



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA



FLAVIO LOZANO ISLA

**GERMINAÇÃO DE *Jatropha curcas* L. SOB ENVELHECIMENTO / SALINIDADE E
DESENVOLVIMENTO DO PACOTE PARA ANÁLISE DE DADOS
DE GERMINAÇÃO – GerminaR**

RECIFE

2017

FLAVIO LOZANO ISLA

**GERMINAÇÃO DE *Jatropha curcas* L. SOB ENVELHECIMENTO / SALINIDADE E
DESENVOLVIMENTO DO PACOTE PARA ANÁLISE DE DADOS
DE GERMINAÇÃO – GerminaR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de mestre em Botânica

Área de concentração:

Fisiologia Vegetal

Orientador:

Dr. Marcelo Francisco Pompelli

Co-orientador:

Dr. Egídio Bezerra Neto

RECIFE-PE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

L925g Lozano-Isla, Flavio
Germinação de *Jatropha curcas* L. sob envelhecimento /
salinidade e desenvolvimento do pacote para análise de dados de
germinação – GerminaR / Flavio Lozano Isla. – 2017.
110 f.: il.

Orientador: Marcelo Francisco Pompelli.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Recife,
BR-PE, 2017.

Inclui referências e anexo(s).

1. Alometria 2. Biocombustível 3. Estocagem de sementes
4. Germinação 5. Github 6. Pacote em R 7. Salinidade I. Pompelli,
Marcelo Francisco, orient. II. Título

CDD 581

FLAVIO LOZANO ISLA

**GERMINAÇÃO DE *Jatropha curcas* L. SOB ENVELHECIMENTO / SALINIDADE E
DESENVOLVIMENTO DO PACOTE PARA ANÁLISE DE DADOS
DE GERMINAÇÃO – GerminaR**

Dissertação apresentada e _____ em ____/____/____

Orientador

Dr. Marcelo Francisco Pompelli
Universidade Federal de Pernambuco

Co-orientador

Dr. Egídio Bezerra Neto
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Examinadores

Dr^a. Cláudia Ulisses de Carvalho Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr^a. Denise Garcia de Santana
Universidade Federal de Uberlândia

Dr. Tercilio Calsa Junior
Universidade Federal de Pernambuco

Suplente

Dr^a Carmen Silvia Zickel
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedicado a:

Mi hija Alice Angelica Lozano de Albuquerque, que es la luz de mi camino.

A Miriam Vieira de Albuquerque por su sacrificio y amor incondicional.

Mis padrinos Antonio Vega y Agripina Bardales, que siempre están en mis pensamientos.

Mis padres Aida Angelica Isla y Alberto Lozano por su amor y apoyo para lograr mis metas.

Mi guía espiritual e intelectual, mi abuelo Ing. Agro. Andrés Avelino Isla Maldonado.

AGRADECIMIENTOS

A Deus o grande mestre do universo, por guiar o meu caminho e sempre cuidar de mim e de minha família.

A mãe da minha filha, Med. Vet. Miriam Viera de Albuquerque, pela sua paciência, amor e ajuda incondicional durante todo este tempo e ser a pessoa que sacrificou tudo para me permitir culminar este trabalho.

A meu amigo Luciano Lucena, pela ajuda constante e por compartilhar seu tempo com minha família.

A meu orientador o Prof. Dr. Marcelo Francisco Pompelli e sua família pelo convite a formar parte de sua equipe de pesquisa e sua orientação ao longo destes dois anos de aprendizagem contínuo, onde pude aprender de sua dedicação como cientista.

A meu Co-orientador o Prof. Dr. Egídio, pelos seus conselhos e sua ajuda no trabalho de pesquisa.

A meus amigos e colegas do laboratório: Natalia Corte-Real, Orlando Santos, Mariana Lins pela receptividade e ajuda durante minha estadia no mestrado.

A meu amigo Pedro Vitor que com muito carinho e atenção sempre esteve disposto a me ensinar os procedimentos do laboratório e pela boa vontade em dispensar sua ajuda nos meus experimentos.

Aos meus amigos compatriotas Rafael Zarate, Gary Vargas e Sayuri pela ajuda durante a instalação e avaliação dos experimentos.

Ao Laboratório de Ecofisiologia Vegetal (LEV) pela disponibilidade oferecida para o desenvolvimento de meu trabalho de pesquisa.

Aos membros da banca examinadora: Dr^a Carmen Silvia Zickel, Dr^a Cláudia Ulisses de Carvalho Silva, Dr^a. Denise Garcia de Santana e Dr. Tercilio Calsa Junior pelo seu tempo para ajudar a melhorar este documento.

Ao Programa de Pós Graduação de Botânica e seus colaboradores: prof. Reginaldo Carvalho a prof.^a Teresa Buriel e Kênia Muniz, pela sua disposição para ajudar e guiar sempre a os estudantes.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pelo financiamento e ajuda durante a minha estadia para os estudos de mestrado.

A mis padres Aida Angelica Isla Saurino y Alberto Lozano Ramirez por esforzarse todo el tiempo para ayudarme a cumplir mis metas y haber construido un hombre de bien para la sociedad.

A mi abuelo Andrés Avelino Isla Maldonado por ser mi inspiración de mejora continua y sus consejos que son muy valiosos para mí, así como influenciar fuertemente en mi disciplina y carácter como persona.

A la familia Rios-Saurino. A mi tío Miguel Rios por sus consejos; a mi abuela Cointa por su amor y cariño; y a mis tías Galia, Belén y Diana por ser un ejemplo a seguir y su apoyo incondicional

A mi tía Ursina Saurino, por su preocupación y apoyo constante durante mi formación académica

A Jimmy Gómez, Sebastián Davis Bayly y Rosaura Laura, mis mejores amigos, por ser parte de este logro y siempre estar apoyándome a nivel personal y académico.

A Omar Benites por su ayuda y disposición para ayudarme en los trabajos de programación, así como compartir sus conocimientos, que dio fruto y desarrollo de uno de los capítulos de este trabajo

A Miluska Eliana Wong Dávila por su apoyo y aliento para poder estar hoy en Brasil para estudiar la maestría.

A la Dra. Evelyn Farfan y el Ing Raymundo Gutiérrez por sus consejos y apoyo constante para mi formación como investigador

Al Dr. Raúl Blas por ser mi mentor y consejero desde mi formación como investigador, y por su confianza e motivación para desarrollar mis habilidades como científico.

A mi alma máter la Universidad Nacional Agraria la Molina quien me permitió adquirir los conocimientos, identidad y ética como persona y profesional.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	8
RESUMO.....	9
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
<i>Jatropha curcas</i>	15
Produção comercial e biodiesel	16
Estocagem de sementes em <i>Jatropha curcas</i>	18
Análise de variáveis de germinação	20
Software estatístico R	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
MANUSCRITO I	
MANUSCRITO II	
ANEXOS	

LOZANO-ISLA, Flavio (MSc.) Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Fevereiro, 2017. Germinação de *Jatropha curcas* L. sob envelhecimento / salinidade e desenvolvimento do pacote para análise de dados de germinação – GerminaR. Orientador: Marcelo Francisco Pompelli; Co-orientadoras: Egídio Bezerra Neto.

RESUMO

Jatropha curcas L. é uma espécie cujo cultivo apresenta boas características para a produção de biocombustível. É amplamente conhecida pela capacidade de resistência à seca e pela habilidade de crescer em solos degradados e de baixa fertilidade. Entretanto, são escassos os estudos visando a adaptação da espécie às condições de estocagem das sementes e germinação em condições salinas. Além disso, há grande dificuldade de processar os dados das variáveis de germinação, as quais apresentam alta complexidade. Por esta razão, este trabalho teve três objetivos: (i) geração de um pacote no software estatístico R para análise de dados e apresentação gráfica das principais variáveis de germinação de sementes; (ii) avaliar se é possível evitar a perda da germinabilidade das sementes através do processamento com redução da umidade no interstício das sementes; (iii) avaliar as respostas germinativas, bem como o desenvolvimento inicial de cinco genótipos de *J. curcas* oriundos de diferentes regiões geográficas do Brasil em presença de diferentes concentrações de NaCl. No primeiro capítulo, desenvolveu-se um pacote para o software R chamado “GerminaR”, o qual conta com quatro funções principais, (i) cálculo de 11 variáveis de germinação; (ii) avaliação temporal da germinação; (iii) expressão gráfica dos resultados e (iv) aplicação interativa “GerminaQuant for R”. O software está sendo disponibilizado tanto na versão para PC, através do R quanto na versão *online* para uso em qualquer dispositivo móvel, sem a necessidade de instalação do software, dispensando o conhecimento prévio de programação por parte do usuário. No capítulo 2 foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro o estudo da manutenção da viabilidade e propriedades bioquímicas causadas pelo envelhecimento natural durante a estocagem das sementes de *Jatropha curcas* L. por um período de até 12 meses. Os resultados mostram que a redução da umidade no interstício das sementes permitiu estabilizar a germinabilidade e manter as sementes viáveis, além de conservar o conteúdo de óleo até o sexto mês, de forma semelhante ao registrado com outras características bioquímicas das sementes, fato corroborado pela redução drástica da taxa respiratória e do potencial osmótico das sementes. No segundo experimento foram testados cinco genótipos de *J. curcas* e cinco concentrações de NaCl (0, 50, 75, 100 e 150 mM L⁻¹) aplicado na água de irrigação. Os dados mostraram que a adição de NaCl teve efeitos negativos na maioria dos parâmetros de germinação e de desenvolvimento inicial de plântulas. Na concentração do 150 mM.L⁻¹ houve apenas 4% de germinação; entretanto, as

plantas não conseguiram se desenvolver. O tempo médio de germinação aumentou linearmente com o aumento das concentrações de sais. No tratamento controle, a germinação iniciou ao terceiro dia, efeito retardado em quatro dias em média a 150 mM.L⁻¹. Embora a germinação fora avaliada até 150 mM.L⁻¹, os parâmetros biométricos e de biomassa foram computados somente até 100 mM.L⁻¹. Dentre estes parâmetros, o peso seco da folha, a área foliar por planta e área foliar total, bem como a altura da planta foram as principais características negativamente influenciadas pela salinidade. De acordo as análises multivariadas, os genótipos 114, 171 e 183 mostraram-se como potencialmente tolerantes enquanto os acessos 218 e 133 foram sensíveis, resultado que pode ser corroborado pelos distintos parâmetros estudados.

Palavras-chave: alometria, biocombustível, estocagem de sementes, germinação, GitHub, pacote em R, salinidade.

