Fig. 1B), consequência da irregularidade pluviométrica ao longo do ano. Em fevereiro, apesar da umidade do solo um pouco maior que julho, o balanço hídrico do solo foi o mais negativo.

3.2 Potencial hídrico do xilema (ψ_{ramo}) e temperatura foliar: O DPV conduziu (Fig. 2A) a temperatura foliar (Fig. 3A-C), onde o momento de maior temperatura foi entre

12 e 14 h. O potencial hídrico do xilema da espécie no início do dia era de -1,4 MPa, as plantas foram capazes de alcançar até -4,3 MPa no horário de maior DPV (às 13 h) (Fig. 2B), recuperando os valores iniciais no final da tarde em todos os meses.

3.3 Efeitos e características da CE: A CE da *C. flexuosa* foi caracterizada morfolologicamente como crosta. O conteúdo de CE variou entre 4 e 17 $\mu\text{g cm}^{-2}$, tendo o mês de fevereiro apresentado uma quantidade de CE maior, seguido de dezembro e julho (Tabela 1). Foi grande a variação da concentração de CE na superfície adaxial das folhas, em fevereiro 2015 as folhas apresentaram 70% mais CE do que em julho 2014. Os componentes encontrados na CE consistiu basicamente em *n*-alcanos (66%) cadeias C21, C25-C35 com traços (tr) de C22 e C23; ainda foram encontrados dois ácidos graxos (11%), dois álcools (11%) e outros dois compostos não identificados (11%) (Tabela 1).

3.4 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a: Nas trocas gasosas, houve um padrão ao longo do dia de acordo com a disponibilidade da radiação fotossinteticamente ativa (Fig. 3D-L), sem apresentar redução nos horários de maior DPV, em ambos os tratamentos. O mês de dezembro apresentou maiores taxas de g_s e P_N (Fig. 3E, H). Quanto a EUA, o mês de julho foi mais eficiente, e dezembro e fevereiro tiveram um comportamento similar entre si, exceto às 10 e 12 h em fevereiro, onde houve redução (Fig. 3J-L). Ao longo do dia a g_s e P_N tem seu pico perto das 8 h.

Na fluorescência da clorofila *a* o F_v/F_m se manteve sempre no patamar entre 0,7 - 0,8 (Fig. 4A-C). O F_q'/F_m' foi maior em julho (Fig 4D), e em dezembro e fevereiro tiveram um comportamento diferente, apresentando um nível mais baixo, porém semelhantes entre si (Fig. 4E, F). Ao fim do dia, por volta das 18 h, todos os centros de reação apresentaram recuperação dos valores iniciais em todos os meses. No mês de

695 julho os valores de q_p também se mantiveram em um nível mais elevado que os outros
696 meses (Fig. 4G). Os valores de NPQ manteve um padrão relativamente similar entre os
697 meses, tendo dezembro apresentado uma variação maior ao longo do dia (Fig. 4L).
698 Quanto a ETR, julho foi inferior a dezembro e fevereiro (Fig. 4M-O). Em fevereiro de 8
699 as 14 h as plantas que tiveram a CE removida apresentaram menor ETR (Fig. 4O).

700 **3.5 Metabolismo bioquímico e antioxidativo foliar:** No metabolismo bioquímico, os
701 AS do mês de dezembro apresentaram maior concentração em folhas controle (Fig. 5A).
702 Quando fracionados em sacarose e frutose, esses açúcares não se mostraram diferentes
703 entre os tratamentos ou meses (Fig. 5B, C), bem como as proteínas (Fig. 5F). Os ALT
704 (Fig. 5D) também não diferiram, exceto no mês de julho, onde foi mais concentrado em
705 folhas sem CE. A concentração de prolina diferiu ao longo dos meses, onde menores
706 teores foram encontrados no mês de julho, seguido de dezembro e então fevereiro (Fig.
707 5E). Os pigmentos fotossintéticos analisados não apresentaram diferenças significativas
708 entre os tratamentos ou entre os meses avaliados (dados não mostrados).

709 No sistema antioxidativo a SOD foi maior nos meses de julho e dezembro, não
710 diferindo entre os tratamentos (Fig. 6A). A CAT apresentou maior atividade em
711 fevereiro, seguido de julho e dezembro (Fig. 6C). Quanto às demais quantificações,
712 H_2O_2 , MDA e APX, não foi encontrada diferença significativa entre os meses ou entre
713 os tratamentos (Fig. 6B, D, E).

714 **3.6 Anatomia foliar:** Anatomicamente esta espécie apresenta-se anfihipoestomática, ou
715 seja, os estômatos se localizam nas duas faces da folha, contudo, na face abaxial eles se
716 apresentam em maior número. Em *C. flexuosa* os estômatos estão localizados apenas
717 sobre as nervuras, dessa forma, não foram contabilizados no estudo. Quanto à densidade
718 estomática, a face abaxial é a responsável pela grande quantidade de estômatos por

folha, e folhas coletadas em dezembro apresentaram maior quantidade de estômatos por área (Tabela 2). Em parâmetros como espessura da cutícula e espessura da epiderme, para todos os meses, a face adaxial foi maior e não diferiu entre os meses de coleta. A espessura dos parênquimas paliçádico e lacunoso foi maior em folhas coletadas em julho, sendo, neste mês, o parênquima paliçádico mais espesso que o lacunoso, quando comparado aos outros meses. Em dezembro o parênquima lacunoso foi mais espesso e em fevereiro eles não diferiram. Esse aumento de espessura dos parênquimas em folhas de julho acaba refletindo no espessamento do mesofilo e, conseqüentemente, na espessura total da folha (Tabela 2).

4. Discussão

As plantas de *C. flexuosa* não apresentaram alteração do metabolismo fotossintético foliar após a remoção parcial da CE, pelo menos naqueles meses em que a concentração desta foi baixa. No mês de fevereiro onde a concentração de CE foi alta a remoção de 50% desta concentração reduziu as trocas gasosas e os parâmetros fotoquímicos durante o período do dia com maior DPV. As possíveis implicações desse comportamento para espécie estudada diante do cenário climático previsto para a região são discutidas adiante.

Embora a precipitação anual no local de estudo não tenha se distanciado da média histórica, a distribuição dos eventos de chuva tem sido irregular nos últimos anos. Talvez a irregularidade climática represente hoje a maior ameaça a diversas espécies vegetais, pois estas não conseguem gerar novos indivíduos anualmente.

Ao analisarmos os dados em conjunto percebemos que *C. flexuosa* é capaz manter seu desempenho fisiológico foliar em um ambiente severo como a Caatinga apesar destes indivíduos estarem em um solo com baixa umidade e um balanço hídrico

negativo durante todo período de estudo. Essa escassez de água é refletida no ψ_{ramo} , onde, no horário de maior DPV foi capaz de diminuir cerca de 70% comparado a antes do amanhecer, recuperando os valores iniciais no final da tarde. Devido a uma maior precipitação no mês anterior, o balanço hídrico de dezembro foi menos negativo, porém isso ainda não foi suficiente para um excedente hídrico no solo. Com estes resultados vemos que diminuir o ψ_{ramo} nos horários mais quentes do dia é uma estratégia que caracteriza a *C. flexuosa* como uma espécie de comportamento anisohídrico, onde diante da redução do potencial hídrico do solo e o aumento do DPV há a indução de uma redução no potencial hídrico do xilema na planta, contudo, isso não leva ao decréscimo da *gs* (Tardieu e Simonneau 1998). Esse tipo de comportamento permite a planta manter a absorção de carbono e as taxas de crescimento, mesmo durante o período de seca, e diante de uma alta umidade do solo se apresenta como uma vantagem, pois facilita a produção de biomassa (Attia et al., 2015).

A CE como placas horizontais são mais eficientes na reflectância da radiação intensa comparado com formas verticais, (como os cristais, por exemplo) sendo uma resposta adaptativa de uma espécie às condições ambientais com estas características (Grant, 2003). A literatura mostra que uma espécie que não está acostumada a radiações intensas pode perder sua forma estrutural de cristais na CE (Mohammadian et al., 2007, Ni et al., 2014). Os cristais de cera presentes na superfície foliar podem se fundir diante de alta radiação UV-B, tanto na face adaxial como na abaxial, mas o efeito é mais proeminente na face superior devido a exposição direta à radiação (Ni et al., 2014). Assim, a característica estrutural em crosta da CE de *C. flexuosa* se apresenta como uma adaptação a ambientes muito quentes e com forte radiação.

