



**Márcia Filipa Lima  
Araújo**

**Plasticidade de *Moringa oleifera* em resposta a  
alterações climáticas**

***Moringa oleifera* plasticity to face climatic changes**



## **DECLARAÇÃO**

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.





**Márcia Filipa Lima  
Araújo**

**Plasticidade de *Moringa oleifera* em resposta a  
alterações climáticas**

***Moringa oleifera* plasticity to face climatic changes**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Celeste Pereira Dias, Bolseira de Pós-Doutoramento do Centro de Ecologia Funcional da Universidade de Coimbra e do QOPNA da Universidade de Aveiro e orientação da Professora Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos, Professora Catedrática da Universidade do Porto.



aos meus pais e ao meu avô





## **o júri**

presidente

**Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira**  
Professor Associado c/ Agregação, Universidade de Aveiro

arguente

**Doutora Sónia Marina Pinto Nunes da Silva**  
Bolsista de Pós-Doutoramento, Universidade de Aveiro

orientadora

**Doutora Maria Celeste Pereira Dias**  
Bolsista de Pós-Doutoramento, Universidade de Aveiro



## agradecimentos

À professora Conceição Santos agradeço por desde o primeiro momento me ter recebido tão bem com um 'Bem-vinda!', pela oportunidade de me deixar trabalhar na sua equipa assim como por todos os conhecimentos transmitidos e por ter estado sempre presente mesmo estando sempre tão ocupada. Pela dedicação e vontade de ensinar constantes. Obrigada.

À Celeste devo agradecer todos os conhecimentos científicos e práticos transmitidos desde o primeiro dia. Agradeço também por sempre ter acreditado na minha capacidade de trabalho e dedicação e por me ter dado tantas oportunidades de aprendizagem ao longo deste ano. Obrigada pelas chamadas de atenção constantes que me ajudaram a evoluir enquanto aspirante a cientista. Obrigada pelo enorme contributo para a realização deste trabalho.

À Maria agradeço por me ter introduzido ao mundo das plantas medicinais, em concreto em *Moringa oleifera*. Por me ter fornecido as sementes para a realização deste trabalho e me ter ensinado a melhor forma de tratar as plantas, assim como por me ter ajudado em algumas partes práticas.

Ao António agradeço por ter sido sempre tão prestável, especialmente nos primeiros tempos de laboratório. Às minhas compinchas de laboratório, Rita e Catarina, pela amizade e por terem estado sempre presentes em todas as alturas. À Verónica e à Fernanda por ajudarem a manter a boa disposição mesmo nas piores alturas e por terem sempre uma palavra de incentivo. À Filipa pela partilha do mesmo entusiasmo quanto a *Moringa*.

À Doutora Sónia Silva por ter perdido tempo a ensinar-me alguns protocolos. Ao Doutor Miguel Oliveira pelos ensinamentos transmitidos, assim como pela boa disposição constantes e pela imensa paciência para as minhas dúvidas. À Doutora Helena Oliveira por me ter transmitidos conhecimentos de citometria e por ter sempre uma palavra de incentivo.

Aos professores José Moutinho-Pereira e Carlos Correia da UTAD por se terem mostrado sempre tão prestáveis nas dúvidas e na realização de parte deste trabalho. Obrigada.

À professora Maria de Lourdes Pereira, diretora do Mestrado, agradeço por ter estado sempre presente ao longo destes dois anos de curso e por estar sempre disponível para todas as questões dos alunos.

Agradeço também aos amigos de sempre por apesar de longe estarem sempre lá, assim como às amigas que fiz ao longo deste percurso pela academia de Aveiro.

À minha família por estarem sempre presentes e porque sem eles este trabalho não teria sido possível. Obrigada mãe e pai.

Ao André agradeço o incentivo constante, a paciência, a dedicação, a confiança, a compreensão e o apoio que me dá em cada momento.



## palavras-chave

*Moringa oleifera*, alterações climáticas, UVB, déficit hídrico, ROS, stress oxidativo, fisiologia vegetal, seca, stress abiótico

## resumo

Fatores abióticos extremos, como a seca combinada com ondas de calor e/ou elevada radiação UVB estão previstas tornarem-se mais frequentes no futuro. O impacto na produção agrícola destes desafios em *Moringa oleifera* L. permanece desconhecido. A suscetibilidade desta espécie pode levar ao aumento da pobreza em regiões em perigo. *M. oleifera* é uma espécie lenhosa nativa da região abaixo dos Himalaias que se encontra sob alta pressão climática. O interesse nesta espécie é emergente devido às suas várias propriedades medicinais e ao seu valor nutricional. Também a indústria agro-farmacêutica está interessada nesta espécie. Para perceber o impacto do aumento dos fatores climáticos, plantas jovens (2 meses) desta espécie foram expostas a déficit hídrico (WD) e UVB (sozinho ou combinado). A imposição a WD e a WD+UVB consistiu em não regar durante 4 dias. Após 1 dia sem regar, os tratamentos UVB e WD+UVB foram irradiados com  $26.3 \text{ kJ m}^{-2}$  distribuídos por 3 dias. Imediatamente após a exposição ao tratamento (1 dia) e após 10 dias, o estado hídrico da planta, o crescimento, o metabolismo do carbono e o stress oxidativo foram analisados. No geral não foram observadas diferenças em WD, em relação aos parâmetros analisados, exceto nas trocas gasosas, MDA e fenóis. As plantas expostas a UVB mostraram, em geral, efeitos mais severos, como elevado conteúdo em pigmentos, MDA e permeabilidade membranar, enquanto não foram observadas alterações na atividade antioxidante total. Plantas expostas a WD+UVB, apesar das alterações observadas, o impacto foi menor que o observado nas plantas expostas a UVB, significando que um mecanismo de proteção/adaptação foi desenvolvido nas plantas sobre stress combinado. Por outro lado, em todos os tratamentos a taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  diminuiu. Os resultados sugerem que *M. oleifera* apresenta alguma tolerância a WD e a UVB, e que desenvolveu um mecanismo de adaptação a estes dois tipos de stress que frequentemente surgem combinados sob um cenário de alterações climáticas.



**keywords**

*Moringa oleifera*, climate changes, UVB, water deficit, ROS, oxidative stress, plant physiology, drought, abiotic stress

**abstract**

Extreme abiotic factors, such drought combined with heat waves and/or high UVB radiation are predicted to become more frequent in the future. The impact on plant production of these challenges on multipurpose *Moringa oleifera* L. remains unclear. A susceptibility of this species may lead to increase poverty in endangered regions. *M. oleifera* is a woody species native from sub-Himalaya regions under high climate stress pressure. The interest on this species is emerging due to its several medicinal properties and its nutritional value. Agro-pharmaceutical industry is interest in this species too. To understand the impact of increased climate factors, young (2 months old) plants of this species were exposed to water deficit (WD) and UVB (alone or combined). WD and WD+UVB imposition consists of unwater for 4 days. After 1 day withholding water, UVB and WD+UVB were irradiated with 26.3 kJ m<sup>-2</sup> distributed per 3 days. Immediately after treatment exposition (1 day) and after 10 days, plant water status, growth, carbon metabolism and oxidative stress were measured. Overall no significant differences were observed in WD, regarding the parameters analysed, except on gas exchanges, MDA and phenols. The plants exposed to UVB showed, in general, more severe effects, as higher pigment content, MDA and membrane permeability, while no changes were observed in the total antioxidant activity. Plants exposed to UVB+WD, despite changes observed, the impact was lower than the one observed in UVB exposed plants, meaning that a protective/adaptive mechanism was developed in the plants under combined stressors. On the other hand, in all treatments the net CO<sub>2</sub> assimilation rate decreased. Results suggest that *M. oleifera* has some tolerance to WD and UVB, and that develops mechanism of adaptation to these two types of stress that often arise in combination under a climate change scenario.





# Índice

júri.....	ix
agradecimentos.....	xi
resumo.....	xiii
abstract.....	xv

índice de figuras.....	xxiii
índice de tabelas.....	xxv
abreviaturas.....	xxvii

<b>Capítulo I.....</b>	<b>1</b>
------------------------	----------

<b>Enquadramento.....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

1. Enquadramento.....	3
1.1. Alterações climáticas.....	3
1.2. Influencia das alterações climáticas em plantas.....	4
1.2.1. UVB.....	4
1.2.1.1. Efeitos dos UVB nas plantas.....	5
1.2.2. Seca/Défice Hídrico.....	7
1.2.2.1. Efeitos da Seca/Défice Hídrico nas plantas.....	8
1.2.3. Mecanismos de defesa e/ou adaptação a UVB e a seca/défice hídrico.....	10
1.3. Espécie em estudo: <i>Moringa oleifera</i> L.....	11
1.4. Objetivos da dissertação.....	14
Referências.....	15



<b>Capítulo II</b> .....	21
<b>Plasticity of young <i>Moringa oleifera</i> L. to face combined and isolated water deficit and UVB radiation challenges</b> .....	21
Abstract .....	22
Keywords.....	22
Abbreviations.....	22
<b>1. Introduction</b> .....	23
<b>2. Material and Methods</b> .....	25
2.1. Material and experimental conditions.....	25
2.2. Plant growth and water status.....	26
2.3. Carbon metabolism .....	27
2.3.1. Chlorophyll a fluorescence and gas exchange .....	27
2.3.2. Pigments quantification.....	27
2.3.3. Total soluble sugar (TSS) and starch content .....	27
2.4. Oxidative stress.....	28
2.4.1. Determination of cell membrane permeability and lipid peroxidation .....	28
2.4.2. Determination of superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities .....	28
2.4.3. Phenols and total antioxidant activity (TAA) .....	28
2.4.3.1. Quantification of phenols .....	29
2.4.3.2. Total antioxidant activity – ABTS scavenging assay .....	29
2.5. Statistical analysis.....	29
<b>3. Results</b> .....	30
3.1. Plant Growth and Water Status.....	30
3.2. Carbon metabolism .....	30
3.2.1. Chlorophyll a fluorescence and gas exchange .....	30
3.2.2. Pigments and Carbohydrates .....	33
3.3. Oxidative stress.....	33
3.3.1. Cell membrane permeability and lipid peroxidation .....	33
3.3.2. Enzymatic and antioxidant activities .....	36
<b>4. Discussion</b> .....	39



Authors' Contribution .....	43
Acknowledgements .....	43
<b>References</b> .....	43
<b>Capítulo III</b> .....	47
<b>Considerações Finais</b> .....	47
1. Considerações Finais .....	49
<b>Anexos</b> .....	51
Anexo I – Comunicação Oral .....	54
Anexo II – Comunicação Poster .....	55



## índice de figuras

### Capítulo I – Enquadramento

Figura 1–1   Espectro eletromagnético com a componente UV (Fonte: Soehnge et al., 1997). .....	5
Figura 1–2   Ciclo de Calvin (Fonte: Jones, 2010). .....	9
Figura 1–3   A - Espécies do género <i>Moringa</i> , de acordo com Mahmood et al. (2010). B – <i>Moringa oleifera</i> . .....	12
Figura 1–4   Distribuição Mundial de <i>Moringa oleifera</i> . Esta espécie pode ser encontrada nos países assinalados a cinzento claro. Mapa baseado nos trabalhos de Rivas et al. (2013), Luqman et al. (2012), Anwar et al. (2007), Anwar & Bhanger (2003), Division et al. (1999), Muyibi & Evison (1995), Ramachandran et al., (1980) e dados recolhidos em várias fontes electrónicas. ....	13

### Capítulo II - Plasticity of young *Moringa oleifera* to face combined and isolated water deficit and UVB radiation challenges

Figure 1. Net CO <sub>2</sub> assimilation rate (A), stomatal conductance (B), ratio between intercellular and atmospheric CO <sub>2</sub> concentration (C) and transpiration rate (D) in <i>M. oleifera</i> plants under control conditions, WD, UVB and WD+UVB. Values are mean ± standard error ( $n = 6 - 14$ ). Different letters indicate statistical differences between treatments ( $p \leq 0.05$ ). .....	32
Figure 2. Effects of WD, UVB and WD+UVB on Chlorophyll <i>a</i> (A), Chlorophyll <i>b</i> (B) and Carotenoids (C) contents of <i>M. oleifera</i> plants (1 and 10 days after the end of stress. Values are mean ± standard error ( $n = 5 - 15$ ). Different letters indicate statistical differences between treatments ( $p \leq 0.05$ ). .....	34
Figure 3. Effect of WD, UVB and WD+UVB on total soluble sugars (A) and starch (B) content of <i>M. oleifera</i> (1 day and 10 days after the end of stress imposition). Values are mean ± standard error ( $n = 5 - 12$ ). Different letters indicate statistical differences between treatments ( $p \leq 0.05$ ). .....	35
Figure 4. Effects of WD, UVB and WD+UVB on the electrolyte leakage (A), MDA content (B), phenols content (C) and ABTS of <i>M. oleifera</i> plants (1 and 10 days after the end of stress imposition). Values are mean ± standard error ( $n = 4 - 12$ ). Different letters indicate statistical differences between treatments ( $p \leq 0.05$ ). .....	37





## índice de tabelas

### Capítulo II - Plasticity of young *Moringa oleifera* to face combined and isolated water deficit and UVB radiation challenges

Table 1. Experimental conditions. Plant distribution between groups. ....	26
Table 2. Effects of WS, UVB and WS+UVB conditions (1 day and 10 days after stress) on plant growth, RWC and chlorophyll <i>a</i> fluorescence parameters in <i>M. oleifera</i> leaves. Values are mean ± standard error (RWC: n = 3 – 12; n = 5 –16 for the other parameters). Different letters indicate statistical differences between treatments ( $p \leq 0.05$ ). ....	31
Table 3. Effects of WD, UVB and WD+UVB on SOD, CAT and GR activities in <i>M. oleifera</i> plants (1 and 10 days after the end of stress imposition). Values are mean ± standard error (n = 3 – 11). Different letters indicate statistical differences between treatments ( $p \leq 0.05$ ).....	38



## **abreviaturas**

A, taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>;  
ABTS, ácido 2,20-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico);  
APX, ascorbato peroxidase;  
ATP, adenosina trifosfato;  
CAT, catalase;  
Chl, clorofila;  
 $C_i/C_a$ , ratio entre a concentração de CO<sub>2</sub> intercelular e atmosférico;  
CO<sub>2</sub>, dióxido de carbono;  
E, taxa de transpiração;  
 $F_v/F_m$ , máxima eficiência do fotossistema II;  
FW, peso fresco;  
F<sub>0</sub>, rendimento mínimo da fluorescência;  
GR, glutationa reductase;  
 $g_s$ , condutância estomática;  
MDA, malondialdeído;  
PAR, radiação fotossinteticamente ativa;  
PPFD, densidade de fluxo fotónico fotossintético;  
PSI, fotossistema I;  
PSII, fotossistema II;  
ROS, espécies reativas de oxigénio;  
RuBisCO, ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase;  
RWC, teor relativo de água;  
SOD, superóxido dismutase;  
TBA, ácido triclorobarbitúrico;  
TCA, ácido tricloroacético;  
TSS, açúcares solúveis totais;  
O<sub>3</sub>, ozono;  
UVA, radiação ultravioleta A;  
UVB, radiação ultraviolet B;  
UVC, radiação ultravioleta C;  
WD, défice hídrico;  
WD+UVB, défice hídrico e radiação ultraviolet B.