LOZANO-ISLA, Flavio (MSc.) Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Fevereiro, 2017. Germinação de *Jatropha curcas* L. sob envelhecimento / salinidade e desenvolvimento do pacote para análise de dados de germinação – GerminaR. Orientador: Marcelo Francisco Pompelli; Co-orientadoras: Egídio Bezerra Neto.

ABSTRACT

Jatropha curcas L. is a crop with good qualities for biofuel production. It is widely known for its drought resistance characteristics and ability to grow in degraded soils and with low fertility. However, there are few works, studying the conservation of the species to the seed storage conditions and germination under saline conditions. In addition, there is a great difficulty in processing the germination variables, which are highly complex. For this reason, this work had three objectives: (i) generation of a package in the statistical software R for data analysis and graphical presentation of the main variables of seed germination; (ii) evaluate if it is possible to stabilize the loss of seed germinability through the storage reducing the water in the atmosphere; (iii) to evaluate the germinative responses and the initial development of five genotypes of *J. curcas* from different geographic regions of Brazil in the presence of different concentrations of NaCl. In Chapter 1, a R package was developed and called "GerminaR", which has four main functions, (a) calculation of eleven germination variables; (b) temporal evaluation of germination; (c) graphic expression of results and (d) interactive application "GerminaQuant for R". The software is available both in the installable version for PC, through the R and in the online version for use in any mobile device, without the need of installing the software, and prior knowledge of programming by the user. In Chapter 2, two experiments were carried out, the first one being the study of the maintenance of the viability and biochemical properties caused by the natural aging during the storage of the seeds of *Jatropha curcas* L. for a period of up to 12 months. The results show that the reduction of moisture in the interstice of the seeds allowed to stabilize the germinability and maintain it viable, besides conserving the oil content until the sixth month, in a similar way were registered with other biochemical characteristics of the seeds, a fact corroborated by the drastic reduction in the respiratory rate and the osmotic potential of the seeds. In the second experiment, five different genotypes of *J. curcas* and five concentrations of NaCl (0, 50, 75, 100 and 150 mM L⁻¹) were tested in the irrigation water. The data showed that the addition of NaCl had negative effects on most parameters of germination and initial development of seedlings. At the concentration of 150 mM there was only 4% of germination; and the plants had difficult to develop. The mean germination time increased linearly with increasing salt concentrations. In the control treatment, the germination started on the third day, delayed effect in four days on average in the treatment of 150 mM.

Although the germination was evaluated up to 150 mM, the biometric and biomass parameters were computed only up to 100 mM. Among these parameters, leaf dry weight, leaf area per plant and total leaf area as well plant height were the main characteristics negatively influenced by salinity. According to the multivariate analyzes, genotypes 114, 171 and 183 were shown to be potentially tolerant while the 218 and 133 sensitive genotypes, result that can be corroborated by the different studied parameters.

Keywords: allometric, biofuel, seed storage, GitHub, R package, salinity, germination.

INTRODUÇÃO

Jatropha curcas L., popularmente conhecida como pinhão-manso, é uma espécie lenhosa, pertencente à família Euphorbiaceae, altamente tolerante à seca. A espécie é nativa de regiões da América, englobando desde México, passando pelo Peru, Brasil e Chile; porém, devido às suas propriedades, é amplamente cultivada em muitos países tropicais e subtropicais, onde se encontra adaptada a ampla variedade de condições edafoclimáticas. Pela sua relevância na indústria bioenergética de produção de óleo para biocombustível, *J. curcas* tem despertado grande interesse de estudo. Vale ressaltar que, atualmente no Brasil, cerca 90% do óleo utilizado na produção de biocombustível advém de espécies comestíveis, classe na qual o pinhão-manso não se inclui.

As sementes são a unidade básica de propagação das plantas, a qual geralmente contém material de reserva (*e.g.*, amido, óleo, proteínas), que são de grande importância na alimentação humana e animal e no estabelecimento das espécies vegetais. É conhecido que o envelhecimento produzido pela estocagem das sementes, causa muitos problemas, especialmente por fatores como umidade e temperatura nos locais de armazenamento. Entretanto, com o uso de metodologias de controle (*e.g.*, redução de umidade no interstício das sementes e baixas temperaturas) pode se tentar maior sobrevivência das mesmas. Dentre estes dois, parece que a redução da umidade possa responder melhor do que a redução da temperatura de estocagem, visto que recentemente foi demonstrado que as sementes de *J. curcas* perdem rapidamente sua viabilidade, com drástica redução nas reservas.

A erosão do solo, como consequência da salinidade, é um dos principais fatores que levam a perda de produtividade na agricultura mundial. A salinidade é mais frequente na agricultura irrigada, fato que acomete, todos os anos, cerca de 1 a 2% de todas as áreas agriculturáveis do mundo. A salinização é ainda mais grave em ecossistemas áridos e semiáridos, uma vez que nestes a prática da irrigação é estritamente necessária para a agricultura. Em consequência, o estresse salino associado do estresse hídrico são os principais fatores que dificultam a produção comercial das espécies nestes ambientes.

Ao passo que *J. curcas* é amplamente conhecida por sua tolerância à seca, são raros os estudos englobando aspectos de tolerância à salinidade. Entretanto, é provável que as características que popularizaram o pinhão-manso como tolerante à seca, não devam estar necessariamente presentes em todos os genótipos, além de que, não se conhece o grau de tolerância destes genótipos.

Não é novidade que pesquisadores que trabalham com fisiologia da germinação sentem grande dificuldade com os cálculos das variáveis de germinação, as quais apresentam alta diversidade de expressões matemáticas e equações de difícil implementação em uma planilha simples de cálculo. Neste sentido, foi lançado recentemente o software GerminaQuant 1.0, que permite avaliar algumas das variáveis de germinação. Porém, por mais que esse novo software tenha trazido grande avanço à tecnologia de sementes, ele ainda demanda novas ferramentas que se adaptem ao manejo e análise de amplas matrizes de dados. Dessa forma, o desenvolvimento de um pacote no software estatístico R – o GerminaR, o qual englobe a análise de dados das principais variáveis de germinação, análises gráficas e estatísticas são notavelmente interessantes.

Neste sentido, esse trabalho pretende auxiliar, no conhecimento e caracterização do perfil germinativo e desenvolvimento inicial de sementes de *J. curcas*, além de avaliar o grau de tolerância da espécie a distintos níveis de salinidade e os problemas fisiológicos decorrentes da estocagem das sementes. O trabalho propõe, ainda, uma ferramenta potente que reduzirá a análise e o processamento dos dados para as variáveis de germinação, permitindo uma análise estatística consistente com resultados gráficos de alta resolução, que permitirá a gestão de dados e tomada de decisões para os pesquisadores.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Jatropha curcas

Jatropha curcas L. é uma espécie tropical nativa da América Central e do do Sul (ACHTEN et al., 2008) mas, amplamente distribuída de forma natural ou cultivada em muitos países da América Latina, África, Índia e Sudeste Asiático (PANDEY et al., 2012). *J. curcas* se encontra como uma espécie adaptada a ampla variedade de climas, podendo se desenvolver em climas com temperaturas médias entre 9°C e 18°C, precipitação média de 480 a 2380 mm e alturas de até 1000 m (ARRUDA et al., 2004; JONGSCHAAP et al., 2007).

A espécie foi descrita pela primeira vez pelo botânico sueco Carl Linnaeus em 1753. É uma das muitas espécies do gênero *Jatropha*, um membro da família Euphorbiaceae. O gênero engloba cerca de 170 espécies (HELLER, 1996), todas apresentam um cariótipo 2n contendo 22 cromossomos (CARVALHO et al., 2008). Segundo BRITTAINE; LUTALADIO (2010), *J. curcas* tem muitos nomes vernáculos, incluindo: physic nut or purging nut (Inglês), pinhão manso (Brasil), pourghère (Francês), purgeernoot (Holandês), purgiernuss (Alemão), purgeira (Português), fagiola d'India (Italiano), galamaluca (Moçambique), habel meluk (Árabe), arand safed (Hindi), sabudam (Thai), bagani (Costa do Marfim), butuje (Nigéria), makaen (Tanzânia), piñoncillo (México), tempate (Costa Rica) e piñon (Guatemala).

O pinhão-manso, é uma espécie lenhosa, que pode atingir altura de 3 a 5 m, mas em condições favoráveis pode ter altura de 8 a 10 m (KUMAR; SHARMA, 2008; DIVAKARA et al., 2010). A floração ocorre durante a estação chuvosa (RAJU; EZRADANAM, 2002), muitas vezes com dois picos no mesmo ano, neste caso durante o verão e outono. Entretanto, nas regiões permanentemente úmidas, a floração ocorre durante todo o ano (HELLER, 1996). As flores de *J. curcas* são unissexuais dispostas em inflorescências terminais monóicas (TEWARI, 2007), apresentando coloração amarelo-esverdeada, além de pentâmeras. As flores femininas apresentam pedúnculos longos e isolados, ovário súpero com nectário em sua base, três carpelos com três estigmas bifurcados e três lóculos, produzindo cada um, um óvulo. As flores masculinas são diplostêmones, com 10 estames, 8 homodínamos, unidos apenas pela base. As anteras são bitecadas e livres entre si, com deiscência do tipo longitudinal (CORTE-REAL et al., 2016). Os frutos apresentam diâmetro polar variando de 2,9 a 34 mm e diâmetro equatorial variando de 1,9 a 28,6 mm (POMPELLI et al., 2010b). Independente do estágio de desenvolvimento, os frutos têm formato oval com epicarpo apresentando coloração externa inicialmente verde, passando a amarelo, citrino e por fim preto, quando completa o estágio de

maturação (ARRUDA et al., 2004). Os frutos de *J. curcas* são provenientes de ovário tricarpelar e trilocular, com um óvulo em cada lóculo. Em alguns casos, entretanto, pode ser observada a má formação ou aborto de um óvulo ou mesmo de dois óvulos (CORTE-REAL et al., 2016). A semente é relativamente grande; quando secas podem medir de 15 a 20 mm de comprimento e 10 a 13 mm de largura; apresentando tegumento rijo e quebradiço (POMPELLI et al., 2010). Dependendo da variedade e dos tratos culturais, a semente, pode pesar de 0,55 g a 0,80 g, a qual pode conter entre 34% a 45% de casca e 55% a 66% de amêndoa. Nessas sementes são encontradas ainda, 7,2% de água e 37,5% de óleo (ARRUDA et al., 2004; POMPELLI et al., 2010b).

O óleo extraído das sementes tem sido utilizado para fabricação de biodiesel, sabão e compostos medicinais; sendo o produto final mais valioso, com propriedades como baixa acidez, boa estabilidade à oxidação em comparação com óleo de soja e de baixa viscosidade comparada com óleo de rícino (OM TAPANES et al., 2008). Por outro lado, se conhece muito pouco da bioquímica, fisiologia e do seu comportamento perante a diferentes fatores ambientais, bem como os aspectos agrônômicos, que ainda precisam ser melhor explorados.