Condições ambientais como vistas no mês de fevereiro, tais como alta intensidade luminosa, baixa umidade do ar e alta temperatura, vistas pelo DPV, são fatores

relacionados à alta produção das ceras epicuticulares em regiões como a Caatinga (Oliveira e Salatino 2000). Dessa forma, o aumento da concentração de CE nas folhas apresentada no mês de fevereiro é um reflexo do balanço hídrico do solo que por dois meses seguidos apresentou um déficit superior a -150 mm, assim a resposta da espécie foi aumentar a carga de CE na superfície das folhas, como forma de aclimação ao estresse e, dessa forma reduzir a transpiração cuticular para melhorar a eficiência do uso da água (Samdur et al., 2003). Nosso estudo mostrou sob condições de campo, em uma FTSS, que a quantidade e composição da CE variam de acordo com o déficit hídrico no solo e as condições sazonais (Mohammadian et al., 2007, Santos et al., 2014). Os 50% de CE removidos das folhas em fevereiro causaram uma tendência de redução nas trocas gasosas e uma menor ETR, devido não só a quantidade removida, como também ao alto DPV (> 5 kPa) e a elevada temperatura foliar de quase 40 °C, tendo em vista que a temperatura tem um poderoso efeito na permeabilidade da cutícula (Riederer e Schreiber 2001, Mohammadian et al., 2007).

A composição da CE também é um importante fator para a sobrevivência em ambientes secos. Ter uma cutícula espessa não é garantia de resistência à transpiração (Oliveira et al., 2003), a composição química se torna mais importante que a quantidade em casos de regiões com condições severas, tal como na FTSS. Os *n*-alcanos encontrados na CE de *C. flexuosa* são constituintes muito importantes e predominantes em espécies da Caatinga, sendo muito eficazes como promotores da impermeabilidade da água, principalmente os homólogos que se encontram entre C27 e C33 (Oliveira e Salatino 2000; Figueiredo et al., 2012). A presença de grande quantidade de *n*-alcanos na CE também é um fator adicional nos mecanismos de tolerância à seca dessa espécie, sendo um dos responsáveis por permitir que as folhas de *C. flexuosa* sejam perenes. Os ácidos graxos encontrados também funcionam como agentes antitranspirantes, porém

menos eficientes quando comparados aos alcanos (Oliveira et al., 2003). Estudos que trabalharam com espécies lenhosas e arbustivas da Caatinga também verificaram a presença e eficiência dos *n*-alcanos nas ceras epicuticulares das espécies (Oliveira e Salatino 2000, Oliveira et al., 2003, Figueiredo et al., 2012).

Em fevereiro as condições edafoclimáticas resultantes da disponibilidade hídrica reduziram levemente a *g_s* nas plantas com menos 50% da CE, contudo, *P_N* teve uma redução de 30 a 50% nos horários de maior DPV, o que está de acordo com Mohammadian et al. (2007) e Figueiredo et al. (2012). Entretanto, o comportamento diário da espécie quanto às *g_s* e *P_N* é comum em espécies anisohídricas, seja em períodos de seca ou não, as taxas de trocas gasosas são sempre mantidas em detrimento do ψ_{ramo} (Guha e Reddy 2014, Roman et al., 2015). Estudos afirmam que esse tipo de comportamento pode ser prejudicial a espécie em anos de seca prolongada (Tardieu e Simonneau 1998, Roman et al., 2015). Também é preciso ter em mente que a regulação do ritmo diário da fotossíntese é conduzido por fatores endógenos, como os ritmos circadianos (Webb, 2003). Os resultados do presente estudo mostra que *C. flexuosa* sendo lenhosa, tropical e sempre verde apresenta alta resiliência na tolerância à seca, sendo capaz de manter alta performance de sequestro de carbono com alta eficiência do uso da água.

Também não houve danos permanentes à maquinaria fotoquímica das plantas ao longo do dia nos meses avaliados como mostra os resultados de F_v/F_m que são sempre recuperados ao fim do dia. A menor temperatura foliar no mês de julho proporcionou maiores valores de F_q'/F_m' , pois este parâmetro é influenciado pela temperatura e radiação, onde estes poderiam causar fotoinibição quando elevados (Yang et al., 2007). Apesar de uma redução no F_q'/F_m' e q_p e o aumento no NPQ, o mês de dezembro mostrou a eficácia do mecanismo de dissipação de calor utilizado pela planta para

suportar a alta radiação, confirmado pela manutenção do F_v/F_m acima de 0,7 (Sales et al., 2013). A elevada ETR em fevereiro nas folhas controle não se refletiu plenamente em uma maior P_N , embora os valores tenham sido maiores em relação as plantas sem CE, assim é possível que o excesso de elétrons tenha sido drenado em ajustes bioquímicos como a maior produção de prolina.

Diante das condições, as plantas regularam o metabolismo foliar principalmente através das trocas gasosas e sistema fotoquímico, porém, alguns ajustes bioquímicos também se fizeram necessários. O aumento na concentração dos ALT em julho em plantas com CE removida poderia estar relacionada com o sistema antioxidante da folha (Oliveira et al., 2014a), tal como a prolina em fevereiro. A prolina pode exercer a função antioxidante sob condições de restrição hídrica em algumas espécies. Nesta espécie, a prolina deveria ser investigada com mais detalhe. O comportamento deste aminoácido leva a diversos questionamentos em relação ao papel desempenhado no metabolismo foliar. Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira et al., (2014a) ao trabalhar com lenhosas nativa e invasora da Caatinga sob estresse hídrico.

A atividade da CAT também é comumente induzida diante do estresse hídrico em diferentes espécies (Hu et al., 2013), dessa forma, o aumento da sua atividade do mês de fevereiro pode ter se dado devido ao balanço hídrico mais negativo desse mês, para prevenir e proteger o tecido foliar contra um possível estresse oxidativo (Mafakheri et al., 2011), oriundo do já esperado período seco. Contudo, a remoção da CE não foi suficiente para causar um aumento da atividade nessas folhas ou causar peroxidação lipídica da membrana plasmática, como pode comprovar os demais resultados de MDA e H_2O_2 , em relação as folhas controle.

A baixa frequência dos estômatos na face adaxial e exclusivamente presentes sobre os vasos condutores, sugere que *C. flexuosa* seja funcionalmente hipoestomática (Torrecilla et al., 2008), o baixo número de estômatos nesta face surge como proteção para folha contra radiação direta forte, principalmente no verão (Ni et al., 2015). Todavia, a manutenção da gs constante ao longo do dia pode vir a ter ligação com o posicionamento próximo dos vasos condutores de água, já que a condutividade hidráulica foliar é um dos principais reguladores do comportamento estomático (Sack e Scoffoni, 2013).

As condições mais severas também são refletidas na estrutura das folhas, tendo as folhas de julho sido mais espessas e com o parênquima paliçádico maior comparado ao lacunoso. Devido às condições mais secas deste mês e o início do período seco na região, as folhas investem em um espessamento do parênquima paliçádico, bem como de todo o mesofilo; essas alterações são comuns em condições de alta radiação e tem como objetivo favorecer o aumento da taxa fotossintética através do aumento da condutância mesofílica (Adachi et al., 2013). A maior EUA no mês de julho também pode estar associada ao investimento em mesofilo desse período, já que é nessa região da folha que se encontra a maquinaria fotossintética (Oliveira et al., 2014b). Vemmos et al., (2013) trabalhando com três cultivares de figueira, também lenhosas, viu que maior espessura total da folha, sendo maior o parênquima paliçádico, se relaciona com uma maior atividade fotossintética.

Já em dezembro *C. flexuosa* produziu folhas mais delgadas e com maior espaço intracelular, inferido pelo parênquima lacunoso mais espesso. Mas nesse caso, uma maior densidade estomática contrabalanceia isso e mostra que com folhas mais finas o controle estomático é mais preciso, já que o número de estômatos é maior (Hetherington

e Woodward 2003). E esta é a estratégia anatômica utilizada durante o período chuvoso que geralmente se inicia em janeiro.