# **Capítulo I**

## **Enquadramento**



## 1. Enquadramento

### 1.1. Alterações climáticas

Atualmente vive-se num mundo cada vez mais global, fazendo cada um de nós parte deste. Com a globalização temos, praticamente em tempo real, informações do que está a acontecer em todo o mundo. Por isso, hoje é frequente nos chegarem notícias sobre o estado do clima, seja porque existem cheias em determinada região do planeta, seja porque está-se a passar por uma época de seca noutra. Também o número de notícias que nos chegam sobre danos solares é maior [ex. aumento da incidência de cancro da pele (“WHO | Skin cancers,” n.d.)], estes geralmente provocados pela incidência de raios ultravioletas (UV’s). Este tipo de notícias ocorre porque o ser humano desde a revolução industrial que tem vindo a sobre explorar os recursos da Terra, aumentando por isso os níveis de CO<sub>2</sub> (IPCC, 2013).

De acordo com o relatório ‘*World Population Prospects: The 2015 Revision*’ prevê-se que a população humana atinja os 9.7 biliões em 2050 e 11.2 biliões em 2100, o que sem medidas sérias de controlo de emissões de gases para a atmosfera, se possa prever que estes venham a aumentar, aumentando por isso o efeito de estufa (IPCC, 2013). Gases como CO<sub>2</sub>, metano, protóxido de azoto (N<sub>2</sub>O) e os clorofluorocarbonetos (CFC’s) são lançados na atmosfera e geram um efeito de estufa (IPCC, 2013). O lançamento deste tipo de gases para a atmosfera, nomeadamente os CFC’s, fizeram com que estes reagissem com o ozono (O<sub>3</sub>), levando a uma diminuição considerável deste último. Assim, sob a alçada da ONU<sup>1</sup>, foi assinado o protocolo de Montreal, com o intuito de proteger a camada de ozono. Atualmente, a emissão de gases prejudiciais à camada de ozono tem vindo a diminuir, o que faz com que esta se mantenha estável e tenda a aumentar (McKenzie et al., 2011).

Uma das principais preocupações da diminuição da camada de ozono é a radiação que consegue chegar à crosta terrestre, como a radiação ultravioleta. Sabe-se que esta pode ter consequências tanto para o ambiente como para a saúde humana (McKenzie et

---

<sup>1</sup> ONU, Organização das Nações Unidas

al., 2011). Também devido aos gases com efeito de estufa, a temperatura do planeta tem vindo a aumentar (McKenzie et al., 2007), fazendo com que em determinadas regiões do globo hajam ocorrências de seca, o que leva a um fluxo migratório das populações pobres, em busca de melhores condições para poderem cultivar as suas plantações (Gray and Mueller, 2012).

Assim, é de elevada importância, percebermos de que forma as plantas, como seres vivos que se encontram na base da cadeia trófica, reagem às alterações do clima. Se será possível obter o mesmo rendimento ou se mantêm as mesmas características, por exemplo.

## 1.2. Influência das alterações climáticas em plantas

As plantas estão na base das cadeias tróficas. Portanto são elas as responsáveis pela produção de biomoléculas capazes de alimentar todos os consumidores, além de contribuírem para a renovação de oxigénio na atmosfera.

Neste trabalho serão abordados os efeitos que a radiação ultravioleta (UVB), e a seca/défice hídrico poderão ter ao nível das plantas, as consequências no seu rendimento assim como de que forma se poderão estudar esses efeitos, ou seja, quais os parâmetros a ter em conta quando se pretende estudar de que forma reagem as plantas a alterações abióticas.

### 1.2.1. UVB

Existem três tipos de radiação ultravioleta que têm como base o comprimento de onda: UVA, 315 – 390 nm; UVB, 280 – 315 nm; e, UVC,  $\leq$  280 nm (Zhang et al., 2013) (Figura 0–1). Destes, apenas uma parte dos UVB e grande parte dos UVA conseguem passar pela camada de ozono enquanto os UVC ficam praticamente todos retidos nela (Zhang et al., 2013).

A radiação UV tem impacto nas plantas, afetando o seu desenvolvimento e a sua fisiologia (Zhang et al., 2013). Os UVA e UVB fornecem informação sobre o estado da luz, permitindo o seu normal desenvolvimento (Verdaguer et al., 2012). O aumento da radiação



ultravioleta tem diversos efeitos na morfologia, fisiologia e desenvolvimento das plantas (Hofmann and Campbell, 2012; Sangtarash et al., 2009). Os três principais alvos deste tipo de radiação são a fotossíntese, as membranas e o material genético (Sangtarash et al., 2009). Quando se verifica um aumento da radiação UVB, esta pode levar a danos no aparelho fotossintético ou no material genético (ácidos nucleicos) que em conjunto levam a um aumento do stress oxidativo (Verdaguer et al., 2012). Como resposta as células da planta têm mecanismos de defesa que incluem, por exemplo, o aumento de pigmentos que filtrem os UV's, o aumento da capacidade antioxidante e a acumulação de compostos fenólicos (Pristov et al., 2013; Schmitz-Hoerner and Weissenböck, 2003).

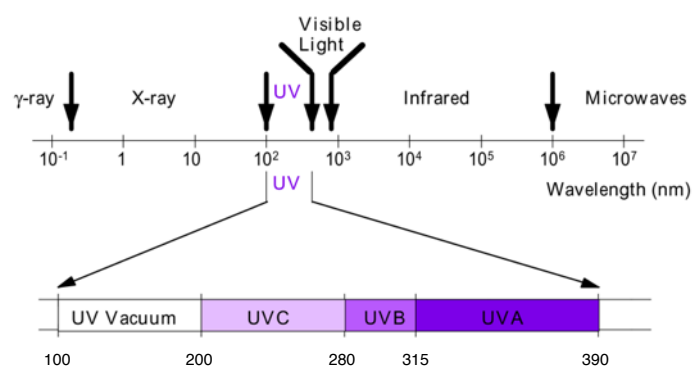


Figura 0–1 | Espectro eletromagnético com a componente UV (adaptado de: Soehnge et al., 1997).

#### 1.2.1.1. Efeitos dos UVB nas plantas

A radiação UVB pode provocar diversas alterações nas plantas. Um dos alvos deste tipo de radiação é o DNA, resultando em alterações na cadeia de DNA, que podem causar mutações durante a sua replicação, como por exemplo a formação de quebras na cadeia de DNA ou a inserção ou deleção de pares de bases (Hollósy, 2002). Assim como a cadeia de DNA é afetada pelo comprimento de onda dos UVB, também os aminoácidos e as proteínas o são. As proteínas apresentam um pico de absorção a 280 nm, região UVB, o que faz com que diversos aminoácidos possam ser alvos diretos da radiação UV (Hollósy, 2002; Nawkar et al., 2013). Se os aminoácidos sofrerem modificações ou até se forem destruídos, isso terá consequências ao nível proteico, podendo levar à inativação de proteínas, incluindo proteínas com funções enzimáticas, o que poderá também ter

---

consequências ao nível da progressão ao longo do ciclo celular, podendo-o atrasar (Biever et al., 2014; Hollósy, 2002). Estas alterações no DNA e nas proteínas podem ser a causa de modificações no crescimento da planta, assim como do seu desenvolvimento em geral (Hollósy, 2002).

Os lípidos também são afetados por este tipo de radiação. Os ácidos gordos insaturados, presentes quer nos fosfolípidos quer nos glicolípidos, são destruídos pelos UVB na presença de oxigénio - peroxidação lipídica – fazendo com que percam a sua estrutura e a sua função (Hollósy, 2002). O malondialdeído (MDA) é um dos produtos resultantes da peroxidação lipídica e, é usado para se medir a peroxidação (Hollósy, 2002).

Os efeitos dos UVB são prejudiciais no aparelho fotossintético, nomeadamente na estrutura membranar do tilacoide, que contém várias proteínas e complexos proteína-pigmento, o que aumenta a permeabilidade iónica (Hollósy, 2002). Esta alteração na permeabilidade iónica pode ter consequências nas células guarda, uma vez que a perda de iões potássio pode ser a responsável pela perda de condutância estomática em plantas irradiadas por UVB (Hollósy, 2002).

Os UVB induzem danos na ultraestrutura dos cloroplastos e modificações nos pigmentos fotossintéticos, podendo até levar à sua destruição, o que leva a uma redução da capacidade fotossintética, reduzindo assim a fotossíntese (Hollósy, 2002; Kakani et al., 2003). Tanto clorofilas como carotenoides são afetados pela radiação UVB, no entanto os carotenoides são menos afetados do que as clorofilas (Hollósy, 2002). Também foi observado que este tipo de radiação reduz mais a quantidade de clorofila *b* do que de clorofila *a* (Hollósy, 2002). A redução das clorofilas é devida à quebra estrutural dos cloroplastos quando expostos a UVB (Kakani et al., 2003).

A resposta das plantas a UVB não é sempre a mesma, variando com a espécie ou até mesmo com o cultivar (Hollósy, 2002) podendo aumentar, diminuir ou até não existir qualquer efeito no conteúdo em clorofilas (Sangtarash et al., 2009). Um estudo de revisão de Kakani e colegas (2003) aponta que a redução da quantidade de clorofilas é diferente nas espécies agrícolas, variando entre menos de 10% e 70%, sendo maior essa redução nas dicotiledoneas do que em monocotiledoneas.

Nas plantas com sensibilidade aos UVB, o aparelho fotossintético é um dos alvos principais desta radiação, sendo que danos aqui vão contribuir significativamente para todos os danos provocados por este comprimento de onda (Hollósy, 2002). A radiação UVB pode diretamente induzir uma série de acontecimentos, como, provocar danos ao nível dos fotossistemas, levar à diminuição da atividade da RuBisCO (Fedina et al., 2010), diminuir

a fixação de CO<sub>2</sub> ou reduzir a quantidade de amido e o conteúdo em clorofilas; pode, ainda, causar danos indiretos na fotossíntese como induzir o fecho estomático, reduzindo assim a eficiência das trocas gasosas ou causar mudanças morfológicas na estrutura da planta ou da folha, como, por exemplo, aumentando a espessura foliar (Barnes et al., 2013; Hollósy, 2002; Ryan and Hunt, 2005; Tsormpatsidis et al., 2008). Apesar de os UVB poderem induzir o fecho estomático e com isso diminuir a condutância estomática isso não parece ser um fator limitante para a assimilação de CO<sub>2</sub> em algumas espécies agrícolas, como por exemplo o algodão (Kakani et al., 2003; Zhao et al., 2003). A radiação UVB tem mais impacto ao nível do fotossistema II (PSII, do inglês, *Photosystem II*) do que do PSI (Hollósy, 2002). Quando exposto a UVB, o PSII é o componente mais sensível da membrana do tilacoide no processo de fotofosforilação; já no ciclo de Calvin, este tipo de radiação reduz a quantidade e a atividade da RuBisCO (Kakani et al., 2003). Esta diminuição pode ser influenciada por modificações na cadeia peptídica, pela degradação da proteína e ainda pode estar relacionada com a diminuição da transcrição do gene da RuBisCO (Hollósy, 2002).

Estas alterações que se verificam ao nível interno da planta traduzem-se em alterações visíveis, como por exemplo, mudanças na cor e na forma das folhas (Kakani et al., 2003). As folhas apresentam sinais de clorose, seguidos de necrose que levam à abscisão foliar, estes sinais estão relacionados com a diminuição do conteúdo em clorofilas (Kakani et al., 2003).

### 1.2.2. Seca/Défice Hídrico

A seca/défice hídrico é um dos stresses ambientais mais importantes, afetando a produtividade agrícola em todo o Mundo, o que leva a que haja uma grande redução do rendimento das culturas (Dias et al., 2014; Rahdari and Hoseini, 2012). Em condições de seca/défice hídrico, o potencial hídrico e a turgescência das plantas é reduzido, o que faz com que estas não sejam capazes de desempenharem as suas funções normais, causando-lhes mudanças fisiológicas e morfológicas (Correia et al., 2014; Rahdari and Hoseini, 2012). A fotossíntese também é afetada, com a diminuição da abertura estomática as trocas gasosas ficam limitadas, o que pode levar à diminuição da disponibilidade de CO<sub>2</sub> nos espaços intercelulares e conseqüentemente à diminuição da assimilação de carbono, afetando assim a produtividade (Correia et al., 2014; Silva et al., 2010). Este tipo de stress

abiótico também é conhecido por levar à acumulação de espécies reativas de oxigénio (*ROS*, do inglês, *Reactive Oxygen Species*), o que leva a que hajam danos nas plantas devido ao stress oxidativo (Dias et al., 2014). A sobre produção de *ROS* estimula o sistema antioxidante das células, aumentando a atividade enzimática de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a ascorbato peroxidase (APX) ou a glutatona redutase (GR) (Zingaretti et al., 2013). Quando o sistema antioxidante é insuficiente no combate aos *ROS*, ocorre a oxidação de macromoléculas assim como danos nos lípidos das membranas (Dias et al., 2014; Rivas et al., 2013).

#### 1.2.2.1. Efeitos da Seca/Déficite Hídrico nas plantas

As plantas podem ser divididas de acordo com a sua resistência à falta de água, em estratégias de fuga, evitação e tolerância à seca (Chaves et al., 2003). Estas estratégias também estão relacionadas com o seu tipo de metabolismo. Este tipo de resposta não é estanque, podendo ser combinado o tipo de resposta (Chaves et al., 2003), uma vez que apresentam mecanismos de adaptação. As plantas que adotam a primeira estratégia, fuga à seca, são capazes de completar o seu ciclo de vida antes de ficarem sem água e, por isso, apresentam um elevado nível de plasticidade (Chaves et al., 2003). Este tipo de capacidade é de elevada importância principalmente em zonas áridas, onde a seca pode ser severa (Chaves et al., 2003).

Já as plantas que têm uma estratégia de evitação, conseguem evitar a desidratação dos seus tecidos mantendo o potencial hídrico o mais elevado possível ou tolerando potenciais hídricos baixos, o que envolve mecanismos de adaptação por parte das plantas, que passam por minimizar a perda de água e maximizar a sua captação (Chaves et al., 2003). Isto é possível maximizando o fecho estomático, reduzindo a absorção de radiação e aumentando a reflectância das folhas através de uma densa camada de tricomas ou aumentando o ângulo das folhas (Falster and Westoby, 2003); ou ainda, diminuindo a área de exposição, reduzindo o crescimento foliar e aumentando a abscisão das folhas mais velhas; aumentando o investimento em raízes, também permite minimizar a desidratação e aumentar a captação de água (Chaves et al., 2003). As folhas que conseguem sobreviver à seca geralmente apresentam taxas de fotossíntese maiores e uma quantidade maior de RuBisCO por área foliar do que folhas com a mesma idade mas cujas plantas foram bem

irrigadas, além disso, estas folhas tornam-se numa fonte de carbono com um tamanho menor do que as folhas que crescem bem irrigadas (Chaves et al., 2003).