Produção comercial e biodiesel

A espécie *J. curcas* é uma boa candidata entre as espécies disponíveis para produção de energias renováveis, devido as suas características peculiares, como a tolerância à seca (OPENSHAW, 2000), crescimento rápido, fácil propagação e maior teor de óleo do que outras culturas oleaginosas (ACHTEN et al., 2008). Seu rápido crescimento, ampla gama de adaptação ambiental e a arquitetura da planta, faz dela forte candidata para a produção de óleos para fins bioenergéticos, despertando grande interesse de estudo (SUJATHA; REDDY; MAHASI, 2008).

J. curcas é uma cultura promissora para a produção de bioenergia sustentável. As sementes apresentam em média 25 até 58% de óleo (POMPELLI et al., 2010b; PANDEY et al., 2012), composto basicamente por ácidos graxos insaturados, chegando a valores de até 73% (KUMAR; SHARMA, 2008), os preferíveis das indústrias de biocombustíveis (MONCALEANO-ESCANDON et al., 2013). Seu óleo é de fácil conversão a biocombustível com efeitos positivos na ecologia e desenvolvimento sócio econômico dos locais de produção. O óleo extraído das sementes pode ser usado como combustível em motores a diesel de forma pura ou misturado com etanol (GÜBITZ, 1999) ou diesel de petróleo. Tal óleo foi inicialmente utilizado como um substituto do diesel durante a Segunda Guerra Mundial (HELLER, 1996; GÜBITZ, 1999). De lá para cá, vários outros testes foram realizados. No ramo aeroviário, a

companhia aérea Air New Zealand apresentou-se como a primeira empresa aérea a testar o biodiesel de *J. curcas* em um Boeing 747. Na ocasião a empresa misturou 50% de óleo de *J. curcas* com 50% de combustível convencional, obtendo resultados muito promissores e na época anunciou que até 2013 pelo menos 10% do combustível usado em suas aeronaves viria desta cultura, o que reduziria os custos de manutenção em um terço (JANSEN, 2013), mas para a surpresa de todos, essa meta foi atingida ainda no final de 2012, lembrando que para se atingir a meta foi necessário o plantio de 84.000 ha de *J. curcas*, de modo a se produzir cerca de 160 milhões de litros de biodiesel. Em 2009 foi a vez da Continental Airlines testar com sucesso o uso da mistura biodiesel de *J. curcas* como combustível convencional em um Boeing 737-800. O voo de teste durou cerca de duas horas e marcou um passo promissor para a indústria da aviação por buscar alternativas ecológicas mais baratas e ambientalmente mais interessantes. A partir daí outras companhias aéreas anunciaram o uso da mistura de óleo de *J. curcas* ao combustível convencional em suas aeronaves; alguns chegaram a testar a mistura de 70% de biodiesel com 30% de combustível convencional. Todos os testes mostraram que esta mistura também poderia ser promissora.

Outra vantagem do cultivo de *J. curcas* é que a espécie pode ser cultivada em terras marginais, de baixa fertilidade, que não seriam ideais para o cultivo de culturas tradicionais. Esse fato, não só ajuda o meio ambiente mas permite a utilização de terras marginais, potencialmente degradáveis pela ação antrópica, ajudando, portanto, na reabilitação dos ecossistemas degradados (ARRUDA et al., 2004; PANDEY et al., 2012). Seu cultivo requer tecnologias simples, de baixo investimento inicial. O rendimento de sementes relatado para *J. curcas* varia de 0,5-12 toneladas/ano em cada hectare plantado. Dependendo do solo, nutrientes e condições pluviométricas, *J. curcas* pode apresentar uma vida produtiva de mais de 30 anos (FRANCIS et al., 2005), iniciando sua fase produtiva após 1 ano do plantio, quando começa a produzir sementes de forma apreciável (CARVALHO et al., 2008).

Em termos de produção mundial, estima-se que existam cerca 2,5 milhões de hectares de terras com cultivo comercial de *J. curcas* plantadas na Índia e na China (FAIRLESS, 2007), enquanto que no Brasil não se tem uma estimativa da produção, pois aqui a espécie encontrou muitos pesquisadores descrentes das vantagens dessa cultura. Entretanto, com o advento do Programa Brasileiro de Biodiesel, houve grande demanda por óleos vegetais, e com isso *J. curcas* pôde ganhar destaque num cenário a médio e longo prazo. Acredita-se que o verdadeiro potencial de *J. curcas*, ainda não tenha sido completamente explorado. Espera-se, entretanto, que a partir dos apelos sócio econômicos e ambientais (e.g., créditos mundiais de carbono), a espécie possa ganhar, ainda mais incentivo. No entanto, existem, vários desafios agrotecnológicos para sua exploração comercial, como o alto custo do processo de extração do

óleo, sendo este o fator mais importante (PANDEY et al., 2012), o qual será facilmente contornável com a ampliação dos sistemas de produção em larga escala. Neste sentido, o Brasil se sobressai em relação a outros países produtores de *J. curcas*; em especial pela sua grande extensão territorial e existência de grandes extensões de terras marginais, onde o cultivo de *J. curcas* possa ser estimulado.

Estocagem de sementes em *Jatropha curcas*

A estocagem das sementes constitui grande problema para a agricultura (TEKRONY, 2006). O processo é responsável por graves perdas em todo o mundo, especialmente nos trópicos, onde altas temperaturas e umidade relativa prevalecem durante a maturação e armazenamento de sementes (BILIA et al., 1994). Embora a deterioração seja irreversível e inevitável, a velocidade do processo pode ser controlada com técnicas adequadas de colheita, secagem e armazenamento das sementes (MONCALEANO-ESCANDON et al., 2013), sendo uma das técnicas mais usadas a redução do conteúdo de água das sementes durante a estocagem (RAO; SINGH; RAI, 2006; HAY et al., 2012; HAY; PROBERT, 2013).

Quando as sementes se deterioram perdem vigor e tornam-se mais sensíveis aos estresses na germinação, muitas vezes perdendo completamente a capacidade de germinar (KHALILIAQDAM et al., 2013). MONCALEANO-ESCANDON et al. (2013) mostraram que as sementes de *J. curcas* podem perder sua viabilidade quando estocadas por períodos superiores a três meses, fatores promovidos pela rápida metabolização dos compostos amiláceos, açúcares e proteínas. Diversos autores (WORANG et al., 2008; AKOWUAH; ADDO; KEMAUSUOR, 2012) tem descrito que sementes contendo entre 6% e 8% de umidade apresentaram rápida redução no teor de óleo das sementes, aliada a um aumento na concentração de ácidos graxos livres, o qual é um parâmetro importante na produção de biodiesel

Um fator importante na produção de biocombustíveis é compreender e saber controlar o processo de estocagem e transporte de sementes até a extração de óleo ou estabelecimento das sementes no campo (AKOWUAH; ADDO; KEMAUSUOR, 2012).

Salinidade e a germinação de sementes

A escassez de água imposta por estresses abióticos tais como à seca e à salinidade nas culturas, estão entre os principais fatores que limitam a capacidade produtiva dos cultivos em todo o mundo (HARTEMINK, 2006; ALAM, 2014). Mais de 900 milhões de hectares de terras, aproximadamente 20% das terras cultiváveis do mundo, encontram-se afetadas por fatores

osmóticos ou hídricos que podem culminar com a redução de até 50% do rendimento das culturas (OSMOND et al., 1987; GAO et al., 2008). Em geral, a salinidade não acomete de maneira isolada, mas costuma estar acompanhada de estresse hídrico, estresse luminoso e altas temperaturas (POMPELLI; FERNANDES; GUERRA, 2006; MEIADO et al., 2010; MIRANDA et al., 2013).

É sabido que o estresse osmótico, geralmente atrelado ao estresse hídrico, é fortemente inibitório do crescimento e desenvolvimento das culturas (PARIHAR et al., 2015). A adaptabilidade das plantas à salinidade não depende unicamente da espécie (KATERJI et al., 2003). Sem dúvida, a germinação das sementes e o desenvolvimento inicial das plântulas, são as fases mais susceptíveis às variações no ambiente, de forma que, diferentes condições ambientais podem afetar estas fases e suas adaptações a estas condições serão diferentes. É nessa fase que se determina o início da vida, que culmina com o estabelecimento das plântulas e seu crescimento. A germinação de sementes é fortemente afetada pela salinidade dos solos, em especial devido aos efeitos osmóticos que o sal promove nas células, ou mesmo pela toxicidade que ele pode impor aos cultivos (SONG et al., 2005; ZHANG et al., 2010; MIRANDA et al., 2013). Em geral, a salinidade reduz a germinação pela limitação de absorção de água das sementes (HEGARTY, 1977; ZENG; WANG; ZHANG, 2010) afetando também a mobilização das reservas (BOUAZIZ; HICKS, 1990) pela toxicidade ao sal (MIRANDA et al., 2014); ambas podem afetar a estrutura de síntese de proteínas durante o processo germinativo. Sabendo que no processo de germinação, as plântulas não apresentam nenhum sistema de extrusão de íons como Na^+ ou Cl^- (TESTER, 2003), o efeito desses sais sobre as raízes pode diminuir a disponibilidade interna de nutrientes, uma vez que o íon Na^+ (sal tóxico) compete com o íon K^+ (elemento essencial) pelo mesmo transportador nas raízes (GÜNSTER, 1994; KEIFFER; UNGAR, 1995). Por esse motivo, o estudo do estresse causado pela salinidade durante a germinação das sementes não somente tem um papel ecofisiológico importante, mas também um significado prático para melhorar a produtividade das culturas nessas condições.

Mesmo que *J. curcas* possa ser propagada por meio de estacas (ELHAG; GAFAR, 2014), é através das suas sementes que a maioria dos cultivos comerciais tem sido implantados. Em condições *in vitro*, a germinação das sementes costuma iniciar três dias após a semeadura (MARTINS; MACHADO; CAVASINI, 2008; POMPELLI et al., 2010a); caracterizado pela protrusão da radícula, que rompe o tegumento na região próxima ao hilo. A remoção completa do tegumento mais externo da semente costuma ocorrer no oitavo dia, tornando visível o endosperma, que envolve totalmente os cotilédones (BRASILEIRO et al., 2012). No entanto, a germinação de *J. curcas* pode ser sensivelmente retardada em solos salinos. É digno de nota que são praticamente inexistentes estudos de germinação de sementes de *J. curcas* quando

submetidas à salinidade em diferentes genótipos. É provável que as características que popularizaram o pinhão-manso como uma cultura tolerante a condições de estresse não devem estar necessariamente presentes em todos os acessos de pinhão-manso, além de que não se conhece quão tolerante são os acessos normalmente utilizados a condições de estresse por salinidade.