Concluindo, sob as condições edafoclimáticas em que ocorreu o presente estudo, nossos resultados nos leva a rejeitar a hipótese inicial, pois a quantidade e a importância da cera epicuticular foi dinâmica ao longo do experimento. A cera epicuticular exerce baixa influência no metabolismo foliar em algumas épocas do ano, tal como a transição do período chuvoso para o seco e durante o período seco, provavelmente por estar em baixa concentração. Com o aumento gradual da concentração de cera, somente durante a transição período seco para o chuvoso, no mês de fevereiro, que a remoção de 50% do total levou a alterações em diferentes aspectos do metabolismo fotossintético. Outro aspecto mostrado pelo metabolismo foliar da *C. flexuosa* foi a estabilidade. Apesar de ter se mostrado uma espécie anisohídrica, onde o potencial hídrico do xilema é reduzido nos momentos de maior DPV e a recuperação é rápida no final da tarde, a assimilação de CO₂ se manteve estável e alta para uma espécie de porte arbóreo. E diante das previsões para o clima em regiões tropicais semiáridas, onde há ocorrência de chuvas extremas em curto período, e ainda longos períodos de seca pode vir a ser comum, assim, o metabolismo foliar como o apresentado por esta espécie pode ser uma boa estratégia. Finalmente, estudos de relações hídricas de forma detalhada de *C. flexuosa* podem auxiliar na melhor compreensão do seu desempenho.

885 **Contribuições dos autores**

886 Elaboração do projeto: Santos MG.

887 Coleta de dados: Pereira SCF e Figueiredo KV.

888 Análise dos dados: Pereira SCF, Santos, MG e Oliveira AFM.

889 Interpretação dos resultados: Pereira SCF.

890 Elaboração do manuscrito: Pereira SCF com auxílio de Santos MG.

891 **Agradecimentos**

892 Os autores agradecem a Unidade Acadêmica de Serra Talhada da Universidade Federal
893 Rural de Pernambuco, ao Laboratório de Anatomia Vegetal, e a professora Jarcilene
894 Almeida-Cortez, ambos da Universidade Federal de Pernambuco, pelo suporte
895 concedido ao trabalho. Pereira SCF agradece a CAPES pelo fornecimento da bolsa.

Referências

- Adachi S., Nakae T., Uchida M. *et al.*: The mesophyll anatomy enhancing CO₂ diffusion is a key trait for improving rice photosynthesis. – J Exp Bot **64**: 1061–1072, 2013.
- Alexieva V., Sergiev, I., Mapelli S., Karanov E.: The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. – Plant Cell Environ **24**: 1337–1344, 2001.
- Attia Z., Domec JC., Oren R. *et al.*: Growth and physiological responses of isohydric and anisohydric poplars to drought. – J Exp Bot doi:10.1093/jxb/erv195, 2015.
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D.: Rapid determination of free proline for water-stress studies. – Plant Soil **39**: 205-207, 1973.
- Blokhina O., Virolainen E., Gagerstedt K.V.: Antioxidants: oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Ann Bot **91**: 179–194, 2003.
- Bradford M.: Rapid and quantitative method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. – Anual Biochem **72**: 284-252, 1976.
- Cakmak I., Horst W.J.: Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). – Physiol Plantarum **83**: 463-468, 1991.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K. *et al.*: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. – Anal Chem **28**: 350-356, 1956.
- Figueiredo K.A., Oliveira M.T., Oliveira A.F.M. *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. – Aust J Bot **60**: 685–692, 2012.
- Fleck I., Hogan K.P., Llorens L. *et al.*: Photosynthesis and photoprotection in *Quercus ilex* sprouts after fire. – Tree Physiol **18**: 607-614, 1998.

- 923 Foreman D., Lawrence G., Evans E., Trella C.: A modification of the roe procedure for
924 determination of fructose in tissues with increased specificity. – Anal Bioch **56**:
925 584-590, 1973.
- 926 Gariglio M.A., Sampaio E.V.S.B., Cestaro L.A., Kageyama P.Y.: Sustainable use and
927 conservation of forest resources in the Caatinga. Ministério do Meio Ambiente,
928 Serviço Florestal Brasileiro, Brasília, 2010. [In Portuguese]
- 929 Giannopolitis C.N., Reis S.K.: Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. –
930 Plant Physiol **59**: 309-314, 1977.
- 931 Grant R.H., Heisler G.M., Gao W., Jenks M.: Ultraviolet leaf reflectance of common
932 urban trees and the prediction of reflectance from leaf surface characteristics. –
933 Agr Forest Meteorol **120**: 127–139, 2003.
- 934 Guha A., Reddy A.R.: Leaf gas exchange, water relations and photosystem-II
935 functionality depict anisohydric behavior of drought-stressed mulberry (*Morus*
936 *indica*, cv. V1) in the hot semi-arid steppe agroclimate of Southern India. – Flora
937 **209**: 142-152, 2014.
- 938 Guhling O., Kinzler C., Dreyer M. *et al.*: Surface Composition of Myrmecophilic
939 Plants: Cuticular Wax and Glandular Trichomes on Leaves of *Macaranga*
940 *tanarius*. – J Chem Ecol **31**: 2323-2341, 2005.
- 941 Handel E.V.: Direct microdetermination of sucrose. – Anal Bioch **23**: 280-283, 1968.
- 942 Hetherington A.M., Woodward F.I.: The role of stomata in sensing and driving
943 environmental change. – Nature **424**: 901-908, 2003.
- 944 Hu W., Huang C., Deng X. *et al.*: TaASR1, a transcription factor gene in wheat, confers
945 drought stress tolerance in transgenic tobacco. – Plant Cell Environ **36**: 1449-
946 1464, 2013.
- 947 Jetter R., Schäfer S.: Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface.
948 Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. – Plant
949 Physiol **126**: 1725–1737, 2001.

- 950 Lichtenthaler H.: Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic
951 biomembranes. – *Methods Enzymol* **148**: 350-382, 1987.
- 952 Mafakheri A., Siosemardeh A., Bahramnejad B. *et al.*: Effect of drought stress and
953 subsequent recovery on protein, carbohydrate contents, catalase and peroxidase
954 activities in three chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. – *AJCS* **5**: 1255-1260,
955 2011.
- 956 Maxwell K., Johnson, G.: Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J Exp Bot* **51**:
957 659-668 2000.
- 958 Miles, L. *et al.*: A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *J*
959 *Biog* **33**: 491–505, 2006.
- 960 Mohammadian M.A., Watling J.R., Hill R.S.: The impact of epicuticular wax on gas-
961 exchange and photoinhibition in *Leucadendron lanigerum* (Proteaceae). – *Acta*
962 *Oecol* **31**: 93-101, 2007.
- 963 Moore S., Stein W.: A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of
964 amino acids and related compounds. – *J Biol Chem* **221**: 907-913, 1954.
- 965 Nakano Y., Asada K.: Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific
966 peroxidases in spinach chloroplast. – *Plant and Cell Physiol* **22**: 867-880, 1981.
- 967 Ni Y., Xia R., Li J.: Changes of epicuticular wax induced by enhanced UV-B radiation
968 impact on gas exchange in *Brassica napus*. – *Acta Physiol Plant* **36**: 2481–2490,
969 2014.
- 970 Ni Y., Sun Z., Huang X. *et al.*: Variations of cuticular wax in mulberry trees and their
971 effects on gas exchange and post-harvest water loss. – *Acta Physiol Plant* **37**:
972 112, 2015.
- 973 Oliveira A.F.M., Salatino A.: Major Constituents of the foliar epicuticular waxes of
974 species from the Caatinga and Cerrado. – *Z Natuforsch C* **55**: 688-692, 2000.
- 975 Oliveira A.F.M., Meirelles S.T., Salatino, A.: Epicuticular waxes from Caatinga and
976 Cerrado species and their efficiency against water loss. *Anais da Academia*
977 *Brasileira de Ciencias* **75**: 431-439, 2003.