As plantas que conseguem tolerar seca, apresentam um baixo potencial hídrico nos seus tecidos o que pode envolver um ajuste osmótico, paredes celulares mais rígidas ou células mais pequenas (Chaves et al., 2003). Árvores e arbustos de zonas áridas ou semi-áridas combinam elevada concentração de solutos nas suas células com baixa capacidade fotossintética e baixa condutância estomática; além disso, as suas folhas são esclerófilas (Chaves et al., 2003).

A seca ou défice hídrico produzem na planta uma série de alterações. O metabolismo é alterado, iniciando-se, por isso, uma cascata de alterações metabólicas (Flexas et al., 2006; Zingaretti et al., 2013) que incluem a inibição da fotossíntese (Flexas et al., 2006) através do fecho estomático (Bota et al., 2004) e da baixa condutância do mesófilo (Flexas et al., 2006). Os estomas fecham, de modo a limitar a perda de água por transpiração (Chaves et al., 2003), acabando também por limitar as trocas gasosas (Zingaretti et al., 2013). A falta de disponibilidade de água pode levar a que haja uma diminuição da assimilação de  $\text{CO}_2$  por parte das folhas, levando a que haja menor disponibilidade de ATP e assim diminuir a quantidade de ribulose-1,5-bisfosfato (Chaves et al., 2003; Zingaretti et al., 2013) e conseqüentemente, leva à diminuição da atividade da

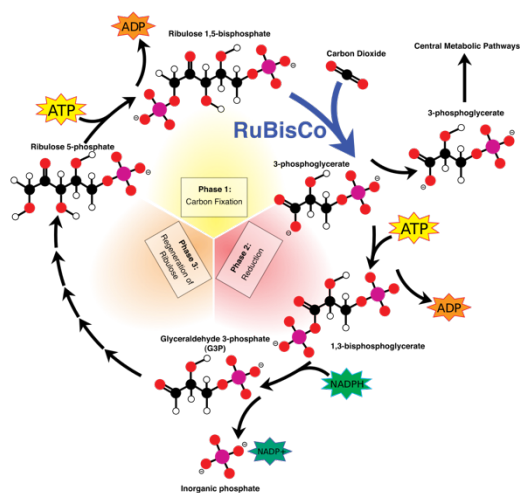


Figura 0–2 | Ciclo de Calvin (Fonte: Jones, 2010).

RuBisCO (Flexas et al., 2006) (Figura 0–2). No entanto, a diminuição da atividade da RuBisCO pode não ser a causa da redução da atividade fotossintética, uma vez que a presença desta enzima possibilita a recuperação assim que a planta é re-hidratada (Flexas et al., 2006). Além disso, a atividade desta enzima parece variar com a espécie em estudo e a intensidade do stress, podendo haver uma drástica redução da sua atividade ou não existir qualquer efeito (Flexas et al., 2006).

Plantas sujeitas a seca/défice hídrico também podem ver a eficiência fotoquímica do PSII reduzida, assim como alterações na quantidade de pigmentos (Zingaretti et al., 2013). As clorofilas *a* e *b* passam a apresentar níveis reduzidos assim como os carotenoides. Estes pigmentos (carotenoides) que têm um papel importante no sistema de

defesa antioxidante, podem passar a funcionar como pigmento acessório para a fotossíntese (Zingaretti et al., 2013).

Face à desidratação, as plantas passam a acumular uma série de solutos nas suas células, solutos esses que têm um papel importante na osmoregulação celular, permitindo assim a retenção de água impedindo a desidratação. Açúcares, prolina, glicina-betaína, são alguns dos osmolitos que podem ser encontrados nas células de plantas sob stress hídrico (Chaves et al., 2003; Lipiec et al., 2013; Shvaleva et al., 2006; Yong et al., 2006). Além desta acumulação de osmolitos também há acumulação de *ROS* (Dias et al., 2014; Shvaleva et al., 2006; Yong et al., 2006).

Os *ROS*, além de causarem stress oxidativo, também são importantes na sinalização celular, uma vez que levam ao aumento da atividade de enzimas capazes de detoxificar a célula, como por exemplo a SOD, a CAT ou a GR (Shvaleva et al., 2006). O stress oxidativo leva à peroxidação lipídica, oxidação de proteínas assim como à modificação de bases azotadas do DNA (Shvaleva et al., 2006).

### 1.2.3. Mecanismos de defesa e/ou adaptação a UVB e a seca/défice hídrico

As plantas têm mecanismos de proteção e adaptação muito similares face aos diversos fatores abióticos a que podem ser sujeitas, no entanto também apresentam mecanismos/adaptações mais específicas face ao stress imposto, que depende da especificidade da espécie em estudo.

A resposta aos UVB é específica de cada espécie, no entanto, é comum a espessura das folhas aumentar, devido ao aumento do número de células de parênquima esponjoso (Kakani et al., 2003); o conteúdo em ceras também aumenta, de modo a proteger a planta do excesso de radiação UVB (Sathiyakumar et al., 2011; Verdaguer et al., 2012).

O balanço entre os danos que esta radiação causa na planta e a forma que esta consegue reparar esses danos, demonstram se determinada espécie é ou não sensível ao comprimento de onda dos UVB (Hollósy, 2002). Este tipo de radiação produz na célula *ROS* que são combatidas através de processos complexos que envolvem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Hideg et al., 2013; Hollósy, 2002; Nawkar et al., 2013). A produção de *ROS* também é verificada em plantas sujeitas a stress hídrico (Chaves et al., 2003; Kar, 2011).

As plantas na presença de *ROS* criam uma dinâmica celular para a sua eliminação, que implicam antioxidantes como compostos fenólicos e carotenoides, que também apresenta funções antioxidantes (Hideg et al., 2013).

Os *ROS* compreendem uma série de radicais livres, como radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), radical perhidroxilo ( $HO_2^{\bullet}$ ) e radicais alcoxi ( $RO^{\bullet}$ ), e formas moleculares (não-radicais) de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e singletos de oxigénio ( $^1O_2$ ) (Gill and Tuteja, 2010).

As enzimas têm um papel muito importante na eliminação de *ROS*, tendo a SOD um papel importantíssimo, ela é capaz de converter radicais superóxido em peróxido de hidrogénio (Hollósy, 2002). Esta enzima pode ser encontrada tanto no citosol, nos cloroplastos como nas mitocôndrias, variando apenas o cofator metálico entre ela (Cu/Zn no citosol, Fe e/ou Cu/Zn nos cloroplastos e Mn na mitocôndria) (Hollósy, 2002). Em associação com a SOD, outras enzimas também atuam na eliminação de *ROS*, como APX, dehidroascorbato redutase, glutathione peroxidase, GR e a CAT (Hideg et al., 2013).

As plantas apresentam mecanismos de adaptação aos UVB, como por exemplo, aumentando a produção de metabolitos secundários (Kakani et al., 2003). Metabolitos secundários como, compostos fenólicos e flavonoides são acumulados na epiderme da folha criando uma barreira de proteção contra a radiação UVB (Kakani et al., 2003). Quando as plantas crescem com condições em que a razão da radiação fotossinteticamente ativa (PAR, do inglês, *Photosynthetically Active Radiation*) e a radiação UVB é baixa (PAR/UVB) as plantas acumulam mais compostos absorventes de UVB (Kakani et al., 2003).

Medir a atividade de enzimas, assim como da atividade antioxidante total, são métodos indiretos que nos permitem perceber os níveis de *ROS* e assim entender o grau de severidade do stress imposto (Hideg et al., 2013). No entanto, a interpretação dos dados nem sempre é uma tarefa simples, uma vez que depende sempre da espécie em estudo assim como da idade das plantas (Hideg et al., 2013).

### 1.3. Espécie em estudo: *Moringa oleifera* L.

*Moringa oleifera* L. também conhecida por *M. pterygosperma* Gaertn. pertence à família Moringaceae. Esta família apresenta um único género – *Moringa* – e dele fazem parte 13 espécies (Mahmood et al., 2010) (Figura A). As espécies da família Moringaceae

são xerófitas (Bennett et al., 2003). A partir de análises moleculares foi demonstrado que esta família, apresenta ligações próximas a Caricaceae e está distantemente relacionada de Brassicaceae (Bennett et al., 2003).

Destas espécies, as espécies mais comuns são *M. oleifera* (Figura 0–3B) e *M. concanensis* (Ramachandran et al., 1980), sendo que a espécie mais conhecida e mais naturalizada é *M. oleifera* (Anwar and Bhanger, 2003; Anwar et al., 2007).

## Moringaceae

## A

*Moringa* *Moringa oleifera*  
*M. arborea*  
*M. borziana*  
*M. concanensis*  
*M. drouhardii*  
*M. hildebrandtii*  
*M. longituba*  
*M. ovalifolia*  
*M. peregrine*  
*M. pygmaea*  
*M. rivae*  
*M. ruspoliana*  
*M. stenopetala*



Figura 0–3 | A - Espécies do género *Moringa*, de acordo com Mahmood et al. (2010). B – *Moringa oleifera*.

Esta espécie pode atingir uma altura de 5 a 10 metros (Anwar and Bhanger, 2003; Rashid et al., 2008) e em alguns casos 15 metros (Anwar and Bhanger, 2003). Podendo-se propagar a partir de sementes ou de cortes, sendo estes preferencialmente feitos em zonas meristemáticas (Ramachandran et al., 1980). *M. oleifera* cresce em quase qualquer tipo de solo exceto argilas duras (sobreconsolidadas) (Ramachandran et al., 1980). Deve ser plantada com espaçamento de 3 a 5 m entre plantas e regada nas fases iniciais até que as plantas estejam bem estabelecidas (Ramachandran et al., 1980). Cresce bem nos trópicos húmidos ou terras quentes e secas e é pouco afetada pela seca (Anwar et al., 2007; Rivas et al., 2013). Além de conseguir tolerar uma ampla gama de chuva, precisa anualmente no mínimo de 250 mm e no máximo de 3000 mm de chuva (Anwar et al., 2007).



Consegue também tolerar uma grande gama de pH (5.0 – 9.0) (Anwar et al., 2007; Rashid et al., 2008).

Tem origem no sopé dos Himalaias, na Índia e atualmente a sua distribuição é mundial (ex. Anwar e Bhangar, 2003; Anwar et al., 2007; Popoola, Oluyisola e Obembe, 2014), tendo sido introduzida em diversos países como, por exemplo o Brasil, que a introduziu em 1950 (Rivas et al., 2013) (Figura 0–4).

Apresenta vários nomes vernáculos como do inglês *drumstick* ou *horse radish tree*; em birmanês é denominada *dandalonbin*; em hindi, *shajmah*, *shajna*, *segra*; e na Malásia, *moringa* ou *muringa* (Ramachandran et al., 1980).

Esta espécie apresenta vários usos. É utilizada para fins medicinais, para alimentação, produção de biocombustíveis (Han et al., 2012) e também serve como agente de limpeza doméstica, fertilizante, purificante de água, entre outras (Popoola et al., 2014).



Figura 0–4 | Distribuição Mundial de *Moringa oleifera*. Esta espécie pode ser encontrada nos países assinalados a cinzento claro. Mapa baseado nos trabalhos de Rivas et al. (2013), Luqman et al. (2012), Anwar et al. (2007), Anwar & Bhangar (2003), Division et al. (1999), Muyibi & Evison (1995), Ramachandran et al., (1980) e dados recolhidos em várias fontes electrónicas.

Apresenta na sua composição elevada quantidade de aminoácidos como arginina, histidina, lisina, triptofano, fenilalanina, metionina, treonina, leucina, isoleucina e valina, presentes nas folhas e nos frutos (Ramachandran et al., 1980). Além destes aminoácidos, apresenta também na sua composição cálcio, magnésio, fósforo, vitamina A e C, entre outros (Ramachandran et al., 1980).

#### 1.4. Objetivos da dissertação

Assim, tendo em conta as alterações climáticas emergentes (ação simultânea de vários stresses) e os seus potenciais efeitos no desempenho e produtividade das plantas, este trabalho teve como objetivo principal estudar o efeito de stresses relacionados com as alterações climáticas (défice hídrico e radiação UVB separadamente e a sua ação conjunta) na plasticidade de uma espécie com tanto potencial em múltiplas frentes como é o caso de *M. oleifera*. Em particular, com este trabalho de dissertação de Mestrado pretende-se dar resposta às seguintes questões:

- Qual o grau de suscetibilidade de *M. oleifera* a seca/défice hídrico?
- De que forma *M. oleifera* reage à radiação UVB?
- Quais as interações que ocorrem quando as plantas são sujeitas a dois tipos de stress combinados como o défice hídrico e UVB?
- Como evolui a resposta funcional de *M. oleifera* após a imposição do stress?

De modo a ser possível responder a estas questões, é necessário compreender quais serão os efeitos destes fatores abióticos separadamente, défice hídrico, UVB e a combinação destes dois, ao nível do/a:

- estado hídrico da planta (teor relativo em água);
- crescimento, metabolismo do carbono, nomeadamente na fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas, conteúdo em pigmentos, concentração de açúcares solúveis totais e amido;
- stress oxidativo, verificando a permeabilidade membranar, a peroxidação lipídica e também a atividade de enzimas antioxidantes como a SOD, a CAT e a GR;
- atividade antioxidante total assim como o conteúdo em fenóis.