Análise de variáveis de germinação

A tecnologia e fisiologia de sementes têm fornecido ferramentas valiosas para a produção de sementes de alta qualidade, bem como tratamentos e condições de armazenamento (MARCOS-FILHO, 1998). Na investigação fundamental, as sementes são estudadas de forma exaustiva, e a abordagem de sua biologia é realizada para explorar plenamente a dormência e a germinação (PENFIELD; KING, 2009). Um importante instrumento para indicar o desempenho de um lote de sementes é a quantificação da germinação através da análise cumulativa dos dados de germinação (JOOSEN et al., 2010). Os cálculos de germinação apresentam alta diversidade de expressões matemáticas, bem como frequentemente difícil execução prática. Embora utilizando-se de ferramentas simples, como as planilhas de cálculo, do tipo Microsoft® Excel, tais cálculos são, muitas vezes difíceis de serem implementados, devido as suas equações nada triviais (FERREIRA MARQUES et al., 2015). Diversas planilhas desse tipo têm sido descritas na literatura (RANAL et al., 2009; JOOSEN et al., 2010; MIRANDA et al., 2014), e uma das maiores limitações de se trabalhar com esse tipo de planilha é que elas não permitem trabalhar com diferentes fatores/tratamentos dentro de um experimento na mesma matriz de dados, o que torna o trabalho do pesquisador um tanto quanto tedioso (FERREIRA MARQUES et al., 2015), principalmente quando se trata de grandes experimentos, envolvendo diferentes tratamentos ou condições de cultivo. Parte dessa complexidade foi solucionada com o desenvolvimento do software GerminaQuant 1.0 (FERREIRA MARQUES et al. 2015), um software para análise de germinação que incorpora algumas equações matemáticas utilizadas para mensurar a germinação de sementes. O software fornece ao usuário uma interface amigável e de fácil execução; entretanto, quando há uma maior complexidade ou quantidade de dados a analisar, ou mesmo quando a análise requer uma avaliação temporal da germinação ou a apresentação gráfica dos resultados, o GerminaQuant 1.0 mostra-se bastante limitado. Partindo-se desse pressuposto, o desenvolvimento de uma ferramenta, que seja ao mesmo tempo funcional e amigável, além de permitir acesso gratuito ao software, seria amplamente desejável para os pesquisadores da área de tecnologia de sementes.

Software estatístico R

No ano de 1992, os pesquisadores Ross Ihaka e Robert Gentleman, ambos da Universidade de Auckland, na Nova Zelândia, desenvolveram um software para análises estatísticas e lhes atribuíram o nome R software, o qual foi baseado na linguagem de programação S inicialmente desenvolvido nos AT&T Bell Laboratories em meados dos anos 1970 (CALENGE, 2006). Quando Ihaka e Gentleman lançaram o software R, atribuíram a este a funcionalidade de ser de código aberto (IHAKA; GENTLEMAN, 1996), lançando, então a plataforma "*Comprehensive R Archive Network (CRAN)*" que é o núcleo onde se hospeda a maioria dos pacotes do software R. O CRAN é uma comunidade cada vez mais crescente e o principal repositório de materiais relacionados ao R (HORNIK; LEISCH, 2002).

Desde sua criação, o R passou a ser uma linguagem de programação e de ambiente para análises estatísticas computacionais e geração de gráficos. O software R fornece ampla variedade de análises estatísticas, tais como modelagem linear e não linear, testes estatísticos clássicos, análise de séries temporais, classificação, cluster e técnicas gráficas; todas de alta reprodutibilidade. O R foi projetado dentro de uma linguagem de programação legítima, que permite aos usuários adicionar funções dentro das suas necessidades. As funcionalidades do R podem ser estendidas via pacotes para desenvolver determinadas funções. Atualmente existem cerca de oito pacotes básicos fornecidos com a distribuição de R e outros tantos estão disponíveis através do CRAN, com servidores na internet que cobrem uma gama muito ampla de ferramentas estatísticas modernas (R CORE TEAM, 2016).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHTEN, W. M. J.; VERCHOT, L.; FRANKEN, Y. J.; MATHIJS, E.; SINGH, V. P.; AERTS, R.; MUYS, B. *Jatropha* bio-diesel production and use. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 12, p. 1063–1084, 2008.
- AKOWUAH, J.; ADDO, A.; KEMAUSUOR, F. Influence of storage duration of *Jatropha curcas* seed on oil yield and free fatty acid content. **ARNP Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 7, n. 1, p. 41–45, 2012.
- ALAM, A. Editorial Publication Soil Degradation : A Challenge to Sustainable Agriculture. **International Journal of Scientific Research in Agricultural Sciences**, v. 1, n. 4, p. 50–55, 2014.
- ARRUDA, F. P. DE; BELTRÃO, N. E. D. M.; ANDRADE, A. P. DE; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. CULTIVO DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curca* L.) COMO ALTERNATIVA PARA O SEMI-ÁRIDO NORDESTINO. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 8, n. 1, 2004.
- BILIA, D. A. C.; FANCELLI, A. L.; FILHO, J. M.; MARCOS FILHO, J.; MACHADO, J. A. Comportamento de sementes de milho híbrido durante o armazenamento sob condições variáveis de temperatura e umidade relativa do ar. **Scientia Agricola**, v. 51, n. 1, p. 153–157, 1994.
- BOUAZIZ, A.; HICKS, D. R. Consumption of wheat seed reserves during germination and early growth as affected by soil water potential. **Plant and soil**, v. 128, n. 2, p. 161–165, 1990.
- BRASILEIRO, B. G.; FERNANDES DOS SANTOS DIAS, D. C.; BHERING, Ma. C.; DOS SANTOS DIAS, L. A. Floral biology and characterization of seed germination in physic nut (*Jatropha curcas* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 4, p. 556–562, 2012.
- BRITTAINE, R.; LUTALADIO, N. **Jatropha : a smallholder bioenergy crop the potential for pro-poor development jatropha : a smallholder**. Rome. Italy: FAO, 2010. v. 8
- CALENGE, C. The package “adehabitat” for the R software: A tool for the analysis of space and habitat use by animals. **Ecological Modelling**, v. 197, n. 3–4, p. 516–519, 2006.
- CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R.; PRAÇA, M. M.; ARAÚJO, F. S.; CARELS, N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. **Plant Science**, v. 174, n. 6, p. 613–617, 2008.
- CORTE-REAL, N.; ENDRES, L.; SANTOS, K.; FIGUEIRÊDO, RCB ARRUDA, E.;

- ULISSES, C.; POMPELLI, M. Morphoanatomy and ontogeny of the fruit and seeds of *Jatropha curcas* L.: A promising biofuel plant. In: **The Promising Future of *Jatropha curcas***. Maira R. S ed. Hauppauge, NY: Nova Science, 2016.
- DIVAKARA, B. N.; UPADHYAYA, H. D.; WANI, S. P.; GOWDA, C. L. L. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A review. **Applied Energy**, v. 87, n. 3, p. 732–742, 2010.
- ELHAG, A. Z.; GAFAR, M. O. Effect of Sodium Chloride on Growth of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) Young Transplants. **Universal Journal of Plant Science**, v. 2, n. 1, p. 19–22, 2014.
- FAIRLESS, D. Biofuel: the little shrub that could-maybe. **Nature**, v. 449, n. 7163, p. 652–655, 2007.
- FERREIRA MARQUES, F. R.; VINICIUS MEIADO, M.; CORTE REAL DE CASTRO, N. M.; LINS DE OLIVEIRA CAMPOS, M.; REGO MENDES, K.; DE OLIVEIRA DOS SANTOS, O.; POMPELLI, M. F. GerminaQuant : a new tool for germination measurements. **Journal of Seed Science**, p. 1–8, 2015.
- FRANCIS, G.; EDINGER, R.; BECKER, K.; FRANCIS G., EDINGER R., B. K. A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: Need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. **Natural Resources Forum**, v. 29, n. 1, p. 12–24, 2005.
- GAO, S.; OUYANG, C.; WANG, S.; XU, Y.; TANG, L.; CHEN, F. Effects of salt stress on growth, antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedlings. **Plant Soil Environ**, v. 54, n. 9, p. 374–381, 2008.
- GÜBITZ, G. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Bioresource Technology**, v. 67, n. 1, p. 73–82, 1999.
- GÜNSTER, A. Seed bank dynamics — longevity, viability and predation of seeds of serotinous plants in the central Namib Desert. **Journal of Arid Environments**, v. 28, n. 3, p. 195–205, 1994.
- HARTEMINK, A. E. Assessing soil fertility decline in the tropics using soil chemical data. **Advances in Agronomy**, Advances in Agronomy. v. 89, p. 179–225, 2006.
- HAY, F. R.; PROBERT, R. J. Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. **Conservation Physiology**, v. 1, n. 1, p. 1–11, 2013.
- HAY, F. R.; THAVONG, P.; TARIDNO, P.; TIMPLE, S. Evaluation of zeolite seed “Drying Beads®” for drying rice seeds to low moisture content prior to long-term storage. **Seed Science**

and Technology, v. 40, n. 3, p. 374–395, 2012.

HEGARTY, T. W. Seed and Seedling Susceptibility to Phased Moisture Stress in Soil. **Journal of Experimental Botany**, v. 28, n. 3, p. 659–668, 1977.

HELLER, J. **Physic nut, *Jatropha curcas* l. promoting the conservation and the use of underutilized and neglected crops**. Roma: Bioersivity international, 1996.

HORNIK, K.; LEISCH, F. **Vienna and r: love, marriage and the future**. [s.l.] Citeseer, 2002.

IHAKA, R.; GENTLEMAN, R. R: A Language for Data Analysis and Graphics. **Journal of Computational and Graphical Statistics**, v. 5, n. 3, p. 299–314, 1996.

JANSEN, R. A. Airline Test Results with Biofuels. In: **Second Generation Biofuels and Biomass**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. p. 197–206.

JONGSCHAAP, R. E. E.; CORRÉ, W. J.; BINDRABAN, P. S.; BRANDENBURG, W. A. **Claims and facts on *Jatropha curcas* L.: global *Jatropha curcas* evaluation. breeding and propagation programme, 2007. .**

JOOSEN, R. V. L.; KODDE, J.; WILLEMS, L. A. J.; LIGTERINK, W.; VAN DER PLAS, L. H. W.; HILHORST, H. W. M. germinator : a software package for high-throughput scoring and curve fitting of Arabidopsis seed germination. **The Plant Journal**, v. 62, n. 1, p. 148–159, 2010.