- 978 Oliveira M.T., Medeiros C.D., Frosi G., Santos M.G.: Different mechanisms drive the
979 performance of native and invasive woody species in response to leaf
980 phosphorus supply during periods of drought stress and recovery. – *Plant*
981 *Physiol and Bioch* **82**: 66e75, 2014a.
- 982 Oliveira M.T., Matzek V., Medeiros C.D. *et al.*: Stress tolerance and ecophysiological
983 ability of an invader and a native species in a seasonally dry tropical forest. –
984 *PLoS ONE* **9**: e105514, 2014b.
- 985 Riederer M., Schreiber L.: Protecting against water loss: analysis of the barrier
986 properties of plant cuticles. – *J Exp Bot* **52**: 2023-2032, 2001.
- 987 Riederer M.: Introduction: biology of the plant cuticle. In: RIEDERER, M.; MÜLLER,
988 C. (Ed.), *Biology of the Plant Cuticle*. – *Annual Plant Reviews* **23**: 1-8, 2006.
- 989 Robbins N.S., Pharr D.M.: Effect of Restricted Root Growth on Carbohydrate
990 Metabolism and Whole Plant Growth of *Cucumis sativus* L. – *Plant Physiol* **87**:
991 409-413, 1988.
- 992 Robinson S.A., Lovelock C.E., Osmond C.B.: Wax as a mechanism for protection
993 against photoinhibition-A study of *Cotyledon orbiculata*. – *Bot Acta* **106**: 307-
994 312, 1993.
- 995 Roman D.T., Novick K.A., Brzostek E.R. *et al.*: The role of isohydric and anisohydric
996 species in determining ecosystem-scale response to severe drought. - *Oecologia*
997 **179**: 641–654, 2015.
- 998 Sack L., Scoffoni C. Leaf venation: structure, function, development, evolution, ecology
999 and applications in the past, present and future. – *New Physiol* **198**: 983-1000.
- 1000 Sales C.R.G., Ribeiro R.V., Silveira J.A.G., *et al.*: Superoxide dismutase and ascorbate
1001 peroxidase improve the recovery of photosynthesis in sugarcane plants subjected
1002 to water deficit and low substrate temperature. – *Plant Physiol Bioch* **73**: 326-
1003 336, 2013.
- 1004 Samdur M.Y., Manivel P., Jain, V.K. *et al.*: Genotypic differences and waterdeficit
1005 induced enhancement in epicuticular wax load in peanut. – *Crop Science* **43**:
1006 1294–1299, 2003.

- 1007 Santos M.G., Oliveira M.T., Figueiredo K.V. *et al.*: Caatinga, the Brazilian dry tropical
1008 forest: can it tolerate climate changes? – *Theor Exp Plant Physiol* **26**: 83-99,
1009 2014.
- 1010 Tardieu F., Simonneau T.: Variability among species of stomatal control under
1011 fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and
1012 anisohydric behaviours. – *J Exp Bot* **49**: 419–432, 1998.
- 1013 Torrecilla P., Castro M., Lapp M.: Morfoanatomía foliar en especímenes de *Capparis*
1014 *flexuosa* (L.) L. (capparaceae) creciendo en tres localidades distintas del estado
1015 Aragua (Venezuela). – *Ernstia* **19**: 35-54, 2008.
- 1016 Trethewey R.N., Geigenberger P., Riedel K. *et al.*: Combined expression of glucokinase
1017 and invertase in Potato tubers leads to a dramatic reduction in starch
1018 accumulation and a stimulation of glycolysis. *The Plant Journal* **15**:109-118,
1019 1988.
- 1020 Vemmos S. N., Petri E., Stournaras.: Seasonal changes in photosynthetic activity and
1021 carbohydrate content in leaves and fruit of three fig cultivars (*Ficus carica* L.). –
1022 *Sci Hortic* **160**: 198–207, 2013.
- 1023 Webb A. A. R. The physiology of circadian rhythms in plants – *New Phytol* **160**: 281-
1024 303, 2003.
- 1025 Yang X., Wen X., Gong H. *et al.*: Genetic engineering of the biosynthesis of
1026 glycinebetaine enhances thermotolerance of photosystem II in tobacco plants. –
1027 *Planta* **225**: 719-733, 2007.

Lista de legenda

Fig. 1. Dados ambientais da área estudada. Balanço hídrico do solo entre janeiro de 2014 e fevereiro de 2015 (A) e umidade do solo (B) referente a indivíduos de *Cynophalla Flexuosa* no município de Serra Talhada, nos meses de junho e novembro de 2014 e janeiro de 2015, histórico anual de precipitação e de temperatura médias no intervalo dos anos de 2009 a 2015 (C), e radiação fotossinteticamente ativa (PAR, D) ao longo do dia nos dias de coleta dos meses de julho e dezembro de 2014 e fevereiro de 2015 no município de Serra Talhada, PE, Brasil.

Fig. 2. Déficit de pressão de vapor (DPV) (A) e potencial hídrico do xilema (ψ_{ramo} , B) de *Cynophalla flexuosa* ao longo do dia nos dias de coleta dos meses de julho e dezembro de 2014 e fevereiro de 2015. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os meses e letras minúsculas indicam diferença entre os horários pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0.05$) ($n = 3 \pm \text{EP}$).

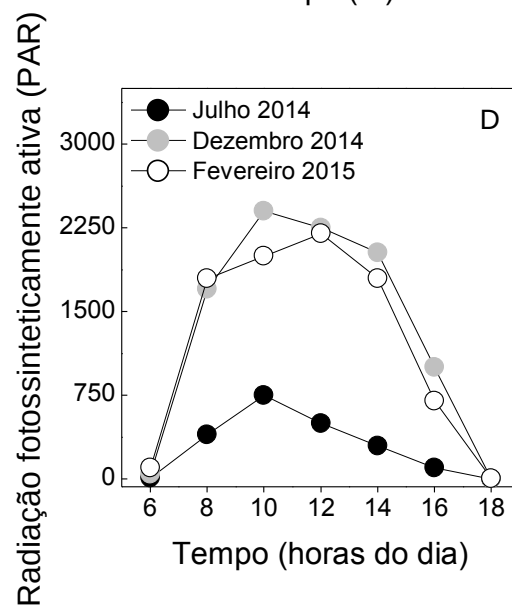
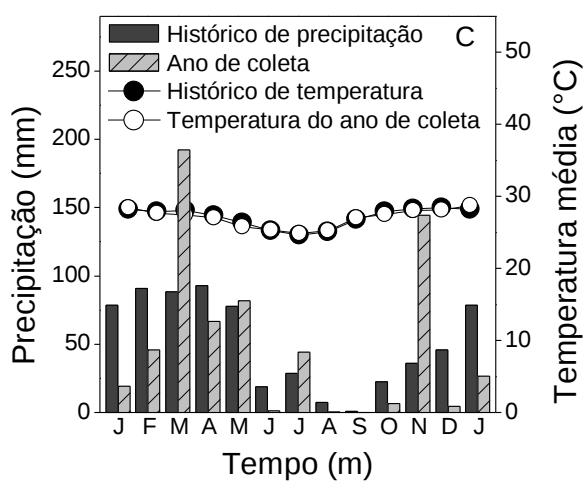
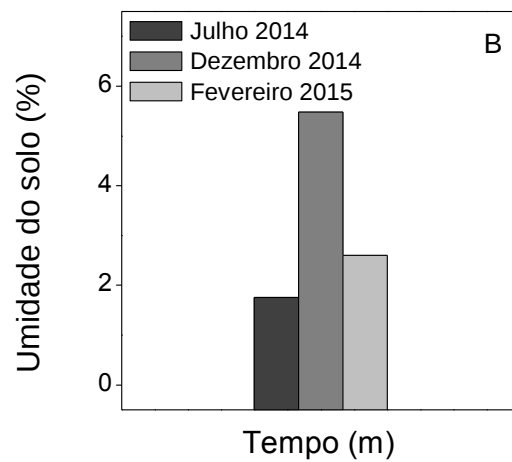
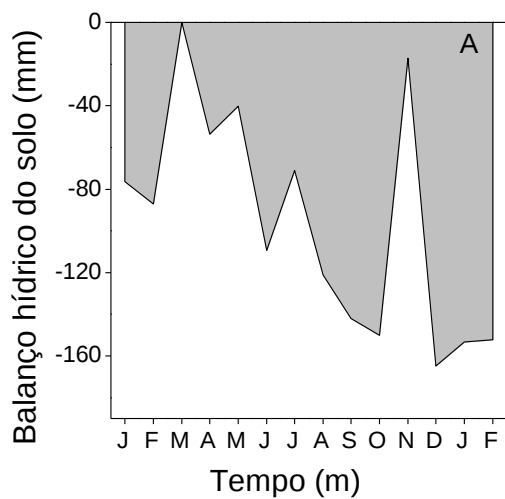
Fig. 3. Trocas gasosas de *Cynophalla flexuosa*. Temperatura foliar ($^{\circ}\text{C}$, A, B, C), condutância estomática (gs, D, E, F), taxa de assimilação líquida de CO_2 (P_N , G, H, I) e eficiência do uso da água (EUA, J, K, L) de *Cynophalla flexuosa* ao longo do dia nos dias de coleta dos meses de julho e dezembro de 2014 e fevereiro de 2015 de folhas controle e com cera epicuticular (CE) removida. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os meses e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0.05$) ($n = 4 \pm \text{EP}$).