## Referências

- Anwar, F., Bhangar, M.I.I., 2003. Analytical characterization of *Moringa oleifera* seed oil grown in temperate regions of Pakistan. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6558–63. doi:10.1021/jf0209894
- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., Gilani, A.H., 2007. *Moringa oleifera*: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. *Phyther. Res.* 21, 17–25. doi:10.1002/ptr
- Barnes, P.W., Kersting, A.R., Flint, S.D., Beyschlag, W., Ryel, R.J., 2013. Adjustments in epidermal UV-transmittance of leaves in sun-shade transitions. *Physiol. Plant.* 149, 200–13. doi:10.1111/ppl.12025
- Bennett, R.N., Mellon, F.A., Foidl, N., Pratt, J.H., Dupont, M.S., Perkins, L., Kroon, P.A., 2003. Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (horseradish tree) and *Moringa stenopetala* L. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3546–53. doi:10.1021/jf0211480
- Biever, J.J., Brinkman, D., Gardner, G., 2014. UV-B inhibition of hypocotyl growth in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings is a consequence of cell cycle arrest initiated by photodimer accumulation. *J. Exp. Bot.* 65, 2949–61. doi:10.1093/jxb/eru035
- Bota, J., Medrano, H., Flexas, J., 2004. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytol.* 162, 671–681. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01056.x
- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S., 2003. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* 30, 239. doi:10.1071/FP02076
- Correia, B., Pintó-Marijuan, M., Neves, L., Brossa, R., Dias, M.C., Costa, A., Castro, B.B., Araújo, C., Santos, C., Chaves, M.M., Pinto, G., 2014. Water stress and recovery in the performance of two *Eucalyptus globulus* clones: physiological and biochemical profiles. *Physiol. Plant.* 150, 580–92. doi:10.1111/ppl.12110
- Dias, M.C., Azevedo, C., Costa, M., Pinto, G., Santos, C., 2014. *Melia azedarach* plants show tolerance properties to water shortage treatment: an ecophysiological study. *Plant Physiol. Biochem.* 75, 123–7. doi:10.1016/j.plaphy.2013.12.014
- Division, B., Genetics, M., Group, E.E., Scotland, S., Muluvi, G., Sprent, J., Soranzo, N.,

- 
- Provan, J., Odee, D., Folkard, G., McNicol, J., Powell, W., 1999. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa oleifera* Lam. Mol. Ecol. 8, 463–70.
- Falster, D.S., Westoby, M., 2003. Leaf size and angle vary widely across species: What consequences for light interception? New Phytol. 158, 509–525. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00765.x
- Fedina, I., Hidema, J., Velitchkova, M., Georgieva, K., Nedeva, D., 2010. UV-B induced stress responses in three rice cultivars. Biol. Plant. 54, 571–574. doi:10.1007/s10535-010-0102-3
- Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Bota, J., Galmés, J., Henkle, M., Martínez-Cañellas, S., Medrano, H., 2006. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. New Phytol. 172, 73–82. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01794.x
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 48, 909–930. doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Gray, C., Mueller, V., 2012. Drought and Population Mobility in Rural Ethiopia. World Dev. 40, 134–145. doi:10.1016/j.worlddev.2011.05.023
- Han, K., Ull, T.E.G., Lson, M.A.R.K.E.A.R.L.O., Unir, H.A.M., Nouman, W., SIDDIQUI, M.T., BASRA, S.M.A., KHAN, R.A., GULL, T., OLSON, M.E., MUNIR, H., 2012. Response of *Moringa oleifera* to Saline Conditions. Int. J. Agric. Biol. 14, 757–762.
- Hideg, É., Jansen, M.A.K., Strid, Å., 2013. UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? Trends Plant Sci. 18, 107–115. doi:10.1016/j.tplants.2012.09.003
- Hofmann, R.W., Campbell, B.D., 2012. Leaf-level responses to ultraviolet-B radiation in *Trifolium repens* populations under defoliation pressure. Environ. Exp. Bot. 78, 64–69. doi:10.1016/j.envexpbot.2011.12.019
- Hollósy, F., 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. Micron 33, 179–97.
- IPCC, 2013. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working

- 
- Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Jones, M., 2010. Calvin Cycle pathway [WWW Document]. URL <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Calvin-cycle4.svg#/media/File:Calvin-cycle4.svg>
- Kakani, V., Reddy, K., Zhao, D., Sailaja, K., 2003. Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. *Agric. For. Meteorol.* 120, 191–218. doi:10.1016/j.agrformet.2003.08.015
- Kar, R.K., 2011. Plant responses to water stress: Role of reactive oxygen species. *Plant Signal. Behav.* 6, 1741–1745. doi:10.4161/psb.6.11.17729
- Lipiec, J., Doussan, C., Nosalewicz, A., Kondracka, K., 2013. Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: A review. *Int. Agrophysics* 27, 463–477. doi:10.2478/intag-2013-0017
- Luqman, S., Srivastava, S., Kumar, R., Maurya, A.K., Chanda, D., 2012. Experimental Assessment of *Moringa oleifera* Leaf and Fruit for Its Antistress, Antioxidant, and Scavenging Potential Using In Vitro and In Vivo Assays. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2012, 519084. doi:10.1155/2012/519084
- Mahmood, K.T., Mugal, T., Haq, I.U., 2010. *Moringa oleifera*: a natural gift-A review. *J. Pharm. Sci. Res.* 2, 775–781.
- McKenzie, R.L., Aucamp, P.J., Bais, A.F., Ilyas, M., Madronich, S., Norval, M., Lucas, R.M., Cullen, A.P., Grujil, F.R. De, Longstreth, J., Takizawa, Y., Leun, J.C. Van Der, Caldwell, M.M., Flint, S.D., Robinson, S.A., Bornman, J.F., Helbling, E.W., Williamson, C.E., Worrest, R.C., Zepp, R.G., Paul, N.D., Sulzberger, B., Tang, X., Wilson, S.R., Solomon, K.R., Shao, M., Andrady, A.L., Hamid, H., Torikai, A., Lucas, R.M., Bjorne, L.O., Ilyas, M., Madronich, S., 2011. Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 10, 173. doi:10.1039/c0pp90040k
- Muyibi, S.A., Evison, L.M., 1995. *Moringa oleifera* seeds for softening hardwater. *Water Res.* 29, 1099–1105.
- Nawkar, G., Maibam, P., Park, J., Sahi, V., Lee, S., Kang, C., 2013. UV-Induced Cell Death in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 1608–1628. doi:10.3390/ijms14011608

- Popoola, J.O., Oluyisola, B.O., Obembe, O.O., 2014. Genetic Diversity in *Moringa oleifera* from Nigeria Using Fruit Morpho-Metric Characters & Random Amplified Polymorphic DNA ( RAPD ) Markers. *Covenant J. Phys. Life Sci.* 1, 43–60.
- Pristov, J.B., Jovanović, S.V., Mitrović, A., Spasojević, I., 2013. UV-irradiation provokes generation of superoxide on cell wall polygalacturonic acid. *Physiol. Plant.* 148, 574–81. doi:10.1111/ppl.12001
- Rahdari, P., Hoseini, S.M., 2012. Drought Stress: A Review. *Int. J. Agron. Plant Prod.* 3, 443–446.
- Ramachandran, C., Peter, K.V. V., Gopalakrishnan, P.K., 1980. Drumstick (*Moringa oleifera*): A Multipurpose Indian Vegetable. *Econ. Bot.* 34, 276–283.
- Rashid, U., Anwar, F., Moser, B.R., Knothe, G., 2008. *Moringa oleifera* oil: a possible source of biodiesel. *Bioresour. Technol.* 99, 8175–9. doi:10.1016/j.biortech.2008.03.066
- Rivas, R., Oliveira, M.T., Santos, M.G., 2013. Three cycles of water deficit from seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* 63, 200–8. doi:10.1016/j.plaphy.2012.11.026
- Ryan, K.G., Hunt, J.E., 2005. The effects of UVB radiation on temperate southern hemisphere forests. *Environ. Pollut.* 137, 415–27. doi:10.1016/j.envpol.2005.01.049
- Sangtarash, M.H., Qaderi, M.M., Chinnappa, C.C., Reid, D.M., 2009. Differential sensitivity of canola (*Brassica napus*) seedlings to ultraviolet-B radiation, water stress and abscisic acid. *Environ. Exp. Bot.* 66, 212–219. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.03.004
- Sathiyakumar, C., Irudayaraj, V., Johnson, M., 2011. Chemo-protective effect of aqueous extract of the resurrection plant *Selaginella involvens* (Sw.) Spring on UV-tolerance during spore germination of *Pteris argyrea* T. Moore. *J. Stress Physiol. Biochem.* 7, 415–423.
- Schmitz-Hoerner, R., Weissenböck, G., 2003. Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels. *Phytochemistry* 64, 243–255. doi:10.1016/S0031-9422(03)00203-6
- Shvaleva, a L., Costa E Silva, F., Breia, E., Jouve, J., Hausman, J.F., Almeida, M.H., Maroco, J.P., Rodrigues, M.L., Pereira, J.S., Chaves, M.M., 2006. Metabolic

- responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. *Tree Physiol.* 26, 239–248.
- Silva, E.N., Ferreira-Silva, S.L., Fontenele, a. D. V, Ribeiro, R.V., Viégas, R.A., Silveira, J. a G., 2010. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. *J. Plant Physiol.* 167, 1157–1164. doi:10.1016/j.jplph.2010.03.005
- Soehnge, H., Ouhtit, A., Ananthaswamy, O.N., 1997. Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. *Front Biosci* 2, d538–51.
- Tsormpatsidis, E., Henbest, R.G.C., Davis, F.J., Battey, N.H., Hadley, P., Wagstaffe, A., 2008. UV irradiance as a major influence on growth, development and secondary products of commercial importance in Lollo Rosso lettuce “Revolution” grown under polyethylene films. *Environ. Exp. Bot.* 63, 232–239. doi:10.1016/j.envexpbot.2007.12.002
- Verdaguer, D., Llorens, L., Bernal, M., Badosa, J., 2012. Photomorphogenic effects of UVB and UVA radiation on leaves of six Mediterranean sclerophyllous woody species subjected to two different watering regimes at the seedling stage. *Environ. Exp. Bot.* 79, 66–75. doi:10.1016/j.envexpbot.2012.01.008
- WHO | Skin cancers [WWW Document], n.d. URL <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html#.VgcxIQ9YYrQ> (accessed 9.26.15).
- Yong, T., Zongsuo, L., Hongbo, S., Feng, D., Tan, Y., Liang, Z., Shao, H., Du, F., 2006. Effect of water deficits on the activity of anti-oxidative enzymes and osmoregulation among three different genotypes of *Radix Astragali* at seeding stage. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 49, 59–64. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.02.014
- Zhang, Z.-Z., Che, X.-N., Pan, Q.-H., Li, X.-X., Duan, C.-Q., 2013. Transcriptional activation of flavan-3-ols biosynthesis in grape berries by UV irradiation depending on developmental stage. *Plant Sci.* 208, 64–74. doi:10.1016/j.plantsci.2013.03.013
- Zhao, D., Reddy, K.R., Kakani, V.G., Read, J.J., Sullivan, J.H., 2003. Growth and physiological responses of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) to elevated carbon dioxide and ultraviolet-B radiation under controlled environmental conditions. *Plant. Cell Environ.* 26, 771–782. doi:10.1046/j.1365-3040.2003.01019.x

---

Zingaretti, S.M., Inácio, M.C., Pereira, L. de M., Paz, T.A., França, S. de C., 2013. Water Stress and Agriculture, in: Responses of Organisms to Water Stress. pp. 151–180. doi:10.5772/53877



# Capítulo II

## **Plasticity of young *Moringa oleifera* L. to face combined and isolated water deficit and UVB radiation challenges**

Chapter submitted as an original paper to a SCI journal:

Araújo, M., Santos, C., Costa, M., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Dias, M.C., 2015. Plasticity of young *Moringa oleifera* to face combined and isolated water deficit and UVB radiation challenges. *Plant Physiology and Biochemistry*. (Submitted, Ref. No.: PLAPHY-D-15-01075).

## Abstract

The climatic challenges, such as drought, combined with heat waves and/or high UVB radiation, are predicted to become more common in the future. The impact of these changes in the multiuse crops of endangered regions, such as *Moringa oleifera* L. still remains unclear, but a susceptibility of this species may lead to increased poverty in those regions. Two-month old *M. oleifera* plants exposed to water deficit (WD) and WD+UVB were left unwatered for 4 days. After 1 day withholding water, plants of treatments WD+UVB and UVB were irradiated with 26.3 kJ m<sup>-2</sup> UVB, per 3 days. Plant water status, growth, carbon metabolism related parameters and oxidative stress related parameters were measured at day 1 and day 10 after the end of the exposure. Immediately after stress (1 day) net CO<sub>2</sub> assimilation rate was reduced in all treatments, however, after 10 days, an overall recovery was observed, except in UVB treatment. Concerning WD treatment, no significant changes were observed except on gas exchange, total soluble sugars and phenols. The plants exposed to UVB showed, in general, more severe effects, increasing pigment content and MDA, while no changes were observed in the total antioxidant activity (after 1 day). Our data suggest that young *M. oleifera* plants present some tolerance to WD or UVB and that the combination of the two stressors led to lower stressful responses than the UV stress imposition alone (photosynthesis, pigments, starch and antioxidant activity).

## Keywords

drought; UV; carbon metabolism; oxidative stress; ROS

## Abbreviations

A, Net CO<sub>2</sub> assimilation rate; ABTS, 2,20-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid); CAT, Catalase; Chl, Chlorophyll; *Ci/Ca*, Ratio between intercellular and atmospheric CO<sub>2</sub> concentration; *E*, Transpiration rate; *F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>*, Maximum efficiency of Photosystem II; FW, Fresh Weight; *F<sub>0</sub>*, Minimal Fluorescence yield; GR, Glutathione Reductase; *g<sub>s</sub>*, Stomatal conductance; MDA, malondialdehyde; PPFD, photosynthetic photon flux density; ROS, reactive oxygen species; RWC, relative water content; SOD, Superoxide Dismutase; TSS, Total Soluble Sugars; UVB, ultraviolet B radiation; WD, Water Deficit; WD+UVB, Water Deficit and Ultraviolet B radiation.

## 1. Introduction

Recently, scientists increasingly warn that the consequences of climate changes on daily life, in particular on food supply and crop production may be dramatic in the upcoming decades (e.g. MAMAOT 2013).

Due to the fact that climate change predicts a complex combination of stressors often occurring simultaneously, with having synergic impact, it urges for more understanding how climate changes related stressors may impact important crops/plants in the world.

Since industrial revolution, anthropogenic activity is increasing the release to atmosphere gases with greenhouse effect (e.g. CO<sub>2</sub> and other gases), and therefore increasing the risk of global warming together with damages on stratospheric ozone layer. This combination of increasing global warming and ozone degradation, may lead to water deficit episodes together with an increase of ultraviolet B radiation reaching surface (e.g. IPCC, 2013), which have severe consequences to ecosystem organisms and human health (IPCC, 2013).

In general, the effect of water deficit in plants is associated with reduction of growth and consequently with yield decrease (Dias et al., 2014). Plants exposed to water deficit have to adjust their metabolism to the new condition. This adaptation may lead to an increase of tolerance and involve decrease of growth, changes in morphology or even lead to some organs (e.g. leaves) decay (Dias et al., 2014). Photosynthesis is particularly sensitive to abiotic stressors, as both chloroplast structure and function and/or stomatal aperture and consequent gas exchange may be limited (Rodriguez et al., 2011). These effects lead to a decrease of carbon assimilation and consequently plant's productivity (Silva et al., 2010). A primary cell target of most abiotic stressors (e.g. UV, heat, drought stress) is the increase of reactive oxygen species (ROS), and therefore, the evaluation of the antioxidant system is in general also affected. This was particularly demonstrated for plants affected with water deficit (e.g. Dias et al. 2014), salinity (e.g. Shu et al., 2013), pollutants (e.g. Rodriguez et al., 2011), UVB radiation (e.g. Verdaguer et al., 2012). This overproduction of ROS increases the antioxidant system of the cell, such as enzymes like SOD, CAT or GR (e.g. Dias et al., 2014). When the antioxidant battery is insufficient to impair the putative damages induced by ROS, the unwanted oxidation of macromolecules may then occur. As a consequence, damages in cell structures as membranes, may occur, and one of the first targets is the peroxidation of lipids (measured by quantification of malondialdehyde, MDA)

---

(e.g. Rivas et al., 2013).

Increase of exposure to UVB may also lead to changes on the leaf's anatomy (e.g. thickness), morphology and biomass production (Hollósy, 2002). UVB radiation is important to photomorphogenic development of plants, necessary to their normal development (Verdaguer et al., 2012), but when reaching excessive levels UVB can lead to damages on the photosynthetic apparatus or on genetic material (e.g. DNA) (Sangtarash et al., 2009) together with an increase of oxidative stress (Verdaguer et al., 2012). Plant cells have defence mechanisms including the increase of UV-screening pigments, stimulating the antioxidant battery, and/or accumulation of phenolic compounds (e.g. Pristov et al., 2013).