KATERJI, N.; VAN HOORN, J. .; HAMDY, A.; MASTRORILLI, M. Salinity effect on crop development and yield, analysis of salt tolerance according to several classification methods. **Agricultural Water Management**, v. 62, n. 1, p. 37–66, 2003.

KEIFFER, C. W.; UNGAR, I. A. Germination responses of halophyte seeds exposed to prolonged hypersaline conditions. **Biology of salt tolerant plants**, p. 43–50, 1995.

KHALILIAQDAM, N.; SOLTANI, A.; LATIFI, N.; GHADERI FAR, F. Soybean Seed Aging and Environmental Factors on Seedling Growth. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 44, n. 12, p. 1786–1799, 2013.

KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. **Industrial Crops and Products**, v. 28, n. 1, p. 1–10, 2008.

MARCOS-FILHO, J. New approaches to seed vigor testing. **Scientia Agricola**, v. 55, n. spe, p. 27–33, 1998.

MARTINS, C. C.; MACHADO, C. G.; CAVASINI, R. Temperatura e substrato para o teste de germinação de sementes de pinhão-manso. **Ciência e agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 863–868, 2008.

- MEIADO, M. V.; DE ALBUQUERQUE, L. S. C.; ROCHA, E. A.; ROJAS-ARÉCHIGA, M.; LEAL, I. R. Seed germination responses of *Cereus jamacaru* DC. ssp. *jamacaru* (Cactaceae) to environmental factors. **Plant Species Biology**, v. 25, n. 2, p. 120–128, 2010.
- MIRANDA, R. D. Q.; CORREIA, R. M.; DE ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; POMPELLI, M. F.; DE QUEIROGA MIRANDA, R.; MOURA CORREIA, R.; DE ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; POMPELLI, M. F. Germination of *Prosopis juliflora* (Sw.) D.C. seeds at different osmotic potentials and temperatures. **Plant Species Biology**, v. 29, n. 3, p. E9–E20, 2013.
- MONCALEANO-ESCONDON, J.; SILVA, B. C. F.; SILVA, S. R. S.; GRANJA, J. A. A.; ALVES, M. C. J. L.; POMPELLI, M. F. Germination responses of *Jatropha curcas* L. seeds to storage and aging. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 684–690, 2013.
- OM TAPANES, N. C.; GOMES ARANDA, D. a.; DE MESQUITA CARNEIRO, J. W.; CEVA ANTUNES, O. a. Transesterification of *Jatropha curcas* oil glycerides: Theoretical and experimental studies of biodiesel reaction. **Fuel**, v. 87, n. 10–11, p. 2286–2295, 2008.
- OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, n. 1, p. 1–15, 2000.
- OSMOND, C. B.; AUSTIN, M. P.; BERRY, J. a.; BILLINGS, W. D.; BOYER, J. S.; DACEY, J. W. H.; NOBEL, P. S.; SMITH, S. D.; WINNER, W. E. Stress Physiology and the Distribution of Plants. **BioScience**, v. 37, n. 1, p. 38–48, 1987.
- PANDEY, V. C.; SINGH, K.; SINGH, J. S.; KUMAR, A.; SINGH, B.; SINGH, R. P. *Jatropha curcas*: A potential biofuel plant for sustainable environmental development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 2870–2883, 2012.
- PARIHAR, P.; SINGH, S.; SINGH, R.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 6, p. 4056–4075, 2015.
- PENFIELD, S.; KING, J. Towards a systems biology approach to understanding seed dormancy and germination. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 276, n. 1673, p. 3561–9, 2009.
- POMPELLI, M. F.; BARATA-LUÍS, R.; VITORINO, H. S.; GONÇALVES, E. R.; ROLIM, E. V.; SANTOS, M. G.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; FERREIRA, V. M.; LEMOS, E. E.; ENDRES, L. Photosynthesis, photoprotection and antioxidant activity of purging nut under drought deficit and recovery. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 8, p. 1207–1215, 2010a.
- POMPELLI, M. F.; FERNANDES, D.; GUERRA, M. P. Germination of *Dyckia encholirioides*

(Gaudichaud) Mez var. encholirioides under saline conditions. **Seed Science and Technology**, v. 34, n. 3, p. 759–763, 2006.

POMPELLI, M. F.; FERREIRA, D. T. da R. G.; CAVALCANTE, P. G. da S.; SALVADOR, T. de L.; SHIUE DE HSIE, B.; ENDRES, L. Environmental influence on the physico-chemical and physiological properties of *Jatropha curcas* seeds. **Australian Journal of Botany**, v. 58, n. 6, p. 421, 2010b.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing** Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, , 2016. .

RAJU, a. J. S.; EZRADANAM, V. Pollination ecology and fruiting behaviour in a monoecious species, *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Current Science**, v. 83, n. 11, p. 1395–1398, 2002.

RAO, R. G. S.; SINGH, P. M.; RAI, M. Storability of onion seeds and effects of packaging and storage conditions on viability and vigour. **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 1, p. 1–6, 2006.

SONG, J.; FENG, G.; TIAN, C.; ZHANG, F. Strategies for adaptation of Suaeda physophora, Haloxylon ammodendron and Haloxylon persicum to a saline environment during seed-germination stage. **Annals of botany**, v. 96, n. 3, p. 399–405, 2005.

SUJATHA, M.; REDDY, T. P.; MAHASI, M. J. Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. **Biotechnology advances**, v. 26, n. 5, p. 424–35, 2008.

TEKRONY, D. M. Seeds. **Crop Science**, v. 46, n. 5, p. 2263, 2006.

TESTER, M. Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants. **Annals of Botany**, v. 91, n. 5, p. 503–527, 2003.

TEWARI, D. **Jatropha and biodiesel**. 1. ed. New Delhi: New Delhi: Ocean Books Ltd, 2007.

WORANG, R. L.; DHARMAPUTRA, O. S.; SYARIEF, R.; MIFTAHUDDIN. The quality of physic nut (*Jatropha curcas* L.) seeds packed in plastic material during storage. **BIOTROPIA - The Southeast Asian Journal of Tropical Biology**, v. 15, n. 1, p. 25–36, 2008.

ZENG, Y. J.; WANG, Y. R.; ZHANG, J. M. Is reduced seed germination due to water limitation a special survival strategy used by xerophytes in arid dunes? **Journal of Arid Environments**, v. 74, n. 4, p. 508–511, 2010.

ZHANG, H.; IRVING, L. J.; MCGILL, C.; MATTHEW, C.; ZHOU, D.; KEMP, P. The effects of salinity and osmotic stress on barley germination rate: sodium as an osmotic regulator. **Annals of Botany**, v. 106, n. 6, p. 1027–1035, 2010.

MANUSCRITO I

Manuscrito a ser submetido à revista PLOS ONE.

1 **GerminaR – Pacote para Análise da Germinação e sua Aplicação Interativa**

2 **“GerminaQuant for R”**

3 Flavio Lozano-Isla¹, Omar Benites-Alfaro², Marcelo F. Pompelli^{1*}

4 1 Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento
5 de Botânica, Recife, PE, Brasil

6 2 Departamento de Pesquisa Computacional para Melhoramento de Plantas, Internacional
7 Potato Center, Lima, Peru

8 * Autor para correspondência, e-mail: marcelo.pompelli@ufpe.br (Pompelli, MF)

10 **Resumo**

11 O processo de germinação é um dos estágios mais sensíveis no desenvolvimento inicial das
12 plantas. Através dele, é possível inferir sobre o comportamento e as respostas das plantas em
13 estudos agrônômicos, biológicos e ecofisiológicos. Entretanto, o cálculo das variáveis de
14 germinação, especialmente quando demanda a manipulação de grande quantidade de dados, é
15 carente de uma ferramenta capaz de auxiliar os pesquisadores de forma mais avançada e
16 automatizada. Neste sentido, surge o pacote GerminaR para o software estatístico R, o qual
17 conta com quatro funções principais, (i) cálculo de onze parâmetros de germinação;
18 (ii) avaliação temporal da germinação; (iii) expressão gráfica dos resultados e
19 (iv) aplicação interativa “GerminaQuant for R”. Uma das grandes vantagens deste pacote é que
20 ele possui aplicação interativa, desenvolvida com interface amigável e intuitiva que pode ser
21 acessada mesmo por pessoas que não tenham conhecimentos prévios de programação. O
22 aplicativo GerminaQuant for R pode ser executado via R software com a instalação do pacote
23 GerminaR ou diretamente pela internet, sem necessidade do uso do software. Esse diferencial
24 permite ao usuário maior flexibilidade na utilização, podendo funcionar em qualquer dispositivo
25 móvel atual (*e.g.*, notebook, tablet, smartphone). Estas ferramentas devem contribuir fortemente

26 para aperfeiçoar a análise de dados referentes a variáveis de germinação, bem como melhorar a
27 qualidade dos dados gerados.

28

29 **Palavras-chave:** índice de germinação, programação, reprodutibilidade, GitHub, R

30

31 **Abstract**

32 The germination process is one of the most sensitive stages in the early development of plants.
33 Through it, it is possible to infer about the behavior and the responses of the plants in agronomic,
34 biological and ecophysiological studies. However, the calculation of the germination variables,
35 especially when it demands the manipulation of a large amount of data, is lacking of a tool
36 capable of assisting the researchers in a more advanced and automated way. In this sense, the
37 GerminaR package for statistical software R is presented, which has four main functions: (i)
38 calculation of eleven germination parameters; (ii) temporal evaluation of germination; (iii)
39 graphical expression of results and (iv) interactive application "GerminaQuant for R". One of
40 the great advantages of the package is that it has an interactive application, developed with a
41 friendly and intuitive interface that can be accessed even by people who do not have previous
42 programming knowledge. The GerminaQuant for R application can be run via R software with
43 the GerminaR package installation or directly over the internet, without the use of the R
44 software. This differential allows the user greater flexibility in use, and can work on any current
45 mobile device (e.g., notebook, tablet, smartphone). These tools should contribute greatly to
46 improve the analysis of data concerning germination variables as well as to improve the quality
47 of the data generated.