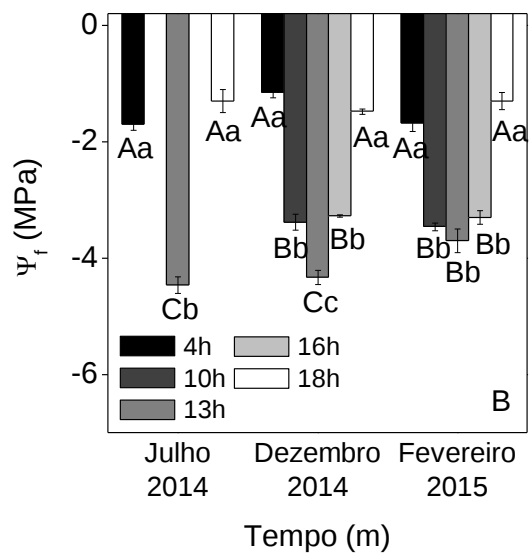
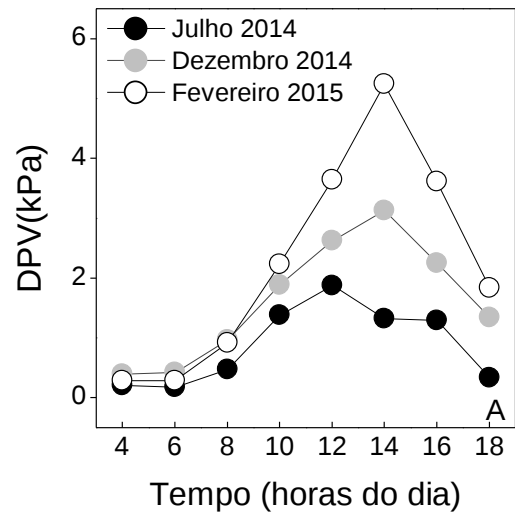
Fig. 4. Fluorescência da Clorofila a de *Cynophalla flexuosa*. Eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m , A, B, C), eficiência operacional do fotossistema II (F_q'/F_m' , D, E, F), quenching fotoquímico (q_p , G, H, I), quenching não-fotoquímico (NPQ, J, K, L) e taxa de transporte de elétrons (ETR, M, N, O) de *Cynophalla flexuosa* ao longo do dia nos dias de coleta dos meses de julho e dezembro de 2014 e fevereiro de 2015 de folhas controle e com cera epicuticular (CE) removida. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os meses e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0.05$) ($n = 4 \pm \text{EP}$).

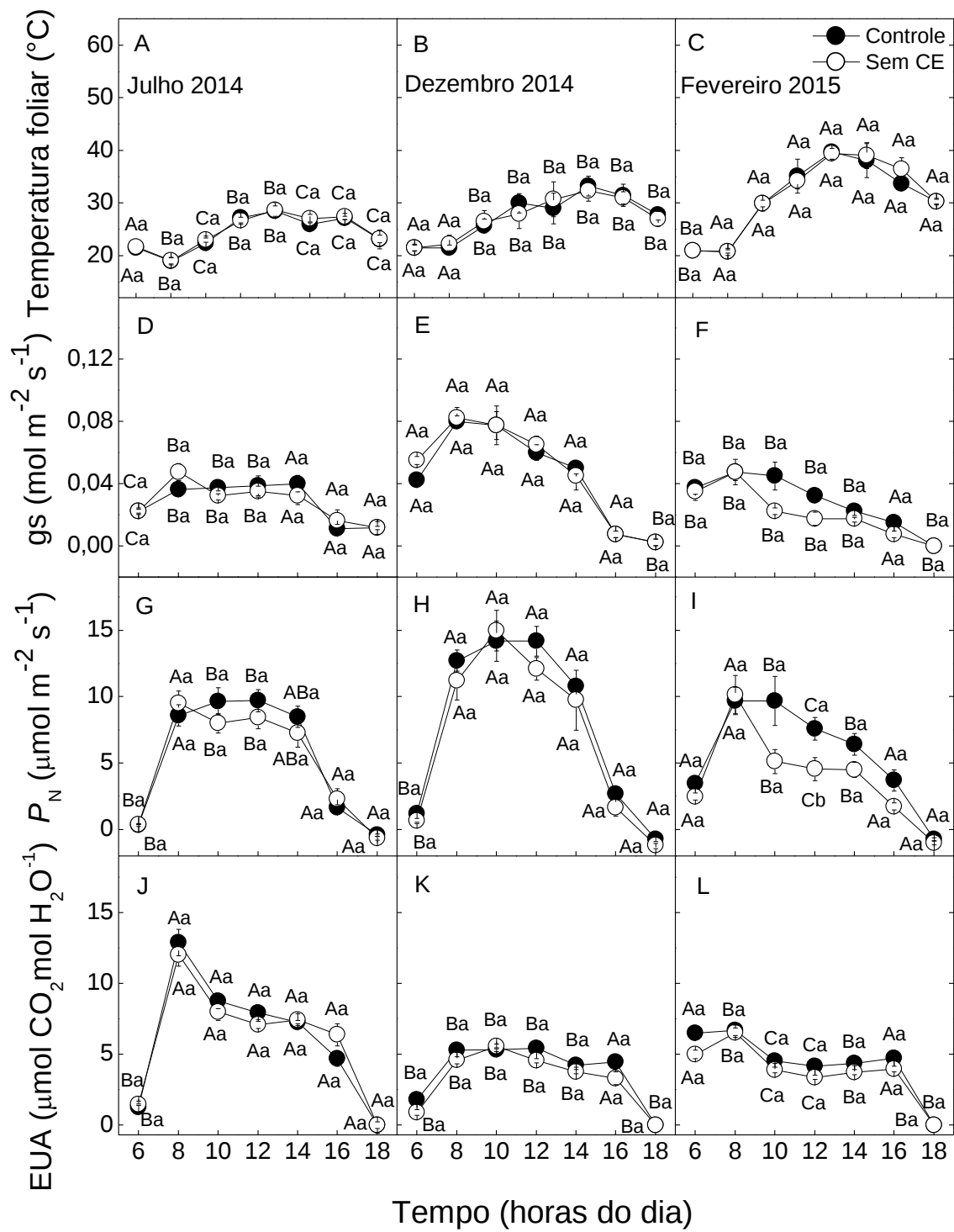
Fig. 5. Metabolismo bioquímico de *Cynophalla flexuosa*. Concentrações foliares de açúcares solúveis (AS, A), sacarose (B), frutose (C), aminoácidos livres totais (ALT, D), prolina (E), proteínas solúveis totais (PST, F) em *Cynophalla flexuosa* nos dias de coleta dos meses de julho e dezembro de 2014 e fevereiro de 2015 de folhas controle e com cera epicuticular (CE) removida. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os meses e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0.05$) ($n = 4 \pm \text{EP}$).