*Moringa oleifera* L., also known as *M. pterygosperma* Gaertn. belongs to a single genus named *Moringa* of Moringaceae family (Anwar and Bhangar, 2003). This species is native from south Himalaya region (Sreelatha and Padma, 2009). At present, *M. oleifera* can be found, native or introduced, in several countries of tropical and subtropical areas (e.g. Luqman et al., 2012; Rivas et al., 2013). There are several uses for this species (Anwar and Bhangar, 2003). In particular, inhabitants from countries where this species is native often use it as medicinal or as source of food (Anwar and Bhangar, 2003), mostly due to its high nutritional value (Sreelatha and Padma, 2009). This species is also very known because of its antioxidant properties (Sreelatha and Padma, 2009). *M. oleifera* represents an important species for both emerging regions (e.g. it represents a major source of food in several African and Asian regions), and in industrial agro-pharmaceutical industry. Recently, young plants of *M. oleifera* showed some tolerance degree to water stress (Rivas et al., 2013), but to our knowledge, it remains to characterize how *M. oleifera* plants can cope with water deficit (WD), UVB or the combination of these stressors.

Considering *M. oleifera* importance and distribution in endangered habitats we hypothesized that young *M. oleifera* plants may cope climate changes challenges (in particular, UVB and water deficit imposition) by coping their carbon and oxidative stress metabolism. Young plants were selected due to the fact that juvenile stage is more sensitive to stress episodes than adult plants.

The impact in carbon metabolism was evaluated by assessing chlorophyll *a* fluorescence, gas exchange, pigments and production of sugars. Oxidative stress was evaluated by studying cell membrane permeability, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. The concentration of phenols and the total antioxidant activity were also determined.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Material and experimental conditions

*Moringa oleifera* L. seeds, provided by the Ministry of Agriculture of East Timor, were soaked in 10% commercial bleach (NaOCl <5%) for 15 minutes, washed 3 times, and then embedded in distilled water for another 15 minutes before sowing. Seeds were germinated in a mixture of turf and perlite (2:1 w/w) in plastic pots ( $\approx$  300 ml). During four weeks, cultures were maintained in a greenhouse with approximately  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  photosynthetic photon flux density (PPFD) with a photoperiod of 16h/8h (day/night) and  $20 \pm 3^\circ\text{C}$ . Plants were then transferred to a chamber with the same photoperiod, a temperature of  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , relative humidity of 40% and a PPFD of  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , until plants had an average shoot height of  $36 \pm 5$  cm. Plants were assigned between four treatments, well-watered without ultraviolet radiation (Control), water deficit (WD), ultraviolet B radiation (UVB) and water deficit and UVB radiation (WD+UVB). Before the beginning of the treatments all substrates were watered to field capacity. Ten UVB lamps (Model G8T5E, Sankyo Denki, Kanagawa, Japan) with an energy spectrum of 280–315 nm and a maximum emission at 306 nm were used as the UVB source. UVB exposure was monitored by using a VLX 312 radiometer equipped with a UVB sensor (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée Cedex, France). Plants of the groups WD and WD+UVB were not watered for 4 continuous days. After 1 day withholding water plants of the group WD+UVB and also plants of the group UVB were irradiated with a total irradiation of  $26.3 \text{ kJ m}^{-2}$  distributed for 3 days (Table 1). One and ten days after the end of the treatments the relative water content (RWC), plant height, gas exchange, chlorophyll fluorescence and electrolyte leakage were analysed in plants of all treatments (Control, WD, UVB and WD+UVB). Additionally, leaf samples were collected, frozen in liquid  $\text{N}_2$  and maintained at  $-80^\circ\text{C}$  for further measurements.

Table 1. Experimental conditions. Plant distribution between groups.

After Stress	Treatment	<i>n</i>	Water Supply	UVB Exposure
1 day	Control	8	Yes	No
	Water Deficit	8	No	No
	UVB	8	Yes	Yes
	WD + UVB	8	No	Yes
10 days	Control	8	Yes	No
	Water Deficit	8	No	No
	UVB	8	Yes	Yes
	WD + UVB	8	No	Yes

Water deficit: 4 days without water.

UVB total irradiance: 26.3 kJ m<sup>-2</sup>.

## 2.2. Plant growth and water status

Plant shoot was height before (BE) and after (AE) the experiment. Plant growth rate was calculated with the following formula:

$$\text{Growth height (\%)} = \frac{AE \text{ (cm)} - BE \text{ (cm)}}{BE \text{ (cm)}} \times 100$$

Leaf fresh weight (FW), turgid weight (TW) and dry weight (DW) were determined. Leaf relative water content (RWC) was calculated with the following formula:

$$\text{RWC (\%)} = \frac{(FW - DW)}{(TW - DW)} \times 100$$

### 2.3. Carbon metabolism

#### 2.3.1. Chlorophyll *a* fluorescence and gas exchange

Chlorophyll *a* fluorescence *in vivo* was measured on *M. oleifera* leaves using a pulse amplitude modulation system (FMS 2, Hansatech Instruments, Norfolk, England). Minimum fluorescence ( $F_0$ ) was measured in 30 min dark-adapted leaves by applying a weak modulated light, and maximum fluorescence ( $F_m$ ) was measured after applying a 0.7 s saturating pulse of white light ( $>1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). The maximum quantum efficiency of photosystem II was calculated as  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$  (Dias et al., 2014).

Leaf gas exchange measurements were performed using a portable infrared gas analyser (LCpro+, ADC, Hoddesdon, England) operating in the open mode under the same conditions of growth and atmospheric  $\text{CO}_2$  concentration. Net  $\text{CO}_2$  assimilation rate ( $A$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ), ratio between intercellular and atmospheric  $\text{CO}_2$  concentration ( $C_i/C_a$ ) and transpiration rate ( $E$ ) were determined.

#### 2.3.2. Pigments quantification

Pigments were extracted and quantified according to Sims & Gamon (2002). Briefly, frozen leaves powder were extracted in a cold acetone/50 mM Tris buffer solution (80:20 v/v, pH=7.8), centrifuged during 5 minutes at 5000xg at 4°C. Absorbance was read with a Thermo Fisher Scientific spectrophotometer (Genesys 10-uv S) at 470, 537, 647 and 663 nm. Concentration of Chlorophyll *a* ( $\text{Chl}_a$ ), Chlorophyll *b* ( $\text{Chl}_b$ ) and Carotenoids (Car) were calculated according to Sims and Gamon (2002).

#### 2.3.3. Total soluble sugar (TSS) and starch content

Soluble sugars were extracted from frozen powder leaves with 80% (v/v) ethanol, in an 80°C bath over an hour (Irigoyen et al., 1992), and then centrifuged at 5000xg during 10 min at 4°C. The supernatant was incubated with an anthrone solution during 10 min at 100°C. The mixture was centrifuged (5000xg, 10 min, 4°C) and the absorbance was read at 625nm using a Thermo Fisher Scientific spectrophotometer (Genesys 10-uv S).

Starch content was determined by using the pellet resulting from TSS extraction, to which perchloric acid 30% (v/v) was added. The mixture was incubated at 60°C over an hour and then centrifuged at 10000xg during 10 min at 4°C. The supernatant was incubated with an anthrone solution during 10 min at 100°C. This mixture was centrifuged (5000xg, 10 min,

4°C) and the absorbance of the supernatant was read at 625nm using a Thermo Fisher Scientific spectrophotometer (Genesys 10-uv S).

The concentration of TSS and starch were calculated using a glucose standard curve with a  $R^2 = 0.974$  (TSS) and  $R^2 = 0.996$  (starch).

## 2.4. Oxidative stress

### 2.4.1. Determination of cell membrane permeability and lipid peroxidation

Cell membrane permeability was determined by electrolyte leakage as described by Dias et al., (2014). Electrolyte leakage was accessed by measuring the conductivity before ( $L_t$ ) and after autoclaving ( $L_o$ ) of leaf samples and was calculated by  $L_t/L_o$  and expressed as percentage (Dias et al., 2014).

Lipid peroxidation was determined by measuring the production of malondialdehyde (MDA) in leaves as previously described by Hodges et al. (1999). Leaf samples were homogenised with 0.1% (w/v) trichloroacetic acid (TCA), mixed and centrifuged (10000xg, 10 min at 4°C). The supernatant was mixed with 20% TCA (w/v) or with 20% TCA (w/v) and 0.5% thiobarbituric acid (TBA) (w/v) for -TBA and +TBA, respectively, and incubated for 30 min at 95°C. The extract was then cooled immediately on ice and centrifuged (10000xg, 10 min at 4°C). MDA concentration was calculated according to Hodges et al., (1999).

### 2.4.2. Determination of superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities

For the determination of the antioxidant enzyme activities, frozen powder was homogenized with an extraction buffer containing 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.8), 5 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 1 % PVP (m/v), 1 mM PMSF, 0.2 % Triton X-100 (v/v) and 2 mM DTT. The supernatant was used to determine superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) and glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) activities according to Monteiro et al. (2012).

### 2.4.3. Phenols and total antioxidant activity (TAA)

Leaf phenols content and the TAA were determine according to Pérez-Tortosa et al., (2012). For the extraction, leaf frozen powder were homogenized with methanol, sonicated in a 40°C bath over 30 minutes and centrifuged (15000xg, 15 min, 4°C).



#### *2.4.3.1. Quantification of phenols*

The Folin–Ciocalteu reagent was added to the methanolic extract. This mixture was incubated for 5 min, and after this period, 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added and incubated over 2.5 hours. The absorbance of the extracts were read at 765 nm, according to Pérez-Tortosa et al. (2012). The amount of phenols was obtained using a gallic acid standard curve ( $R^2 = 0.99$ ).

#### *2.4.3.2. Total antioxidant activity – ABTS scavenging assay*

The generation of ABTS [2,20-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] was performed according to Pérez-Tortosa et al., (2012). ABTS solution was added to the methanolic extract. Absorbance was recorded at 734 nm. The amount of TAA was calculated against a gallic acid standard curve ( $R^2 = 0.997$ ).

#### *2.5. Statistical analysis*

All data were analysed by One-Way analysis of variances (ANOVA) following by Holm-Sidak method (multiple comparison test) or when normality failed, Kruskal-Wallis One-Way ANOVA by ranks was performed, following by Dunn's Method to multiple comparisons. All analyses were performed using Sigma Stat for Windows, version 3.1.

### 3. Results

#### 3.1. *Plant Growth and Water Status*

The effects of individual and combined stressors on the plant growth and RWC is represented in Table 2, considering the plant responses immediately 1 day after the end of stress imposition and then after 10 days. A reduction in plant growth was observed 1 day after the treatment WD+UVB, but after 10 days plant growth recovery (140%) for values similar ( $p > 0.05$ ) to control plants (Table 2). Ten days after stress, *M. oleifera* plants exposed to WD treatments showed an increase in growth compared to day 1. For each sampling time (1 or 10 days), no significant variation in plant growth were observed between stress treatments. Concerning the plant water status, no significant differences were observed in the RWC between treatments, 1 and 10 days after the end of stress (Table 2).

#### 3.2. *Carbon metabolism*

##### 3.2.1. *Chlorophyll a fluorescence and gas exchange*

Concerning the chlorophyll *a* fluorescence parameters ( $F_0$  and  $F_v/F_m$ ) in day 1 and 10, no significant differences were observed between control and stress treatments, and between stress treatments (Table 2).

In Figure 1 are represented the effects of individual and combined stress on gas exchange. The net CO<sub>2</sub> assimilation rate (*A*) decreased significantly 1 day after the end of the stress treatments (WD, UVB and WD+UVB) compared to control plants (Figure 1A). The WD treatment showed the highest decrease (60%) followed by UVB (45.7%) and WD+UVB (36.8%). After 10 days, plants exposed to WD and WD+UVB recovery the *A*, achieved values near the control plants ( $p > 0.05$ ). However, the plants previous exposed to UVB maintained an *A* similar to day 1 ( $p > 0.05$ ). Despite of the variations in *A*, no significant differences were observed between stress treatments.

Table 2. Effects of WS, UVB and WS+UVB conditions (1 day and 10 days after stress) on plant growth, RWC and chlorophyll *a* fluorescence parameters in *M. oleifera* leaves. Values are mean  $\pm$  standard error (RWC: n = 3 – 12; n = 5 – 16 for the other parameters). Different letters indicate statistical differences between treatments ( $p \leq 0.05$ ).

After Stress	Treatment	Plant Growth (%)	Relative Water Content (%)	F0	Fv/Fm
1 day	Control	19.0 $\pm$ 2.4 <sup>ac</sup>	80.1 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	437.3 $\pm$ 29.8 <sup>a</sup>	0.82 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
	Water Deficit	8.2 $\pm$ 2.1 <sup>c</sup>	71.1 $\pm$ 6.7 <sup>a</sup>	399.6 $\pm$ 31.6 <sup>a</sup>	0.81 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
	UVB	10.2 $\pm$ 1.3 <sup>bc</sup>	73.9 $\pm$ 12.4 <sup>a</sup>	487.3 $\pm$ 14.7 <sup>a</sup>	0.75 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
	WD + UVB	7.8 $\pm$ 1.6 <sup>c</sup>	74.0 $\pm$ 9.0 <sup>a</sup>	560.8 $\pm$ 79.1 <sup>a</sup>	0.78 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
10 days	Water Deficit	28.2 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup>	89.1 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	452.4 $\pm$ 18.5 <sup>a</sup>	0.82 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
	UVB	23.0 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	72.8 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup>	437.5 $\pm$ 14.2 <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
	WD + UVB	19.0 $\pm$ 2.8 <sup>ac</sup>	78.2 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>	471.3 $\pm$ 16.4 <sup>a</sup>	0.81 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>

Concerning the  $E$  and  $g_s$ , no significant differences were observed for day 1 and 10 between control and stress treatments and between stress treatments (Figure 1B and D). The  $C_i/C_a$  increased significantly 1 day after the end of WD, but decreased significantly after 10 days to values similar to control (Figure 1C). In the case of the UVB treatment, 10 days after the end of stress,  $C_i/C_a$  values were significantly higher than control plants.