48 **Key words:** germination index, programming, reproducibility, GitHub, R package

49

50

51 **Introdução**

52 A semente é a via preferencial de propagação vegetal. Além disso, a sociedade depende muito
53 das sementes e dos grãos, tanto para a alimentação humana e animal, como para o
54 estabelecimento de novas culturas [1]. A uniformização e a completa germinação das sementes,
55 é um dos requisitos básicos para o estabelecimento de novas culturas [2]. A fisiologia e
56 tecnologia das sementes têm fornecido ferramentas valiosas para a produção de sementes de
57 alta qualidade, bem como tratamentos e condições de armazenamento [3]. As sementes são
58 estudadas de forma exaustiva e a abordagem biológica é realizada para explorar plenamente
59 fenômenos como a dormência e o processo germinativo [4]. Mesmo que a percentagem de
60 germinação seja a forma mais utilizada para avaliação da germinação, ela frequentemente gera
61 dados de forma limitada, principalmente quando se objetiva a avaliação da germinação num
62 determinado espaço de tempo [5]. A falta de informações sobre o início da germinação, taxa e
63 uniformidade de germinação, são parâmetros essenciais para a compreensão do status
64 fisiológico de um lote de sementes, tais como: dormência, tolerância ao estresse e ao
65 envelhecimento das sementes.

66 É sabido que os cálculos de germinação apresentam alta diversidade de expressões matemáticas
67 [6] e, frequentemente, de difícil execução prática, mesmo fazendo uso de ferramentas, como as
68 planilhas de cálculo, do tipo Microsoft[®] Excel, tais cálculos são, muitas vezes difíceis de serem
69 implementados, devido as suas equações nada triviais [7]. Diversas planilhas desse tipo têm
70 sido descritas na literatura com o objetivo de auxiliar os pesquisadores nesta tarefa [1,6,8,9].
71 Independente da planilha utilizada, todas elas compartilham uma mesma limitação; não
72 permitem analisar diferentes matrizes de dados na mesma tela de trabalho. Tal problema torna
73 o trabalho do pesquisador um tanto quanto exaustivo [7], principalmente quando se trata de
74 grandes experimentos, envolvendo inúmeros tratamentos ou condições de cultivo.

75 Com o objetivo de auxiliar os pesquisadores que trabalham nas áreas que envolvem a avaliação
76 da germinação de sementes, foi desenvolvido o pacote GerminaR. Essa ferramenta inclui

77 aplicação interativa para a análise das variáveis de germinação de maneira fácil e eficaz. O
78 desenvolvimento do pacote GerminaR sob a metodologia de código aberto, permitirá a melhoria
79 contínua desta ferramenta, conjuntamente com a participação da comunidade científica e dos
80 usuários.

81

82 **Desenho e implementação**

83 *Funções principais*

84 As principais funções incluídas no pacote GerminaR são *i)* Cálculo de onze variáveis de
85 germinação, *ii)* análise gráfica dos resultados e *iii)* aplicação interativa para usuários leigos em
86 programação (Tabela 1).

87

88 **Tabela 1 Principais funções no pacote GerminaR, para análise gráfica das variáveis de** 89 **germinação de sementes**

Função	Descrição
ger_summary	Calcula onze índices de germinação mantendo os níveis dos fatores para análise de variância.
ger_intime	Calcula e mostra os dados da germinação cumulativa.
fplot	Função que permite a geração gráfica dos resultados.
GerminaQuant	Executa a aplicação interativa no modo <i>off-line</i> para ser usado em computador pessoal.
GerminaR	Base de dados com experimento sugestivo de germinação de sementes <i>Jatropha curcas</i> sob salinidade.

90

91

92

93

94 **Linguagem**

95 O GerminaR foi desenvolvido em linguagem R. Para organização dos dados, o GerminaR
96 depende de funções descritas nos pacotes “dplyr” [10] e “tidyr” [11], assim como de funções
97 oriundas dos pacotes “shiny” [12], “ggplot2” [13] e “agricolae” [14] para cálculos e interações
98 gráficas. Os cálculos dos índices de germinação foram escritos na linguagem nativa do R. O
99 código fonte é mantido em uma versão controle de github [15] e alojado em um repositório
100 online, onde a versão em desenvolvimento pode ser facilmente consultada e instalada. O
101 repositório inclui um rastreador de problemas, onde os usuários podem interagir com os
102 desenvolvedores, sugerindo modificações ou reportando erros. Este documento foi escrito na
103 versão 1.0 (SHA 68edee8). O código de demonstração usado neste documento, incluindo as
104 figuras e exemplos foram escritos em formato markdown [16], e pode ser lido pelos usuários
105 no repositório do pacote.

106

107 **Base de dados**

108 O pacote GerminaR possui uma base de dados de um experimento de germinação que pode ser
109 usado para a demonstração do funcionamento do pacote ou disponível na web para seu uso na
110 aplicação web interativa. A base de dados é composta por um experimento fatorial sugestivo,
111 montado de forma completamente casualizada com quatro repetições por tratamento em
112 condições de casa de vegetação. Neste experimento, o primeiro fator corresponde a seis
113 distintos genótipos de *J. curcas* e o segundo fator corresponde a três níveis de salinidade na
114 água de irrigação (0, 50 e 100 mM.L⁻¹) sendo o tratamento 0 mM o tratamento isento de NaCl.
115 A germinação foi avaliada diariamente por um período de 25 dias. O pacote permite avaliar
116 qualquer dado de germinação em condição experimental desde que alguns requisitos sejam
117 cumpridos: (i) a base de dados de germinação deve ser cumulativa no tempo, (ii) ter pelo menos
118 um fator ou um tratamento para ser avaliado, (iii) inserir o número de sementes de cada unidade

119 experimental e (iv) prefixo do tempo de avaliação da germinação para calcular a frequência de
120 coleta dos dados.

121

122 **Resultados e Discussões**

123

124 **Variáveis de germinação**

125 O pacote GerminaR foi implementado para o cálculo de onze variáveis de germinação (Tabela
126 2). Para descrever cada uma destas variáveis se faz necessário mostrar a simbologia das
127 equações, sendo: n_i , o número de sementes germinadas no i – ésimo tempo ; N , o número total
128 de sementes em cada unidade experimental; K , o último dia da avaliação do processo
129 germinativo; t_i , tempo do início do experimento até a i – ésima observação; f_i , frequência
130 relativa da germinação; G_i , número de sementes germinadas no i – ésimo tempo; x_i , número
131 de dias do início da semeadura. Com estes dados é possível calcular; a) germinação ou
132 germinabilidade (G) que é a porcentagem das sementes que concluem o processo germinativo
133 (protrusão da radícula e emergência do embrião) em condições experimentais [17]. É

134 representada por $G = \left(\frac{\sum_{i=1}^k n_k}{N} \right) 100$. A porcentagem de germinação não apresenta uma
135 distribuição normal, recomenda-se que os dados de G sejam transformados em Arco-seno da
136 germinação: $Asin\left(\sqrt{\frac{G}{100}}\right)$. b) o tempo médio de germinação (\bar{t}), proposto inicialmente por

137 Haberlandt em 1875, a qual denota o número de sementes germinadas nos intervalos de
138 avaliação da coleta dos dados com respeito no número de sementes germinadas no tempo de

139 avaliação e é calculada pela fórmula: $\bar{t} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$ [18]. c) O coeficiente da velocidade da

140 germinação (CVG) que pode ser calculado pela fórmula: $CVG = \left(\frac{\sum_{i=1}^k G_i}{\sum_{i=1}^k G_i x_i} \right) 100$. d) A

141 velocidade média da germinação (\bar{v}) é expressa como a recíproca do tempo médio da

142 germinação: $\bar{v} = \frac{1}{\bar{t}}$. e) A incerteza da germinação (\bar{U}), que é uma adaptação do índice de

143 Shannon que avalia o grau de incerteza na predição da entropia informacional ou a incerteza
 144 associada com a distribuição relativa da frequência da germinação [17]. Quando os valores de
 145 incerteza são baixos, a frequência na germinação deve estar ocorrendo em tempo mais curto;
 146 uma vez que este índice avalia o grau de dispersão da germinação através da fórmula
 147 $-\sum_{i=1}^k f_i \log_2 f_i$, onde, $f_i = \frac{n_i}{\sum_{i=1}^k n_i} \cdot f$. A sincronia da germinação (Z) foi proposta inicialmente
 148 para avaliar o grau de sobreposição da floração dos indivíduos de uma população. Tendo em
 149 conta essa ideia, Primack [19] descreveu Z como um fator que determina como se dá a
 150 sobreposição de uma semente sobre outra semente inclusa no mesmo tempo (grau de
 151 superposição entre a germinação de sementes). Quando a sincronia é igual a 1, a germinação
 152 das sementes acontece no mesmo tempo, ao passo que sincronia próxima de 0 denota que pelo
 153 menos duas sementes completaram o processo de germinação em tempos distintos: $Z = \frac{\sum C_{n1,2}}{N}$,
 154 onde $C_{n1,2} = \frac{n_i(n_i-1)}{2}$ e $N = \frac{\sum n_i(n_i-1)}{2}$. g) o índice da variância da germinação (s_t^2) é expressado
 155 por $s_t^2 = \frac{\sum_{i=1}^k n_i(t_i-\bar{t})^2}{\sum_{i=1}^k n_i-1}$, h) o desvio padrão da germinação (s_t) é expressado pela raiz quadrada
 156 da variância da germinação e o i) coeficiente da variação na germinação (CV_t) é expressado
 157 $CV_t = \left(\frac{s_t}{\bar{t}}\right) 100$.

158

159

160

161

162

163

164 **Tabela 2.** Principais variáveis de germinação no pacote GerminaR e seus limites de avaliação.
 165 Sendo: n_i , o número sementes germinadas no $i^{n-esimo}$ tempo ; K , o último dia da avaliação do
 166 processo germinativo

Variável	Limites	Grandeza
Número de sementes germinadas	$0 \leq n \leq n$	<i>contagem</i>
Germinabilidade	$0 \leq g \leq 100$	%
Arco-seno da germinação	$0 \leq \arcsin \leq 1$	<i>grau</i>
Tempo médio da germinação	$0 < \bar{t} \leq k$	<i>tempo</i>
Coefficiente de velocidade da germinação	$0 < CVG \leq 100$	%
Velocidade da germinação	$0 < \bar{v} \leq 1$	<i>tempo</i> ⁻¹
Sincronia da germinação	$0 \leq Z \leq 1$	–
Incerteza da germinação	$0 \leq U \leq \log_2 n_i$	<i>bit</i>
Desvio padrao da germinação	$0 < s_t \leq \infty$	<i>tempo</i>
Variância da germinação	$0 < s_t^2 \leq \infty$	<i>tempo</i> ²
Coefficiente de variação da germinação	$0 < CV_t \leq \infty$	%

167

168 **Análise da germinação pontual**

169 A avaliação da germinação pode seguir uma rotina nas análises, pelo qual as funções são
 170 explicadas de acordo com a base de dados inclusa no pacote GerminaR. O pacote deve ser
 171 ativado e os dados serem carregados no ambiente de trabalho. No caso de usar outra base de
 172 dados, o usuário pode carregar sua própria base de dados e prosseguir de acordo com o script
 173 abaixo:

174

175

176

177

```

178 # Ativar o pacote
179 library(GerminaR)
180
181 # Carregar base de dados
182 exp <- GerminaR
183
184 Para calcular as onze variáveis de germinação e realizar a análise da variância dos dados e os
185 testes de comparação de média, o usuário deve seguir o código abaixo.
186 # Análise dos dados
187 dtg <- ger_summary(SeedN = "NSeeds", evalName = "Ev", data = exp)
188
189 # Análise de variância para a variável porcentagem de germinação
190 av <- aov(GRP ~ Genotype*Salt, data = dtg)
191 summary(av)
192
193 # Comparação de médias com student Student-Newman-Keuls
194 cm <- agricolae::SNK.test(y = av, trt = c("Genotype", "Salt"))
195 rd <- dtsm(cm)
196 rd
197
198 # Gráfico de barras
199 gb <- fplot(data = rd, type = "bar",
200           x = Genotype,
201           xlab = "acessos",
202           y = mean,
203           ylab = "germinação (%)",

```

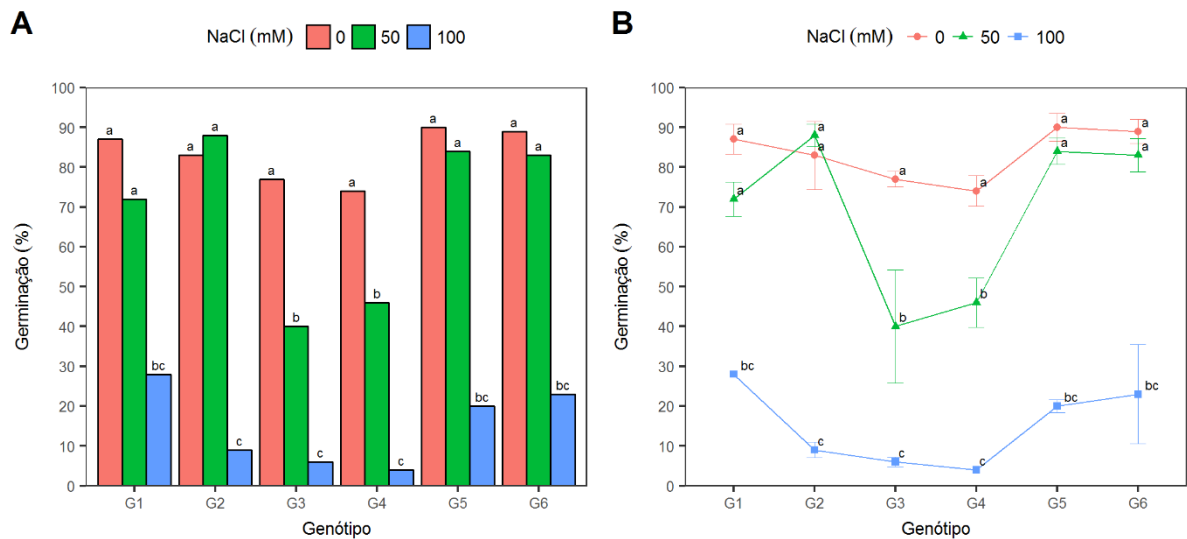
```
204     z = Salt,  
205     lgl = "NaCl (mM)",  
206     lgd = "top",  
207     lmt = c(0,100), brk = 0:100*10,  
208     erb = F, sig = sg)  
209     gb
```

210

```
211 # Gráfico de linhas
```

```
212 gl <- fplot(data = rd, type = "line",  
213     x = Genotype,  
214     xlab = "acessos",  
215     y = mean,  
216     ylab = "germinação (%)",  
217     z = Salt,  
218     lgl = "NaCl (mM)",  
219     lgd = "top",  
220     lmt = c(0,100), brk = 0:100*10,  
221     erb = T, sig = sg)  
222     gl
```

223 Com estes códigos, o usuário pode gerar os gráficos, expressando seus resultados, que podem
224 ser tanto de barras como em linhas (Figura 1), tendo a possibilidade de adicionar o erro padrão
225 e a significância do teste de média.



226

227 **Figura 1** Germinação de sementes *Jatropha curcas* L., gerados com o pacote GerminaR no
 228 software estatístico R para análise da germinação pontual. G1 a G6 significa os seis acessos
 229 usados como molde para este experimento sugestivo.

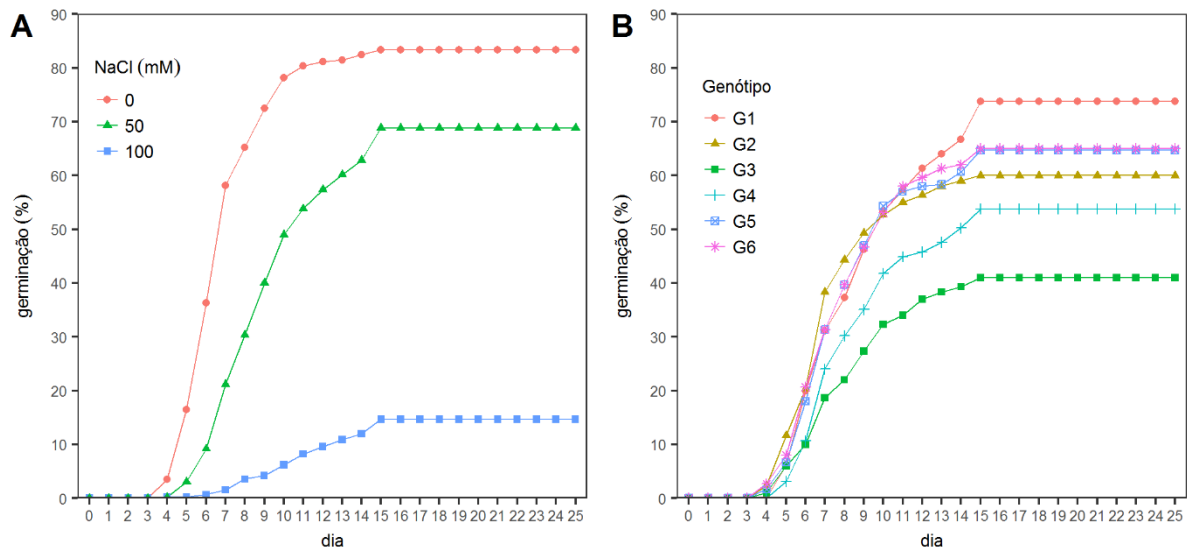
230

231 **Análise cumulativa da germinação**

232 A análise cumulativa da germinação permite observar a evolução do processo germinativo
 233 através da execução do estudo de germinação, podendo ser expressa

234 como a porcentagem de germinação ou com a germinação relativa que leva em consideração a
 235 germinação propriamente dita em relação ao número de sementes germinadas em cada dia
 236 (Figura 2).

237



238

239 **Figura 2** Germinação cumulativa no tempo de *Jatropha. Curcas* L., gerados com o pacote
 240 GerminaR no software estatístico R para análise da germinação pontual. G1 a G6 significa os
 241 seis acessos usados como molde para este experimento sugestivo.

242

243 Para executar esse tipo de análise o usuário deve observar o seguinte script:

244

245 # Germinação cumulativa em percentagem

246 gt <- ger_intime(Factor = "Salt", method = "percentage", SeedN = "NSeeds", evalName =

247 "Ev", data = exp)

248 gt

249

250 gts <- fplot(data = gt, type = "line",

251 x = evaluation,

252 y = mean,

253 ylab = "germinação (%)",

254 xlab = "dia",

255 z = Salt,

256 lgl = "NaCl (mM)",

```

257         lgd = c(0.12, 0.8),
258         lmt = c(0,90), brk = 0:90*10)
259 gts
260
261
262 # Germinação cumulativa relativa
263 gt <- ger_intime(Factor = "Genotype", method = "percentage", SeedN = "NSeeds", evalName
264 = "Ev", data = exp)
265
266 gtg <- fplot(data = gt, type = "line",
267             x = evaluation,
268             y = mean,
269             ylab = "germinação (%)",
270             xlab = "dia",
271             z = Genotype,
272             lgl = "Genotipos",
273             lgd = c(0.12, 0.68),
274             lmt = c(0,90), brk = 0:80*10)
275 gtg

```

277 **Aplicação interativa**

278 O pacote GerminaR inclui uma aplicação interativa para os usuários não familiarizados com o
279 software estatístico R. Esse aplicativo é denominado GerminaQuant for R e tem suas principais
280 funções descritas na Tabela 3. O aplicativo está alojado em um endereço *web* da internet, já que
281 a aplicação é executada em um servidor remoto, o que permite que o usuário acesse de qualquer
282 dispositivo móvel (*e.g.*, notebook, tablet, smartphone). O aplicativo pode ser executado em

283 qualquer plataforma (*e.g.*, iOS ou Android, Windows phone), uma vez que não necessita de
284 grande potência; basta que acesse a internet. O usuário dispõe de um manual, passo-a-passo
285 com informação de como desenvolver seu próprio experimento de germinação, coleta,
286 processamento e interpretação dos dados. O aplicativo conta com uma planilha modelo que
287 pode ser usada para a entrada dos dados. Nesta, pequenas modificações são reconhecidas pelo
288 aplicativo; entretanto, os principais campos devem ser respeitados. Os dados devem ser
289 carregados no aplicativo em formato de valores separado por vírgula (.csv) onde o usuário pode
290 analisar seus dados de forma fácil, rápida e intuitiva já que foi desenhado de acordo com o fluxo
291 de trabalho nas análises das variáveis de germinação (Tabela 3).

292

293 **Tabela 3** Descrição da aplicação interativa GerminaQuant, para avaliação das variáveis de
294 germinação.

Aba	Descrição
Introdução	Apresentação da aplicação e breve descrição das variáveis.
Importação de dados	Permite carregar os dados, visualizar a informação e escolher os parâmetros para a análise.
Análise da germinação	Mostra a tabela com as variáveis calculadas de germinação
Análise estatística	Permite escolher a análise de acordo com o desenho experimental para a análise de variância, e calcula automaticamente as diferenças das médias.
Gráficos das análises estatísticas	De acordo com as análises estatísticas, o aplicativo gera três tipos de gráficos: barras, linhas e diagrama de caixas.
Germinação no tempo	Gera os gráficos da germinação cumulativa no tempo de acordo com o fator selecionado.