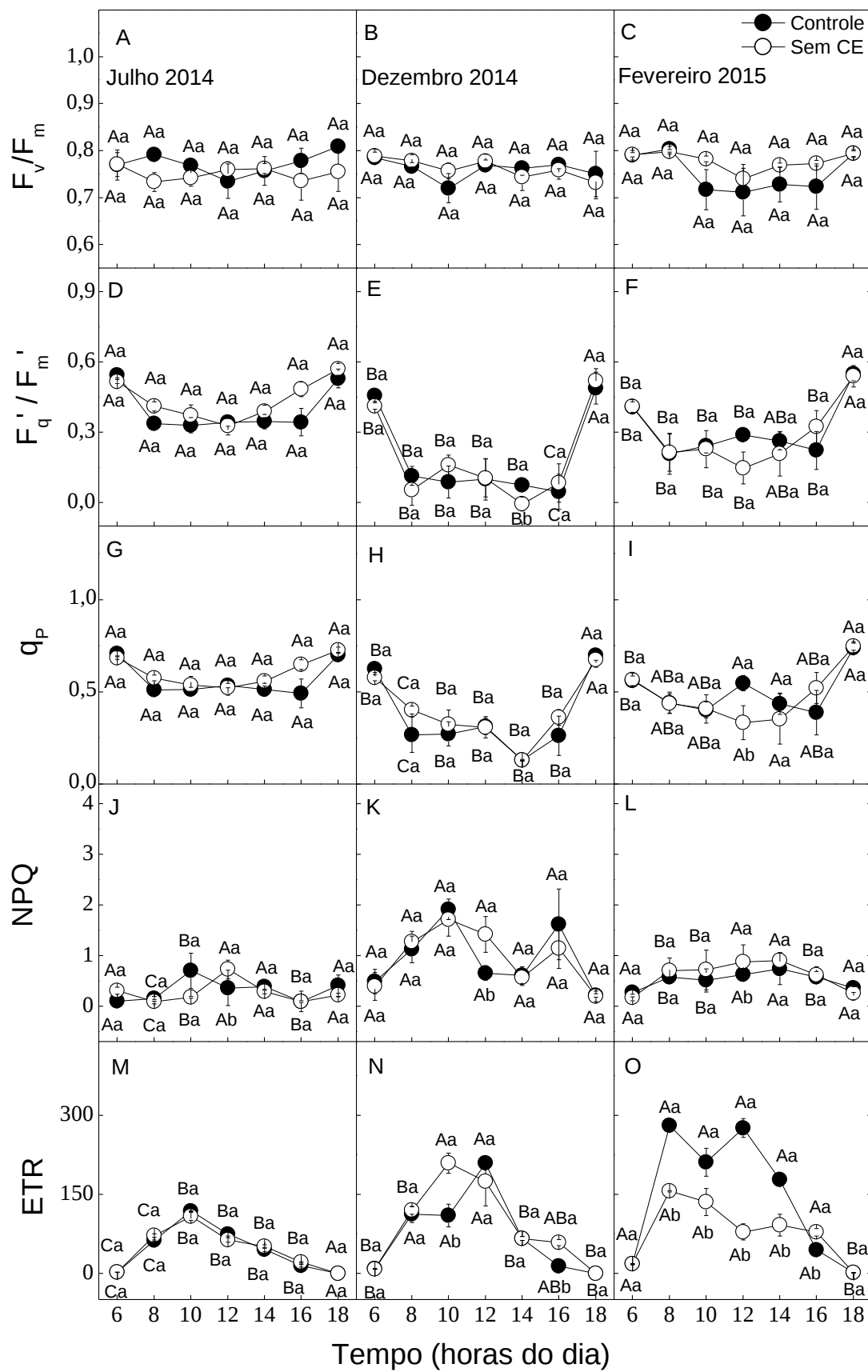
Fig. 6. Metabolismo antioxidativo de *Cynophalla flexuosa*. Concentrações foliares de superóxido dismutase (SOD, A), peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , B) catalase (CAT, C), aldeído

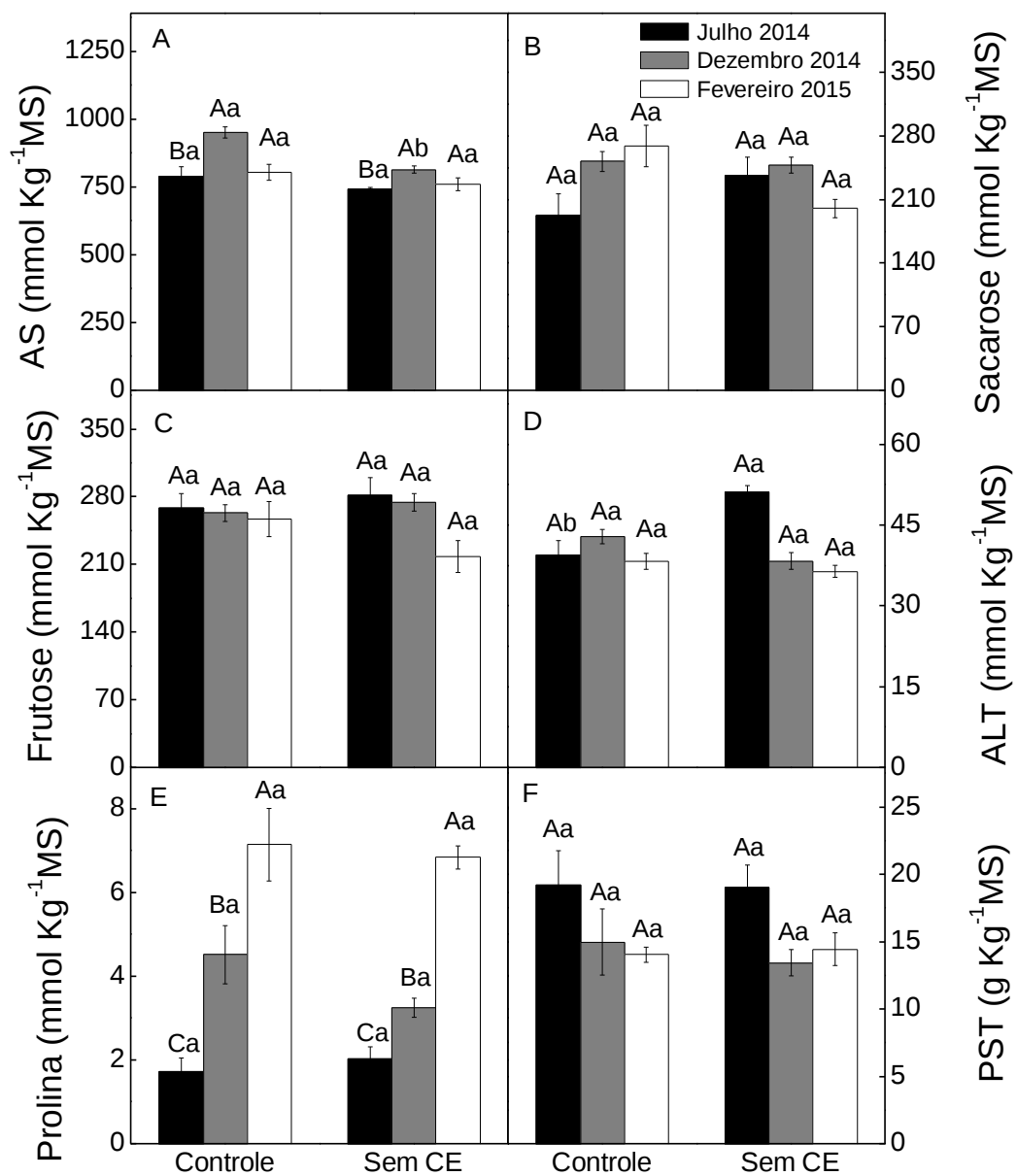
malônico (MDA, D) e ascorbato peroxidase (E) em *Cynophalla flexuosa* nos dias de coleta dos meses de julho e dezembro de 2014 e fevereiro de 2015 de folhas controle e com cera epicuticular (CE) removida. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os meses e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0.05$) ($n = 4 \pm EP$).