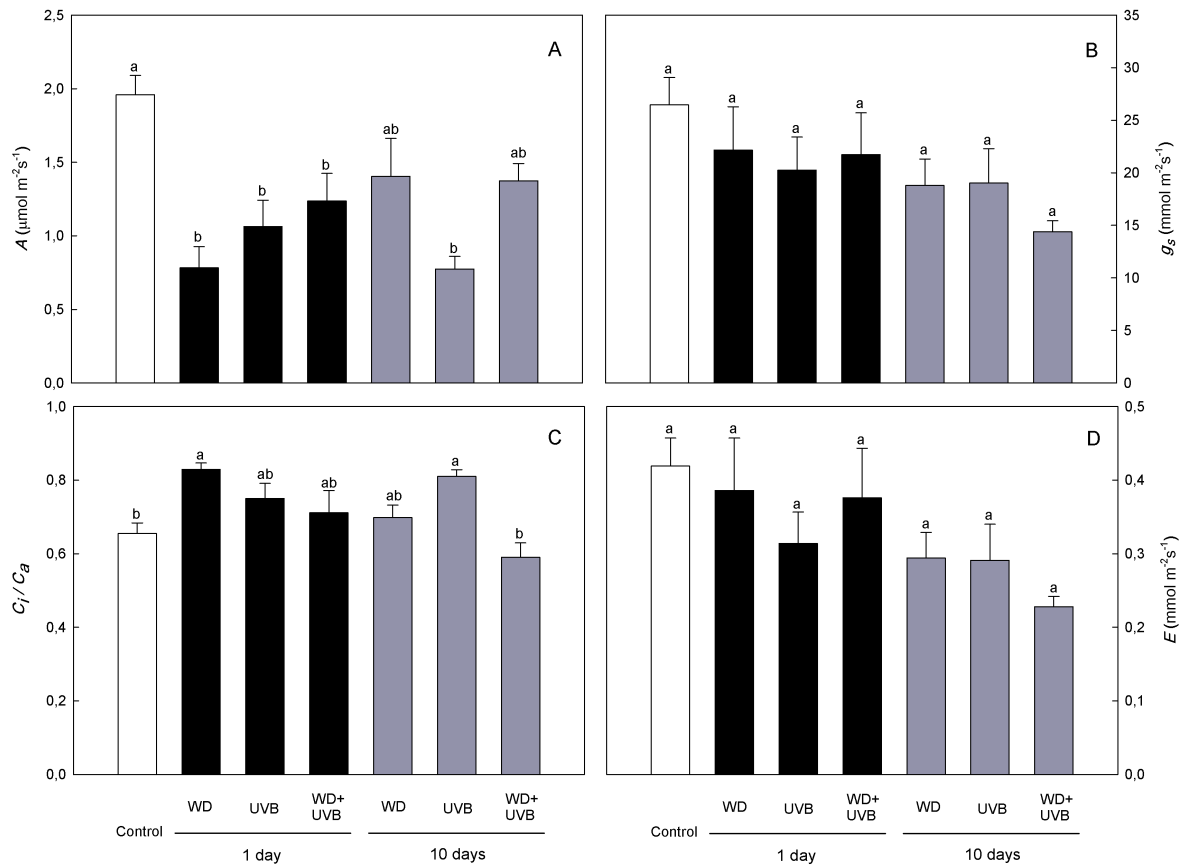


Figure 1. Net CO<sub>2</sub> assimilation rate (A), stomatal conductance (B), ratio between intercellular and atmospheric CO<sub>2</sub> concentration (C) and transpiration rate (D) in *M. oleifera* plants under control conditions, WD, UVB and WD+UVB. Values are mean  $\pm$  standard error ( $n = 6 - 14$ ). Different letters indicate statistical differences between treatments ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.2.2. *Pigments and Carbohydrates*

A significant increase of Chl *a* and carotenoids was observed 1 day after the end of UVB treatment compared to control plants (

Figure 2). However, after 10 days, pigment content decreased to levels similar to control plants ( $p > 0.05$ ). Concerning the other treatments, small variations in the concentration of the photosynthetic pigments were observed between day 1 and day 10 ( $p > 0.05$ ).

Compared to control plants, TSS concentration increased significantly 1 day after the end of the WD and WD+UVB treatment, but decreased 10 days after the end of these stressors (only significant for the WD treatment) (Figure 3A). Despite the variations in the TSS concentrations, for each sampling time (1 or 10 days), no significant differences were observed between stress treatments.

The concentration of starch in plants 1 day after the stress treatments was similar to control ( $p > 0.05$ ) (Figure 3B). However, after 10 days, starch concentration in plants previous exposed to UVB and WD+UVB decreased, showing values significantly lower than control plants.

## 3.3. *Oxidative stress*

### 3.3.1. *Cell membrane permeability and lipid peroxidation*

Cell membrane permeability was similar in control and plants exposed to stress treatments, 1 and 10 days after the end of stress ( $p > 0.05$ ) (Figure 4A). MDA content increased significantly 1 day after the end of the UVB treatment, but returned to levels similar to control 10 days after ( $p > 0.05$ ) (Figure 4B). Despite slight variations were observed in WD and WD+UVB after 1 and 10 days no differences were observed between these groups and control group ( $p > 0.05$ ).

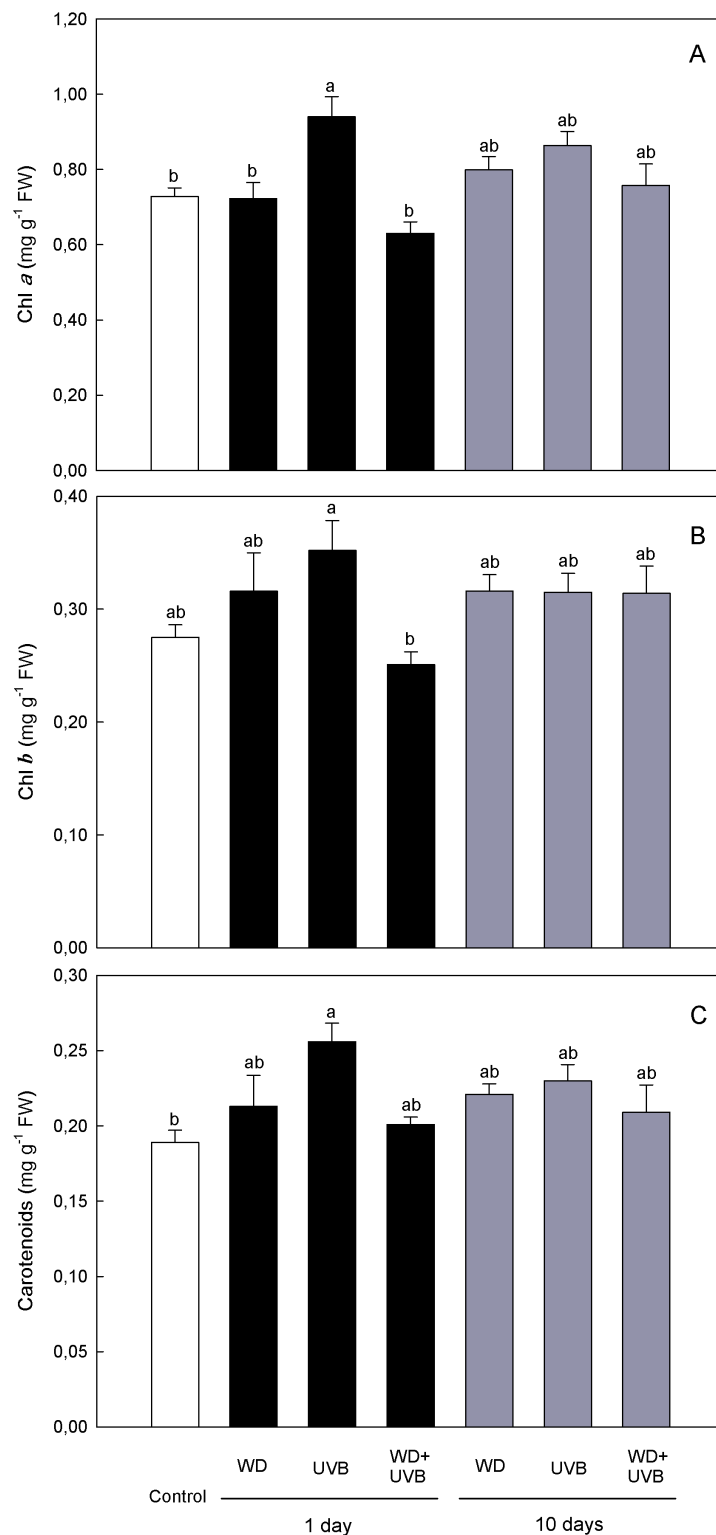


Figure 2. Effects of WD, UVB and WD+UVB on Chlorophyll *a* (A), Chlorophyll *b* (B) and Carotenoids (C) contents of *M. oleifera* plants (1 and 10 days after the end of stress. Values are mean  $\pm$  standard error ( $n = 5 - 15$ ). Different letters indicate statistical differences between treatments ( $p \leq 0.05$ ).

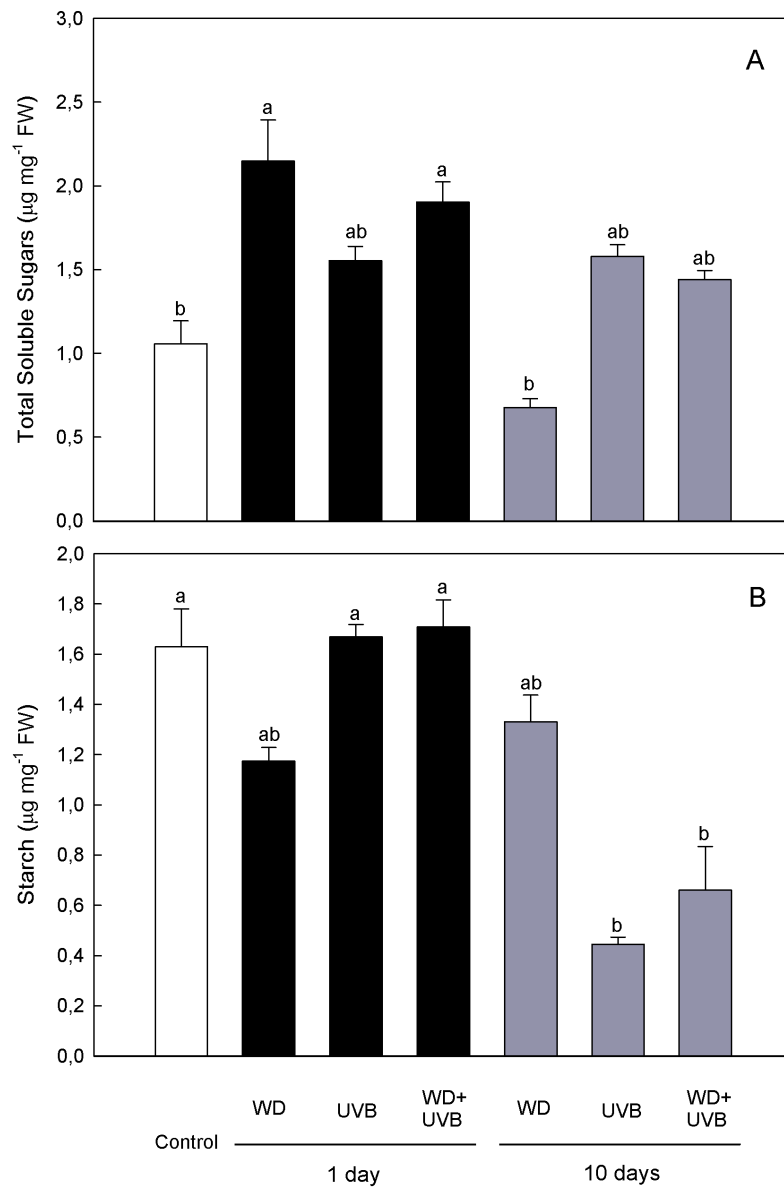


Figure 3. Effect of WD, UVB and WD+UVB on total soluble sugars (A) and starch (B) content of *M. oleifera* (1 day and 10 days after the end of stress imposition). Values are mean  $\pm$  standard error ( $n = 5-12$ ). Different letters indicate statistical differences between treatments ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.3.2. Enzymatic and antioxidant activities

The activity of the enzyme SOD was similar in control and plants exposed to stress treatments 1 day after the end of the stress ( $p > 0.05$ ) (Table 3). However, after 10 days plants treated to UVB showed the highest activity of SOD ( $p \leq 0.05$ ). One day after the end of stress, the activity of CAT was higher ( $p \leq 0.05$ ) in plants exposed to WD+UVB than in control plants, but returned to values similar ( $p > 0.05$ ) to control 10 days after (Table 3). A significant increase in CAT activity was also observed in *M. oleifera* plants 10 days after the WD treatment. No significant differences were observed in GR activity between control and plants exposed to stress and between treatments at day 1 and 10 ( $p > 0.05$ ) (Table 3).

Plants exposed to WD+UVB showed the highest levels of phenols ( $p \leq 0.05$ ) 1 day after the end of the treatment (Figure 4C). However, after 10 days, the phenols content decreased (20%) and was significantly lower than the levels of control plants. Plants exposed to WD always showed (1 and 10 days) a phenol concentration lower than control plants ( $p \leq 0.05$ ). One day after the end of stress, phenols concentration was similar ( $p > 0.05$ ) in control and plants exposed to UVB, but decreased significantly after 10 days.

One day after the end of stress, no significant differences were observed in the ABTS concentration between control and stress plants, and between plants of the various stress treatments (Figure 4D). However, after 10 days of the end of stress the concentration of ABTS increased significantly in plants of the treatments UVB and WD+UVB in relation to control plants.



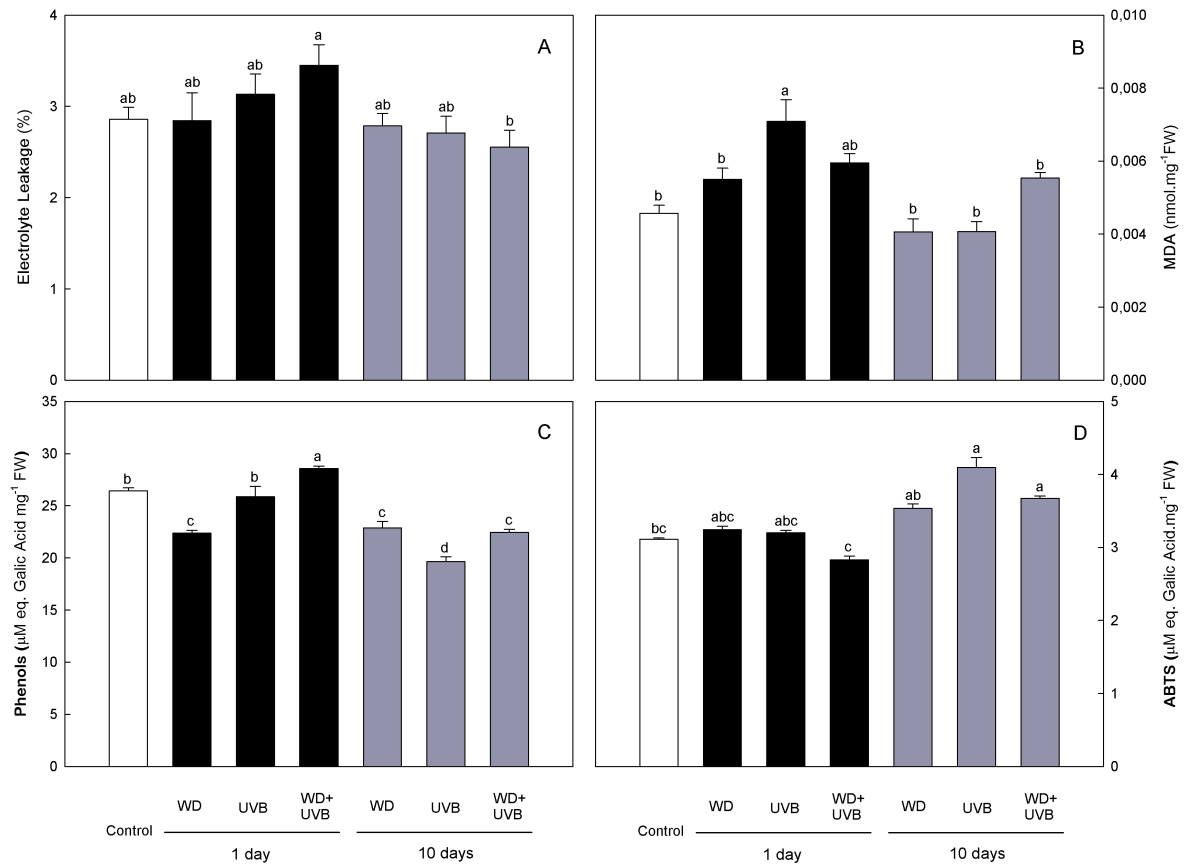


Figure 4. Effects of WD, UVB and WD+UVB on the electrolyte leakage (A), MDA content (B), phenols content (C) and ABTS of *M. oleifera* plants (1 and 10 days after the end of stress imposition). Values are mean  $\pm$  standard error ( $n = 4-12$ ). Different letters indicate statistical differences between treatments ( $p \leq 0.05$ ).

Table 3. Effects of WD, UVB and WD+UVB on SOD, CAT and GR activities in *M. oleifera* plants (1 and 10 days after the end of stress imposition). Values are mean  $\pm$  standard error (n = 3 – 11). Different letters indicate statistical differences between treatments ( $p \leq 0.05$ ).

After Stress	Treatment	SOD (U mg <sup>-1</sup> FW)	CAT ( $\mu$ g mg <sup>-1</sup> FW)	GR (nmol s <sup>-1</sup> g FW)
	Control	0.37 $\pm$ 0.06 <sup>cd</sup>	0.21 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	105.7 $\pm$ 13.5 <sup>ab</sup>
	Water Deficit	0.34 $\pm$ 0.05 <sup>cd</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	62.0 $\pm$ 23.8 <sup>ab</sup>
1 day	UVB	0.27 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	0.36 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	28.6 $\pm$ 5.2 <sup>b</sup>
	WD+UVB	0.47 $\pm$ 0.04 <sup>cd</sup>	0.61 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	33.7 $\pm$ 3.8 <sup>ab</sup>
	Water Deficit	0.50 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.50 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	55.8 $\pm$ 7.0 <sup>ab</sup>
10 days	UVB	1.50 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	80.4 $\pm$ 29.0 <sup>ab</sup>
	WD+UVB	1.08 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.15 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	213.8 $\pm$ 52.3 <sup>a</sup>

#### 4. Discussion

Due to the emerging global climate change, episodes of drought, extreme heat and high UV radiation will become more common in the future. Thus, it is urgent to understand the effects of these stressors (separately and combined) on plant performance and on its productivity. A putative strategy to cope with these scenarios is to select and propagate stress tolerant species.

So far as we know, this is the first study that addressed the effects of separated (WD and UVB) and combined (WD+UVB) stressors on carbon metabolism and antioxidant capacity in a multipurpose species, *M. oleifera*. As stated previously, *M. oleifera* is considered a drought tolerant species and plays an important role in poor soils of semiarid areas of several countries in South America [e.g. Brazil (Rivas et al., 2013)], Africa [e.g. Nigeria (Popoola and Obembe, 2013)] and Asia [e.g. Indonesia, East-Timor]. In this study, withholding water from the young *M. oleifera* plants for 4 days did not affect its water status (RWC). According to Rivas et al. (2013) young *M. oleifera* plants (<2 months old) can keep a high leaf RWC, even under low soil moisture.

The photosynthetic apparatus is considered one of the main targets of drought (Chaves et al., 2003) and UVB stress (Hollósy, 2002). A decrease of *A* was reported for several species exposed to WD and high UVB radiation (applied combined or separately) (Joshi et al., 2013; Sangtarash et al., 2009). Also in this study, 1 day after WD, UVB and WD+UVB exposure, *A* is impaired and a tendency to lower growth (not statistically different) was observed. Ten days after WD and WD+UVB exposure, young *M. oleifera* plants showed the capacity to recovery *A*, but in plants exposed to UVB, *A* still impaired. These findings demonstrated that the damages caused by the UVB radiation alone are more severe (and permanent at least 10 days after the end of the stress) than those provoked by WD or even by WD+UVB. Stomatal closure is among the earliest responses of plants to WD, protecting them from water loss, which can result in cell dehydration and in extreme cases death to the plant (Chaves et al., 2003). However, stomatal regulation also limit the CO<sub>2</sub> availability in the intercellular spaces of the mesophyll cells, and consequently affect photosynthesis. Also high UVB radiation is described to act directly in the stomata decreasing its conductance (Nogues et al., 1999). Interestingly, despite some oscillation in *E* and *g<sub>s</sub>* after stress exposure, neither the stressors applied separately (WD and UVB) nor combined (WD+UVB) increased stomatal resistance in young plants of *M. oleifera*. Thus, the impairment of *A* cannot be attributed to stomatal effects, since stressorss did not reduce the intercellular

CO<sub>2</sub> availability. In fact, a tendency for higher Ci/Ca ratio was even noticed after stress, with more emphasis in plants of the WD (after 1 day) and UVB (after 10 days) treatments, indicating that biochemical limitations could be the main causes the decrease of A. Similar results were reported earlier (e.g. Correia et al., 1999). Several biochemical limitations can be pointed as a putative cause for A reduction, but most studies actually proposed that RuBisCO as the major potential candidate for the primary action site of inhibition by UV-B radiation (e.g. Fedina et al., 2010) and also WD (e.g. Dias et al., 2014). The accumulation of TSS in young *M. oleifera* plants, 1 day after stress, also reinforced the pivotal role of RuBisCO as a major limitation for photosynthesis. Decreased activity of RuBisCO is often correlated with sugars accumulation in leaves exposed to abiotic stress (Dias et al., 2013; Rodriguez et al., 2015). Savitch et al. (2001) investigated the effect of UVB on *Brassica napus* and concluded that the decrease in the CO<sub>2</sub> assimilation capacity for UVB treated plants was not associated with limitation at the level of PSII electron transport, but rather with a decreased capacity for sucrose biosynthesis, limited triose-P utilization, and a decreased capacity for RuBP regeneration.

Additionally, TSS accumulation 1 day after exposure to stresses can also suggest an osmoregulation by cell in response to stress. After 10 days a return of TSS concentration to values near to control indicated that soluble sugars are being used for the plant in several processes, such as growth. In fact, an improvement of plant growth was observed. Beside to TSS changes, young *M. oleifera* plants also started to use starch, probably to replace the levels of soluble sugars: for the case of the plants of WD treatment starch content decreased immediately 1 day after stress, while for UVB and WD+UVB treatments these decrease was only verified after 10 days. These data, together with the gas exchange results, suggest that young *M. oleifera* plants are able to re-establish their physiological performance, after stress removal.

A different response of young *M. oleifera* to several WD cycles was reported by Rivas et al. (2013). The decrease in A was accompanied by stomatal closure and also a reduction in the content of soluble sugars (Rivas et al., 2013). These authors also reported that the photosynthetic capacity could recover very fast after stress relief.

UVB treatment stimulated pigments content immediately after 1 day and after 10 days (and a lower tendency to increase pigments levels was observed also in all treatments). Some authors (e.g. Nogués & Baker 2000; Poulson et al. 2006) supported that UVB radiation may not affect pigment and photosynthesis in several species and that therefore, UVB may not represent a threat to plants. Caldwell et al. (2003) supported this opinion in a meta-analysis

on UVB effects in plants. However, in several species UVB was shown to decrease photosynthesis by affecting, for example in rice, gas exchange, stomatal conductance and photosynthetic capacity including  $F_0$ ,  $F_v/F_m$ , as well as xanthophylls, carotenes, Chl *a*, Chl (*a+b*) and Chl (*a/b*) (Lidon and Ramalho, 2011). Also in *Vitis vinifera*, PS II inhibition by UV was demonstrated, with consequent inhibition of photosynthesis (Pfündel, 2003). Other studies indicate that UVB act destructively in the light harvesting domains, and Chl *a* and carotenoids seems to be more stable to UVB stress than Chl *b* (Hollósy, 2002).

On the other hand, it has been reported for *Arabidopsis thaliana* that Chl *a* and *b* contents increased in plants exposed to  $6 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  UVB (Poulson et al., 2006). Also a mutant *A. thaliana* tolerated lethal doses of UV ( $0.1\text{-}0.180 \text{ Wm}^{-2}$ ) and showed increasing levels of pigments namely flavonoids and chlorophylls (Bieza and Lois, 2001). The similar tendency of pigments to increase in UVB exposed *M. oleifera* may suggest an adaptive mechanism of this species. This increase may be related with pathways of geranyl diphosphate that is a precursor of both chlorophylls and carotenoids, and of terpenoids, which were shown to increase in plants after UVB radiation (Lee et al., 2014). Also, methyl jasmonate and ethylene may also stimulate, after irradiation, the secondary metabolism including synthesis of these pigments (Spinelli et al., 2011). We hypothesise that the increase of these secondary pathways leading to increase pigment levels under higher radiation have protective roles, namely, e.g. to increase the accessory pigments in the light harvesting complex. Similarly to *M. oleifera*, drought in three cultivars of wheat slightly increased chlorophylls content (Nikolaeva et al., 2010). Our data therefore support the results also for this species found by Rivas et al. (2013).

The combination of stressors (WD+UVB) also may influence chlorophyll levels. Poulson et al. (2006) showed that *A. thaliana* plants previously exposed to UVB were more tolerant to drought than untreated control plants. Similarly we showed that WD stress plants seem to better tolerate UVB stress than untreated control plants. These data together suggest that plants increase tolerance when plants are exposed to combined stresses.

Most studies have shown that increased UVB radiation induces the synthesis of carotenoids (Sangtarash et al., 2009). As already reported above a trend to higher levels of carotenoids were also observed in this study (probably involving a change in the geranyl diphosphate pathway). These general higher levels of carotenoids in young *M. oleifera* plants after stress may protect the photosynthetic apparatus, helping to dissipate the excess of energy preventing from photoinhibition (Takahashi and Badger, 2011). In fact, the  $F_v/F_m$  was not

---

affected by the stress treatments.  $F_v/F_m$  values obtained in all treatments are within the values (0.75 - 0.85) referred for healthy plants (Dias et al., 2013).

Oxidative stress is regarded as a major damaging factor in plants exposed to abiotic stresses. Plant redox balance depends on the equilibrium between ROS production and scavenging at the proper site and time (Sharma and Dubey, 2007). UVB treatment seems to be more deleterious for the young *M. oleífera* plants than WD: the application of this stress alone or combined to WD showed a tendency to up regulate, mostly, the enzymes SOD (WD+UVB) and CAT (UVB and WD+UVB) to counteract the increase of ROS, but the action of this enzymes was not sufficient to control the increase of  $H_2O_2$  and some membrane damages occurred 1 day after stress. After 10 days, the general enhancement of the total antioxidant system (ABTS and GR activity) contribute to the return of the MDA and electrolyte leakage to levels close to the control plants. The enzymes, SOD and GR (WD+UVB), contribute to the diminishing of oxidative damages.

Accumulation of phenols in plants can be induced by abiotic and biotic stresses. In particular, flavonoids and phenolic acids are well known for their UVB absorbing capacity and antioxidant properties (e.g. Sreelatha and Padma (2009). Interestingly, in young *M. oleífera* plants, these metabolites seem to have an important role only after treatment WD+UVB (1 day). Phenols may help in the control of membrane damages provoked by the join action of these stresses, justify the similar membrane damages observed in plants of the treatments WD and WD+UVB. Phenols increase in WD+UVB may also protect the *M. oleífera* leaves from photodamage (Close and Mcarthur, 2002) maintaining the  $F_0$  and  $F_v/F_m$  values.

In conclusion, our data suggest that young *M. oleífera* plants present some tolerance to WD or UVB and that the combination of the two stresses led to lower stressful responses than the UV stress imposition alone (photosynthesis, pigments, starch and antioxidant activity). Also the UVB stress stimulated short term responses (1 day after stress) namely by increase pigment levels, but also induced damaging signals as the increase of lipid peroxidation and membrane permeability. Longer periods showed a higher capacity to revert to values close to normal, demonstrating that this species has a good adaptation capacity. Regarding these data, further studies should be performed in order to select most tolerant *M. oleífera* genotypes to cope arid regions with extreme UV Index (>11).

## Authors' Contribution

M Araújo, MC Dias and C Santos contributed equally to the planning of the experiment, interpreted data and wrote the manuscript together. M Araújo performed all of the experiments in the laboratory and the statistical analysis (MSc project). M Costa collaborated in germination, relative water content and electrolyte leakage. J Moutinho-Pereira and C Correia performed chlorophyll *a* fluorescence and gas exchange. C Santos collaborated in chlorophyll *a* fluorescence and gas exchanges and co-supervised all work. MC Dias supervised all work and participated in all daily experiments.

## Acknowledgements

FCT funded MC Dias fellow (SFRH/BPD/100865/2014). Timor-Leste government funded M Costa fellow.