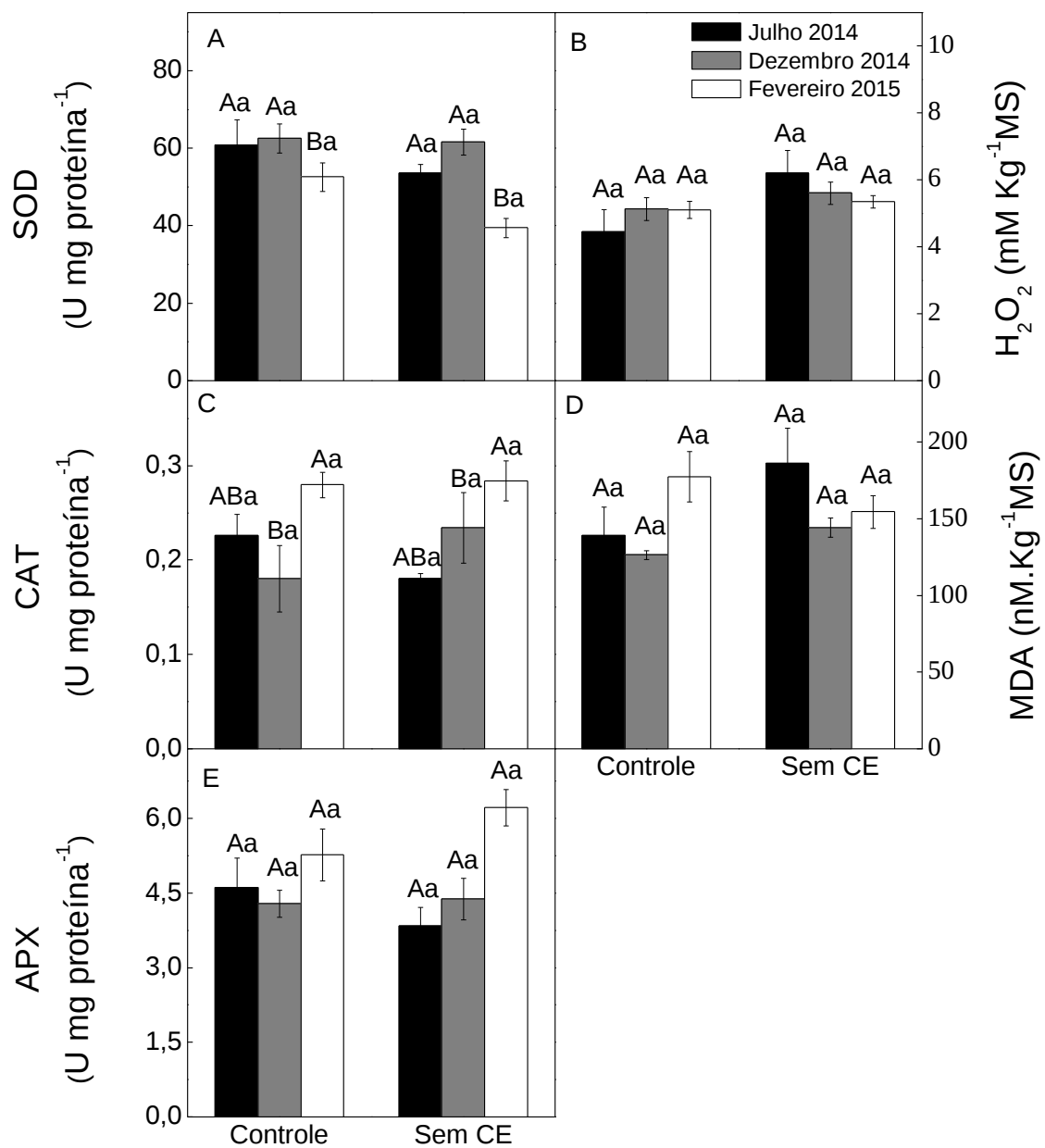


Tabela 1. Constituintes da cera epicuticular (CE) em folhas controle e sem CE, bem como porcentagem de CE removida de *Cynophalla flexuosa* coletadas nos meses de julho e dezembro de 2014 e fevereiro de 2015 (n = 3 ± EP).

Constituintes (%)	Julho 2014		Dezembro 2014		Fevereiro 2015	
	Controle	Sem CE	Controle	Sem CE	Controle	Sem CE
<i>n</i>-Alcanos						
C21	11,7	12,2	-	tr	-	tr
C25	-	-	-	10,4	-	tr
C26	-	tr	1,2	6,0	1,4	3,3
C27	12,2	4,2	1,0	6,0	0,8	2,9
C28	tr	-	2,4	8,0	2,3	8,0
C29	5,6	2,8	3,4	7,5	2,5	2,3
C30	tr	-	tr	5,5	tr	1,8
C31	10,2	13,6	4,8	6,7	6,4	3,7
C33	tr	tr	tr	6,8	2,0	3,7
C34	6,0	7,6	1,8	4,0	1,5	2,2
C35	tr	tr	1,7	3,7	tr	-
Ácidos graxos						
Ácido hexadecanóico	9,3	3,2	1,1	8,7	1,5	6,7
Ácido octadecanóico	9,8	3,4	1,9	10,3	1,7	7,4
Álcoois primários						
Docosonol	23,5	30,8	20	10,1	1,0	8,0
Hexacosonol	-	-	1,5	tr	1,3	-
Não identificado 1	18,5	18,4	36,1	23,8	31,7	20,0
Não identificado 2	29,5	13,8	41,2	6,7	33,3	6,9
CE (µg cm⁻²)	4,1±0,5^{Ba}	3,9±0,4^{Ba}	5,33±0,21^{Ba}	4,21±0,84^{Ba}	17,09±3,4^{Aa}	8,53±2,33^{Ab}
CE removida (%)	6,9		20,9		50,9	

tr = indica que apenas traços do componente foram encontrados (concentração < 1%), - = componente não detectado.

Tabela 2. Atributos anatômicos de folhas de *Cynophalla flexuosa* coletadas nos meses de julho e dezembro de 2014 e fevereiro de 2015. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os meses minúsculas indicam diferença entre as faces ou tipos de parênquima (n = 20 ± EP).

Atributo	Julho 2014		Dezembro 2014		Fevereiro 2015	
	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial
Densidade estomática (0,5mm ²)	0 ^{Bb}	195,35 ^{Ba}	0 ^{Ab}	220,05 ^{Aa}	0 ^{Bb}	188,23 ^{Ba}
Espessura da epiderme (µm)	19,41±0,93 ^{Aa}	16,09±0,5 ^{Ab}	20,87±0,64 ^{Aa}	18,08±0,75 ^{Ab}	20,45±0,84 ^{Aa}	16,36±0,63 ^{Ab}
Espessura da cutícula (µm)	15,70±0,56 ^{Aa}	12,44±0,68 ^{Ab}	17,27±0,47 ^{Aa}	12,03±0,45 ^{Ab}	18,13±0,54 ^{Aa}	12,04±0,40 ^{Ab}
Espessura parênquima paliçádico (µm)	139,02±8,89 ^{Aa}		82,66±4,34 ^{Bb}		109,99±7,04 ^{Bb}	
Espessura parênquima lacunoso (µm)	115,48±5,40 ^{Ab}		112,93±4,80 ^{Ba}		111,23±4,86 ^{Bb}	
Espessura total do mesofilo (µm)	262,61±15,00 ^A		183,59±5,47 ^C		221,37±10,99 ^B	
Espessura da folha (µm)	320,93±12,65 ^A		260,11±4,80 ^C		298,02±8,77 ^B	



PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY

An official journal of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB) and the French Society of Plant Biology (Société Française de Biologie Végétale (SFBV))

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

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



ISSN: 0981-9428

DESCRIPTION

Plant Physiology and Biochemistry publishes original theoretical, experimental and technical contributions in the various fields of **plant physiology (biochemistry, physiology, structure, genetics, plant-microbe interactions, etc.)** at diverse levels of integration (molecular, subcellular, cellular, organ, whole plant, environmental). Opinions expressed in the journal are the sole responsibility of the authors and publication does not imply the **editors'** agreement.

Plant Physiology and Biochemistry publishes several types of articles: Reviews, Papers and Short Papers. Articles for Reviews are either invited by the editor or proposed by the authors for the editor's prior agreement. Reviews should not exceed 40 typewritten pages and Short Papers no more than approximately 8 typewritten pages. The fundamental character of *Plant Physiology and Biochemistry* remains that of a journal for original results.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

AUDIENCE

Plant Physiologists.

IMPACT FACTOR

2014: 2.756 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
 Biochemistry and Biophysics Citation Index
 Elsevier BIOBASE
 CIAT
 CNRS/Pascal
 Chemical Abstracts
 Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences
 Current Contents/Life Sciences
 MEDLINE®
 GEOBASE
 Reference Update
 Research Alert
 SCISEARCH
 Science Citation Index
 Scopus
 EMBiology

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief

Mario De Tullio, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari, Italy
Zhen-Ying Huang, Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China

Associate Editor

Hiroshi Ezura, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan
Marcel Jansen, University College Cork, Cork, Ireland
Shivendra Sahi, Western Kentucky University, Bowling Green, Kentucky, USA

Editorial Advisory Board

R. Antunes de Azevedo, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, Brazil
E-M. Aro, University of Turku, Turku, Finland
H. Asard, Universiteit Antwerpen, Antwerpen, Belgium
M. Badiani, Università Mediterranea di Reggio Calabria, Reggio Calabria, Italy
R. Barbato, University of Piemonte Orientale, Alessandria, Italy
J. Barcelo, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Spain
B. Barna, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary
S. Baud, Institut J.P. Bourgin, Versailles, France
S. Biondi, Università di Bologna, Bologna, Italy
M.S. Buckeridge, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil
C. Buschman, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Karlsruhe, Germany
L.R. Ceci, National Research Council of Italy (CNR), Bari, Italy
P. Conklin, SUNY Cortland, Cortland, New York, USA
D.P. Dixon, Durham University, Durham, UK
I. Dodd, Lancaster University, Lancaster, England, UK
I. Feussner, Georg-August Universität Göttingen, Göttingen, Germany
A.M. Fischer, Montana State University, Bozeman, Montana, USA
F. Fodor, Eötvös Lorand University, Budapest, Hungary
A. Grover, University of Delhi South Campus, New Delhi, India
B. Hamberger, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark
P. Hatzopoulos, Agricultural University of Athens, Athens, Greece
J.D. Klein, Agricultural Research Organization (ARO), Bet Dagan, Israel
S-S. Kwak, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Daejeon, South Korea
E. Labrador, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain
A. Limami, Université d'Angers, Angers Cedex, France
Q-H. Ma, Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China
A.K. Mattoo, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Beltsville, Maryland, USA
J. Muschietti, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina
K. Overmyer, University of Helsinki, Helsinki, Finland
J. Papenbrock, Leibniz Universität Hannover, Hannover, Germany
C. Penel, Université de Genève, Geneva 4, Switzerland
J. Peralta-Video, University of Texas at El Paso, El Paso, Texas, USA