## References

- Anwar, F., Bhangar, M.I.I., 2003. Analytical characterization of *Moringa oleifera* seed oil grown in temperate regions of Pakistan. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6558–63. doi:10.1021/jf0209894
- Bieza, K., Lois, R., 2001. An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiol.* 126, 1105–1115. doi:10.1104/pp.126.3.1105
- Caldwell, M.M., Ballaré, C.L., Bornman, J.F., Flint, S.D., Björn, L.O., Teramura, A.H., Kulandaivelu, G., Tevini, M., 2003. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2, 29–38. doi:10.1039/b211156j
- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S., 2003. Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* 30, 239. doi:10.1071/FP02076
- Close, D.C., McArthur, C., 2002. Rethinking the Role of Many Plant Phenolics: Protection from Photodamage Not Herbivores? *Oikos* 99, 166–172. doi:10.1034/j.1600-0706.2002.990117.x
- Correia, C.M., Torres-Pereira, M.S., Torres-Pereira, J.M.G., 1999. Growth, photosynthesis and UV-B absorbing compounds of Portuguese Barbeta wheat exposed to ultraviolet-B radiation. *Environ. Pollut.* 104, 383–388. doi:10.1016/S0269-7491(98)00191-2
- Dias, M.C., Azevedo, C., Costa, M., Pinto, G., Santos, C., 2014. *Melia azedarach* plants show tolerance properties to water shortage treatment: an ecophysiological study. *Plant Physiol. Biochem.* 75, 123–7. doi:10.1016/j.plaphy.2013.12.014
- Dias, M.C., Pinto, G., Correia, C.M., Moutinho-Pereira, J., Silva, S., Santos, C., 2013. Photosynthetic parameters of *Ulmus minor* plantlets affected by irradiance during acclimatization. *Biol. Plant.* 57, 33–40. doi:10.1007/s10535-012-0234-8

- Fedina, I., Hidema, J., Velitchkova, M., Georgieva, K., Nedeva, D., 2010. UV-B induced stress responses in three rice cultivars. *Biol. Plant.* 54, 571–574. doi:10.1007/s10535-010-0102-3
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K., 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207, 604–611. doi:10.1007/s004250050524
- Hollósy, F., 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* 33, 179–97.
- IPCC, 2013. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Irigoyen, J.J., Emerich, D.W., Sanchezdiaz, M., 1992. Water-Stress Induced Changes in Concentrations of Proline and Total Soluble Sugars in Nodulated Alfalfa (*Medicago-Sativa*) Plants. *Physiol. Plant.* 84, 55–60. doi:10.1034/j.1399-3054.1992.840109.x
- Joshi, P., Gartia, S., Pradhan, M.K., Panigrahi, S., Nayak, L., Biswal, B., 2013. Acclimation of clusterbean cotyledon to UV-B radiation in the presence of UV-A: partial restoration of photosynthetic energy balance and redox homeostasis. *Acta Physiol. Plant.* 35, 2323–2328. doi:10.1007/s11738-013-1245-6
- Lee, G.W., Lee, S., Chung, M.-S., Jeong, Y.S., Chung, B.Y., 2014. Rice terpene synthase 20 (OsTPS20) plays an important role in producing terpene volatiles in response to abiotic stresses. *Protoplasma* 20, 1–11. doi:10.1007/s00709-014-0735-8
- Lidon, F.C., Ramalho, J.C., 2011. Impact of UV-B irradiation on photosynthetic performance and chloroplast membrane components in *Oryza sativa* L. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 104, 457–466. doi:10.1016/j.jphotobiol.2011.05.004
- Luqman, S., Srivastava, S., Kumar, R., Maurya, A.K., Chanda, D., 2012. Experimental Assessment of *Moringa oleifera* Leaf and Fruit for Its Antistress, Antioxidant, and Scavenging Potential Using In Vitro and In Vivo Assays. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2012, 519084. doi:10.1155/2012/519084
- MAMAOT, 2013. *Estratégia de Adaptação da Agricultura e das Florestas às Alterações Climáticas - Portugal Continental* 88.
- Monteiro, C., Santos, C., Pinho, S., Oliveira, H., Pedrosa, T., Dias, M.C., 2012. Cadmium-induced cyto- and genotoxicity are organ-dependent in lettuce. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1423–34. doi:10.1021/tx300039t
- Nikolaeva, M.K., Maevskaya, S.N., Shugaev, a. G., Bukhov, N.G., 2010. Effect of drought on chlorophyll content and antioxidant enzyme activities in leaves of three wheat cultivars varying in productivity. *Russ. J. Plant Physiol.* 57, 87–95. doi:10.1134/S1021443710010127
- Nogues, S., Allen, D.J., Morison, J.I.L., Baker, N.R., 1999. Characterization of stomatal closure caused by ultraviolet-B radiation. *Plant Physiol.* 121, 489–496.
- Nogués, S., Baker, N.R., 2000. Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *J. Exp. Bot.* 51, 1309–1317.



- Pérez-Tortosa, V., López-Orenes, A., Martínez-Pérez, A., Ferrer, M. a., Calderón, A. a., 2012. Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. *Food Chem.* 130, 362–369. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.051
- Pfündel, E.E., 2003. Action of UV and visible radiation on chlorophyll fluorescence from dark-adapted grape leaves (*Vitis vinifera* L.). *Photosynth. Res.* 75, 29–39. doi:10.1023/A:1022486925516
- Popoola, J.O., Obembe, O.O., 2013. Local knowledge, use pattern and geographical distribution of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) in Nigeria. *J. Ethnopharmacol.* 150, 682–691. doi:10.1016/j.jep.2013.09.043
- Poulson, M.E., Boeger, M.R.T., Donahue, R. a., 2006. Response of photosynthesis to high light and drought for *Arabidopsis thaliana* grown under a UV-B enhanced light regime. *Photosynth. Res.* 90, 79–90. doi:10.1007/s1120-006-9116-2
- Pristov, J.B., Jovanović, S.V., Mitrović, A., Spasojević, I., 2013. UV-irradiation provokes generation of superoxide on cell wall polygalacturonic acid. *Physiol. Plant.* 148, 574–81. doi:10.1111/ppl.12001
- Rivas, R., Oliveira, M.T., Santos, M.G., 2013. Three cycles of water deficit from seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* 63, 200–8. doi:10.1016/j.plaphy.2012.11.026
- Rodriguez, E., Azevedo, R., Fernandes, P., Santos, C., 2011. Cr(VI) induces DNA damage, cell cycle arrest and polyploidization: a flow cytometric and comet assay study in *Pisum sativum*. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 1040–7. doi:10.1021/tx2001465
- Rodriguez, E., da Conceição Santos, M., Azevedo, R., Correia, C., Moutinho-Pereira, J., Ferreira de Oliveira, J.M.P., Dias, M.C., 2015. Photosynthesis light-independent reactions are sensitive biomarkers to monitor lead phytotoxicity in a Pb-tolerant *Pisum sativum* cultivar. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 574–585. doi:10.1007/s11356-014-3375-9
- Sangtarash, M.H., Qaderi, M.M., Chinnappa, C.C., Reid, D.M., 2009. Differential sensitivity of canola (*Brassica napus*) seedlings to ultraviolet-B radiation, water stress and abscisic acid. *Environ. Exp. Bot.* 66, 212–219. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.03.004
- Savitch, L. V, Pockock, T., Krol, M., Wilson, K.E., Greenberg, B.M., Huner, N.P.A., 2001. Effects of growth under UVA radiation on CO<sub>2</sub> assimilation, carbon partitioning, PSII photochemistry and resistance to UVB radiation in *Brassica napus* cv. Topas. *Aust J Plant Physiol* 28, 203–212. doi:10.1071/PP00116
- Sharma, P., Dubey, R.S., 2007. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Rep.* 26, 2027–2038. doi:10.1007/s00299-007-0416-6
- Shu, S., Yuan, L.-Y., Guo, S.-R., Sun, J., Yuan, Y.-H., 2013. Effects of exogenous spermine on chlorophyll fluorescence, antioxidant system and ultrastructure of chloroplasts in *Cucumis sativus* L. under salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* 63, 209–16. doi:10.1016/j.plaphy.2012.11.028
- Silva, E.N., Ferreira-Silva, S.L., Fontenele, a. D. V, Ribeiro, R.V., Viégas, R.A., Silveira, J. a G., 2010. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected

- to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. *J. Plant Physiol.* 167, 1157–1164. doi:10.1016/j.jplph.2010.03.005
- Sims, D. a, Gamon, J. a, 2002. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sens. Environ.* 81, 337–354. doi:10.1016/S0034-4257(02)00010-X
- Spinelli, F., Cellini, A., Marchetti, L., Nagesh, K.M., Piovene, C., 2011. Emission and Function of Volatile Organic Compounds in Response to Abiotic Stress, in: *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. InTech, pp. 367–394. doi:10.5772/895
- Sreelatha, S., Padma, P.R., 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods Hum. Nutr.* 64, 303–11. doi:10.1007/s11130-009-0141-0
- Takahashi, S., Badger, M.R., 2011. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends Plant Sci.* 16, 53–60. doi:10.1016/j.tplants.2010.10.001
- Verdaguer, D., Llorens, L., Bernal, M., Badosa, J., 2012. Photomorphogenic effects of UVB and UVA radiation on leaves of six Mediterranean sclerophyllous woody species subjected to two different watering regimes at the seedling stage. *Environ. Exp. Bot.* 79, 66–75. doi:10.1016/j.envexpbot.2012.01.008

# **Capítulo III**

## **Considerações Finais**



## 1. Considerações Finais

Com este trabalho foi possível demonstrar que *M. oleifera* tem capacidade de resposta aos fatores abióticos testados. É por isso, agora, possível responder às questões inicialmente propostas:

- Qual o grau de suscetibilidade de *M. oleifera* a seca/défice hídrico?
- De que forma *M. oleifera* reage à radiação UVB?
- Quais as interações que ocorrem quando as plantas são sujeitas a dois tipos de stress combinados como o défice hídrico e UVB?
- Como evolui a resposta funcional de *M. oleifera* após a imposição do stress?

Tal como já tinha sido estudado por outros autores, *M. oleifera* demonstrou ter mecanismos de adaptação à seca, possivelmente também motivados pela origem das sementes ter sido Timor-Leste, onde a temperatura é constantemente elevada e tem um grande leque de variações hídricas.

Para ultrapassar o stress causado pela radiação UVB fornecida, as plantas jovens de *M. oleifera* aumentaram o conteúdo em pigmentos imediatamente após o stress (medidos 1 dia depois do fim das exposições) e mantiveram esses níveis de pigmentos sempre mais elevados do que as plantas controlo. Adicionalmente, esta espécie também aumentou a permeabilidade membranar assim como o conteúdo em MDA, imediatamente após o stress imposto (1 dia) mas a atividade antioxidante total só aumentou após 10 dias.

Com este trabalho podemos constatar que o comportamento de *M. oleifera* em relação à combinação de dois fatores abióticos é similar ao descrito na literatura. A resposta não é cumulativa, antes pelo contrário, as plantas sujeitas à combinação de stress demonstraram maior capacidade para enfrentar as adversidades, levando a uma resposta menos 'stressante' do que por exemplo as plantas sujeitas apenas a UVB.

De um modo geral, todos os tratamentos reduziram a taxa fotossintética, aumentaram os pigmentos e os açúcares imediatamente após o stress (1 dia). Contudo, após 10 dias, as plantas já começam a mostrar sinais de recuperação. Face a isto seria interessante estudar o que acontece após a imposição de stress com uma duração maior do que 10 dias.

Seria também de elevado interesse estudar a resposta de plantas jovens desta espécie face a outros fatores abióticos, como por exemplo, a elevadas e baixas temperaturas, a diferentes intensidades de UVB e porque não UVC, a sais e a metais. Também seria interessante perceber de que forma esta espécie é capaz de resistir a fatores bióticos, como por exemplos microrganismos.

A realização destes estudos em plantas desta espécie provenientes de diferentes localizações também seria interessante para perceber quais as mais tolerantes e porventura criar planos de melhoramento da espécie para a tornar mais tolerante e para ter um rendimento maior e ser usada na indústria agro-farmacêutica, assim como pelas populações mais pobres dos países onde ela está presente, uma vez que é uma fonte rica em nutrientes, vitaminas e minerais.

# Anexos





Parte do trabalho realizado no âmbito desta dissertação de mestrado foi apresentado no IV encontro nacional de pós-graduação em Ciências Biológicas, realizado na Universidade de Aveiro entre 30 de Março e 2 de Abril de 2015. Seguem-se os resumos da Comunicação Oral e da Comunicação Póster apresentados.

Anexo I – Comunicação Oral: Araújo, M., Costa, M., Santos, C., Dias, M.C., 2015. Photosynthetic and oxidative disorders in *Moringa oleifera* leaves exposed to climate changes stressors: UVB and drought. IV Encontro Nacional Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Aveiro University.

Anexo II – Comunicação Poster: Machado, F., Araújo, M., Costa, M., Pinto, D., Silva, A., Santos, C., Dias, M.C., 2015. Effect of drought stress and UVB radiation on metabolic profile of Drumstick. IV Encontro Nacional Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Aveiro University.

**Anexo I – Comunicação Oral****(C.O.37) Photosynthetic and oxidative disorders in *Moringa oleifera* leaves exposed to climate changes stressors: UVB and drought**Márcia Araújo, Maria Costa, Conceição Santos, Maria Celeste Dias\*

Universidade de Aveiro

\*Corresponding author: celeste.dias@ua.pt

Extreme abiotic factors like drought or UVB is influencing climate, and impact plant production. *Moringa* (*Moringa oleifera* L.) is a woody species (Moringaceae) native from sub-Himalaya region and currently worldwide spread particularly in tropical countries and in regions under high climate stress pressure (e.g. South Asia). The interest on this species is emerging due to its multiple ethnobotanical uses, and its nutritional value. However the impact of climate changes on this species remains unclear. In this work, we focus on how drought and UVB factors - alone or combined - can affect photosynthesis and oxidative homeostasis of *M. oleifera*, and the plant's ability to recover after stress imposition. For that, 2 month old plants of *M. oleifera* were subjected (under greenhouse conditions) to the following treatments: drought stress (DS), UVB (UVB), DS+UVB and recovery (R, 10 days). Parameters associated with photosynthesis (F0, Fv/Fm), and with oxidative stress (malondialdehyde, MDA) and membrane damage (cell Membrane Permeability, CMP) and were determined. Preliminary data support that the UVB stress seems to have more impact than the others stresses, as all parameters were more drastically affected under this condition. Curiously, plants pretreated with DS and then exposed to UVB (DS+UVB) showed lower influence on photosynthetic parameters and on oxidative stress damages, supporting that water deficit may be used to acclimate plants to UVB stress. This hypothesis is currently under investigation (e.g. increase of the antioxidant stress). Also, our data demonstrate that studying the combination of these factors within a climate change perspective is fundamental to understand their impact on *Moringa* production.

Acknowledge: The authors thanks to FCT to support MC Dias (SFRH/BPD/100865/2014) and Ministério da Agricultura de Timor Leste.

*Keywords:* *Moringa oleifera*, oxidative stress, UVB, drought stress, photosynthesis

**Anexo II – Comunicação Poster****(C.P.12) Effect of drought stress and UVB radiation on metabolic profile of Drumstick**

Filipa Machado, Márcia Araujo, Maria Costa, Diana Pinto, Artur Silva, Conceição Santos, Maria Celeste Dias\*

Universidade de Aveiro

\*Corresponding author: celeste.dias@ua.pt

Drumstick (*Moringa oleifera* L.) is distributed mostly in tropics/subtropics. This species have high nutritional and medicinal value. Also, interest on its industrial applications is emerging, supporting its putative economic value. Particularly, drumstick occurs in regions under desertification risk (e.g. Africa, South America) and has been for centuries a nutritional source (it provides a rich and unusual combination of important minerals, vitamins, amino acids, phenolic compounds and protein) for local populations. However, still little is known on its metabolome profile, and on the influence that UVB rays (increasing due to ozone depletion) and drought may have on drumstick. The aim of this work is to characterize metabolic changes in leaves of 2-month old drumstick exposed to drought stress (DS) and to UVB stress, (alone or combined), and subjected to a recovery period of 10 days. For that, spectrophotometric analyses and GC-MS, HPLC-MS will be used. Some of the spectrophotometric data on sugars and pigments indicate that total soluble sugars (TSS) increase with dissection (e.g. may have an osmotic role). Curiously, plants exposed to DS followed by UVB stress showed during the recovery phase an increase in TSS content, supporting that these conditions influence the metabolism of drumstick, but at different stages of exposure. Also, starch levels increased in the UVB-treated leaves, while decreasing during the recovery phase, supporting that UVB may directly stimulate metabolism associated with starch synthesis, or impair its degradation. However, the removal of UVB leads to a turnover of this metabolic response, decreasing the levels of starch. In UV stressed plants the content of pigments increases, an effect that was stabilized during the recovery. The preliminary data obtained in the present study is being confirmed by mass spectroscopy data analyses, but overall supports that both DS and UVB stress influence drumstick metabolism, being UVB more severe overall than DS.

**Acknowledgements:** The authors thanks to FCT to support MCDias (SFRH/BPD/100865/2014) and the Ministério da Agricultura de Timor-Leste. FMachado and MAraujo contributed equally to this work.

**Keywords:** *Moringa oleifera*, pigments, soluble sugars, starch, UVB radiation, drought stress