S. Roux, University of Texas, Austin, Texas, USA
L. Sanita' di Toppi, Università degli Studi di Parma, Parma, Italy
D. Serafini-Fracassini, Università di Bologna, Bologna, Italy
R. Serrano, Universitat Politècnica de València, Valencia, Spain
M.C. Suh, Chonnam National University, Buk-Gu, Gwangju, South Korea
A. Suzuki, Unite de Nutrition Azotee des Plantes, Versailles, France
J. Szopa, University of Wrocław, Wrocław, Poland
V. Todeschini, Università degli Studi del Piemonte Orientale, Alessandria, Italy
J.T.C. Tzen, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC
E. van Damme, Universiteit Gent, Gent, Belgium
K. Venema, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Granada, Spain
D-X. Zhou, Université Paris-Sud (Paris XI), Orsay, France

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Plant Physiology and Biochemistry publishes original theoretical, experimental and technical contributions in the various fields of plant physiology (biochemistry, physiology, structure, genetics, plant-microbe interactions, etc.) at diverse levels of integration (molecular, subcellular, cellular, organ, whole plant, environmental). Opinions expressed in the journal are the sole responsibility of the authors and publication does not imply the editors' agreement.

Types of issues

Alongside the standard issues, the journal publishes two other types of issues: *Special issues* and *Virtual special issues*. Special issues focus on a specific research topic and are organised by a guest editor. Virtual special issues bring together content already published on ScienceDirect. Articles appearing in virtual special issues have been selected by the Journal editor, highlighting topics that are of particular interest to the readers. The virtual issues are hosted on Elsevier.com, linking directly to the original articles on ScienceDirect.

Types of paper

Plant Physiology and Biochemistry publishes several types of articles: Reviews, Papers and Short Papers. Articles for Reviews are either invited by the editor or proposed by the authors for the editor's prior agreement. Reviews should not exceed 40 typewritten pages and Short Papers no more than approximately 8 typewritten pages. The fundamental character of *Plant Physiology and Biochemistry* remains that of a journal for original results.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration and verification

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

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <https://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

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

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

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

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

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 24 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

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

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

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

Article structure

Subdivisions- numbered sections,

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

Papers and Short Papers should be organized as follows: Introduction, Methods (divided), Results (divided and possibly subdivided), Discussion (possibly divided), Contributions and Acknowledgements. Contributions is a mandatory section where the authors should specify who did what in the study. An alternative presentation places under one heading Results and Discussion (with possible divisions and subdivisions); in this case, a formal Conclusion (10-15 lines, without bibliographic references) should be added. Reviews should be organized as follows: between an Introduction and a Conclusion, the subject is treated under headings, with possible subdivisions.

Methods should be written in such a way that a reader with experience could repeat the experiment. When the techniques are not original they should be simply indicated by the appropriate reference. The exact taxonomic name (genus, species, authority and cultivar where appropriate) of any material used must be shown (e.g. *Vicia faba* L.). Likewise, enzymes must be identified according to Enzyme Nomenclature, e.g. malate dehydrogenase (L-malate:NAD- oxidoreductase; EC 1.1.1.37). All experimental results must first appear in Results, concisely and without duplication of data between tables and figures. No new results should be presented in the Discussion. However, tables and figures derived from the results (e.g. comparisons, schemes, models) may be introduced in order to aid discussion or to generalize conclusions.

Appendices

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

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

Abstract as a single paragraph (maximum: 250 words). The abstract must indicate the object of the work, the material (with full taxonomic name) and the essential results. Any abbreviations must be defined therein. Enzymes are identified with official nomenclature (EC). No references are to be cited.

Graphical abstract

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

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

Highlights

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

Keywords

Keywords (7 maximum) and definition of abbreviations appearing in any part of the manuscript, in alphabetic order. An abbreviation is in part justified by its frequent use; where a term seldom appears in the article, it is preferably written in full even if commonly abbreviated.

Abbreviations

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

Acknowledgements

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

Nomenclature and units

At its first mention in the main text, and also in the Abstract and Methods, a material or an enzyme must be identified by the official nomenclature. Subsequently a simplified form may be used, e.g. V. *faba*, malate dehydrogenase (or even MDH if defined under Abbreviations). The 'chapter headings' are numbered according to the international numbering system (1.; 1.1.; 1.1.1.; etc.).

'Tables' with titles and 'figures' with captions should be placed on separate sheets at the end of the manuscript. They should not appear in the text.

Punctuation rules of the English language should be used (semi-colons, colons, question marks and exclamation marks are never preceded by a space in English). Abbreviations are punctuated. There is no space between brackets and the enclosed words, whatever the language. Small capitals should not be used, and normal capitals are accented. Italics for common Latin expressions (*in vivo*, *in vitro*, *et al.*, *via*, etc.) are not to be used.

Do not begin a sentence with a number, or if necessary, spell it out. Begin all paragraphs with an indent.

Write buffers: 0.3 M phosphate buffer (pH 7.2). Write ions: Ca^{2+} and not Ca^{++} .

Write mixtures: methanol/chloroform/water (12/5/4, v/v/v).

Structural formulae of organic chemicals generally have to be drawn and so constitute figures.

Use throughout the form: $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ rather than the ambiguous notations $\mu\text{L}/\text{h}\cdot\text{mg}$ or $\mu\text{L}/\text{h}/\text{mg}$.

Use absolute units, choosing dimensions that obviate power of 10; for instance 5 mM rather than $5 \times 10^{-3} \text{ M}$; 0.5 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (or 500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) rather than 50 $\text{mg}/100 \text{ g}$. Do not confuse quantity [mole, micromole (mol, μmol)] with concentration [molar, micromolar (M, μM)] and weight [gram (g)] with force due to centrifugation [gravity ($\times g$)].

Certain current abbreviations may be used without definition, e.g. ATP, NAD, DNA. In other cases (e.g. CAM, IAA, EDTA, GA) define the abbreviations (on the third page of the manuscript) in order to avoid ambiguity.

The SI units and their derivatives are to be applied over former terms [Pa and bar and not atm (100 kPa = 1 bar); Bq replaces Ci (1 Ci = 3.7×10^{10} Bq); J replaces cal (1 cal = 4185 J); kat (conversion of one mole of substrate per second) replaces IU (1 IU = 16.7 nkat)].

Authors are free to choose whether to use relative molecular mass (a pure number), or molar mass ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), or molecular mass (Da), with the same unit in each case. Unit abbreviations neither take a full stop nor change in the plural.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
 - Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
 - Number the illustrations according to their sequence in the text.
 - Use a logical naming convention for your artwork files.
 - Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
 - For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
 - Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.
- A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

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

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

Formats

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

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

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

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

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

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.

- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

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

Figure captions

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

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

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

Web references

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

References in a special issue

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

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/plant-physiology-and-biochemistry>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference Style

All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by "et al." and the year of publication.

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

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

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

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Papers should contain no more than 40 references, and Reviews no more than 80.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly

as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Interactive Phylogenetic Trees

You can enrich your online articles by providing phylogenetic tree data files (optional) in Newick or NeXML format, which will be visualized using the interactive tree viewer embedded within the online article. Using the viewer it will be possible to zoom into certain tree areas, change the tree layout, search within the tree, and collapse/expand tree nodes and branches. Submitted tree files will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. Each tree must be contained in an individual data file before being uploaded separately to the online submission system, via the 'phylogenetic tree data' submission category. Newick files must have the extension .new or .nwk (note that a semicolon is needed to end the tree). Please do not enclose comments in Newick files and also delete any artificial line breaks within the tree data because these will stop the tree from showing. For NeXML, the file extension should be .xml. Please do not enclose comments in the file. Tree data submitted with other file extensions will not be processed. Please make sure that you validate your Newick/NeXML files prior to submission. For more information please see <https://www.elsevier.com/phylogenetictrees>.

Submission checklist

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

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

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

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

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

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

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

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

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

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <https://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <https://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>