295

296

297 **Conclusões**

298 É necessário uma ferramenta de código aberto para se calcular as variáveis de germinação
299 pontual e germinação cumulativa, já que a estrutura de código aberto, combinado com as
300 versões de controle promovem o desenvolvimento do código e da ferramenta ao longo do
301 tempo. Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro pacote de código aberto disponível que
302 pode auxiliar gratuitamente os usuários na tarefa de análise e elaboração de gráficos das
303 variáveis de germinação. O pacote GerminaR foi implementado em linguagem de utilização
304 mundial para a análise estatística. Além disso, o pacote inclui uma ferramenta chamada
305 “GerminaQuant for R” para análise interativa dos dados, que pode ser usada em qualquer tipo
306 de dispositivo móvel atual.

307

308 **Disponibilidade e requerimentos**

309 **Nome do projeto:** GerminaR

310 **Lançamento estável do projeto:** [cran.r-project.org/package = germinar](https://cran.r-project.org/package=germinar)

311 **Aplicação interativa:** <https://flavjack.shinyapps.io/germinaquant/>

312 **Manual da aplicação web:** <https://flavjack.github.io/GermBook/>

313 **Gestor de problemas do projeto:** <https://github.com/Flavjack/GerminaR/issues>

314 **Sistemas operativos:** Independente de plataforma

315 **Linguagem de programação:** R e html

316

317 **Agradecimentos**

318 Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
319 (Processo CNPq n. nº404357/2013-0) pelo apoio financeiro à execução do trabalho e a
320 Universidade Federal de Pernambuco por permitir que este aplicativo fosse registrado junto ao
321 INPI sob o registro BR 51 2016 001327 3. O primeiro autor agradece a Coordenação de
322 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

323 **Referências**

- 324 1. Joosen RVL, Kodde J, Willems LAJ, Ligterink W, van der Plas LHW, Hilhorst HWM.
325 germinator: a software package for high-throughput scoring and curve fitting of
326 Arabidopsis seed germination. *Plant J.* 2010;62: 148–159. doi:10.1111/j.1365-
327 313X.2009.04116.x
- 328 2. Demir I, Mavi K, Ozcobam M, Okcu G. Effect of salt stress on germination and seedling
329 growth in serially harvested aubergine (*Solanum melongena* L.) seeds during
330 development. *Isr J Plant Sci.* Taylor & Francis Group; 2003;51: 125–131.
331 doi:10.1560/EAD8-YE43-E5BE-WHHV
- 332 3. Marcos-Filho J. New approaches to seed vigor testing. *Sci Agric. Scientia Agricola*;
333 1998;55: 27–33. doi:10.1590/S0103-90161998000500005
- 334 4. Penfield S, King J. Towards a systems biology approach to understanding seed dormancy
335 and germination. *Proc Biol Sci.* 2009;276: 3561–9. doi:10.1098/rspb.2009.0592
- 336 5. McNair JN, Sunkara A, Frobish D, Andersen PK, Borgan Ø, Gill RD, et al. How to
337 analyse seed germination data using statistical time-to-event analysis: non-parametric
338 and semi-parametric methods. *Seed Sci Res.* Cambridge University Press; 2012;22: 77–
339 95. doi:10.1017/S0960258511000547
- 340 6. Ranal MA, Santana DG de. How and why to measure the germination process? *Rev Bras*
341 *Botânica.* Sociedade Botânica de São Paulo; 2006;29: 1–11. doi:10.1590/S0100-
342 84042006000100002
- 343 7. Ferreira Marques FR, Vinicius Meiado M, Corte Real de Castro NM, Lins de Oliveira
344 Campos M, Rego Mendes K, de Oliveira dos Santos O, et al. GerminaQuant : a new tool
345 for germination measurements. *J Seed Sci.* 2015; 1–8.
- 346 8. Ranal M a., Santana DG De, Ferreira WR, Mendes-Rodrigues C. Calculating
347 germination measurements and organizing spreadsheets. *Rev Bras Botânica.* 2009;32:
348 849–855. doi:10.1590/S0100-84042009000400022

- 349 9. Miranda RDQ, Correia RM, De Almeida-Cortez JS, Pompelli MF, De Queiroga Miranda
350 R, Moura Correia R, et al. Germination of *Prosopis juliflora* (Sw.) D.C. seeds at different
351 osmotic potentials and temperatures. *Plant Species Biology*. 12 Sep 2013: E9–E20.
352 doi:10.1111/1442-1984.12025
- 353 10. Wickham H, Francois R. dplyr: a grammar of data manipulation [Internet]. R package
354 version 0.4. 2015. Available:
355 http://user2014.stat.ucla.edu/abstracts/talks/45_Wickham.pdf
- 356 11. Wickham H. Easily Tidy Data with “spread()” and “gather()” Functions [R package tidy
357 version 0.6.0]. Comprehensive R Archive Network (CRAN).
- 358 12. Beeley C. Web Application Development with R using Shiny. Packt Publishing Ltd;
359 2016.
- 360 13. Wickham H. ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer; 2016.
- 361 14. De Mendiburu F. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. In: R
362 CRAN [Internet]. 2016. Available: <http://cran.r-project.org/package=agricolae>
- 363 15. Dabbish L, Stuart C, Tsay J, Herbsleb J. Social coding in GitHub. Proceedings of the
364 ACM 2012 conference on Computer Supported Cooperative Work - CSCW '12. New
365 York, New York, USA: ACM Press; 2012. p. 1277. doi:10.1145/2145204.2145396
- 366 16. Ovadia S. Markdown for Librarians and Academics. *Behav Soc Sci Librar*. Routledge;
367 2014;33: 120–124. doi:10.1080/01639269.2014.904696
- 368 17. Labouriau L, Valadares M. The germination of seeds. OEA, Washington, DC.
369 Washington; 1983; 174.
- 370 18. Czabator FJ. Germination value: an index combining speed and completeness of pine
371 seed germination. *For Sci*. Society of American Foresters; 1962;8: 386–396.
- 372 19. Primack RB. Patterns of Flowering Phenology in Communities, Populations, Individuals,
373 and Single Flowers. *The Population Structure of Vegetation*. Dordrecht: Springer
374 Netherlands; 1985. pp. 571–593. doi:10.1007/978-94-009-5500-4_24

MANUSCRITO II

Manuscrito a ser submetido à revista Biomass and Bioenergy.

1 **Estudo ecofisiológico da germinação e desenvolvimento inicial em *Jatropha curcas***
2 **durante a estocagem e estresse por salinidade.**

3
4 Flavio Lozano-Isla^a, Mariana L.O. Campos^a, Lauricio Endres^b, Agnaldo R. Chaves^c, Egidio B.
5 Neto^d, Marcelo F. Pompelli^{a,*}

6
7 ^a *Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento*
8 *de Botânica, Recife, PE, 50670901, Brasil*

9 ^b *Laboratório de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Alagoas, Centro de Agronomia,*
10 *Maceió, AL, Brasil*

11 ^c *Centro de Pesquisa de Agricultura Tropical Semiárida, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE,*
12 *Brasil*

13 ^d *Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química Agrícola, Recife,*
14 *PE, Brasil*

15
16 * marcelo.pompelli@ufpe.br (Pompelli, M.F.)

17
18 **Resumo**

19 *Jatropha curcas* é uma espécie apresenta forte resistência à seca, que pode ser utilizada na
20 produção de biocombustível. No entanto, o cultivo apresenta dois problemas importantes *i*)
21 perda rápida da viabilidade das sementes, resultante da alta taxa respiratória das sementes
22 durante o período de estocagem; *ii*) sensibilidade das sementes quando germinadas sob
23 condições de salinidade. Para alcançar estes objetivos, foram desenvolvidos dois experimentos.
24 No primeiro experimento verificamos como a estocagem das sementes em ambiente mais seco
25 pode influenciar a germinação, a taxa de respiração e os principais parâmetros bioquímicos e
26 fisiológicos. No segundo experimento, estudamos o efeito da adição de cinco diferentes
27 concentrações de NaCl (0, 50, 75, 100 e 150 mM.L⁻¹) sob os parâmetros de germinação e
28 crescimento inicial de cinco acessos de *J. curcas* originários de diferentes regiões produtoras
29 do Brasil. Os resultados do primeiro experimento mostram que o uso de agente dessecante
30 estabilizou a germinabilidade das sementes estocadas, fato corroborado pela redução do
31 potencial hídrico das sementes e pela forte redução das taxas respiratórias. Por outro lado,
32 mostramos que *Jatropha curcas* apresenta uma moderada tolerância a salinidade, sendo capaz
33 de germinar até 150 mM de NaCl, mesmo que se tenha observado drástica redução no acúmulo
34 de biomassa com o incremento da concentração de NaCl na água de irrigação. Os resultados
35 mostram que a germinação foi reduzida para valores próximos a 4% a 150 mM de NaCl,

36 enquanto o tempo médio de germinação incrementou-se com o aumento da concentração de
37 sais. Nas variáveis biométricas e de biomassa, tanto o peso seco da folha, área foliar,
38 comprimento da planta e biomassa total foram parâmetros fortemente afetados pelo incremento
39 dos sais, enquanto nos parâmetros de alocação de biomassa foi observado acúmulo de biomassa
40 no caule das plântulas. Neste sentido, os genótipos 114, 171 e 183 mostraram-se como
41 potencialmente tolerantes enquanto os genótipos 218 e 133 sensíveis.

42

43 **Palavras chaves:** tolerância à salinidade, germinação de sementes, biomassa, biocombustível,
44 NaCl

45

46 **Abstract**

47 *Jatropha curcas* L is a plant that can be used in the production of biofuel, whose species presents
48 strong resistance to drought. However, the crop presents two important problems: *i*) rapid loss
49 of viability, resulting from the high respiratory rate of the seeds during the storage period; *ii*)
50 seed sensitivity when germinated under salinity conditions. To achieve these objectives, two
51 experiments were developed. In the first experiment were verified how the storage of seeds in
52 a drier environment can influence germination, respiration rate and the main biochemical and
53 physiological parameters. In the second experiment, we studied the effect of the addition of five
54 different concentrations of NaCl (0, 50, 75, 100 and 150 mM) under the parameters of
55 germination and initial growth of five accessions of *J. curcas* originating from different
56 producing regions of Brazil. The results of the first experiment show that the use of desiccant,
57 can stabilized the germinability of the seeds stored, a fact corroborated by the reduction of the
58 water potential of the seeds and the strong reduction of the respiratory rates. On the other hand,
59 we showed that *Jatropha curcas* presents a moderate tolerance to salinity, being able to
60 germinate up to 150 mM NaCl, even though a drastic reduction in the biomass accumulation
61 was observed with the increase of the salt concentration in the irrigation water. The results show
62 that the germination was reduced to values close to 4% in the treatment of 150 mM, while the
63 average time of germination increased with the increase in the concentration of salts. In the
64 biometric and biomass variables, the dry weight of the leaf, leaf area, plant length and total
65 biomass were strongly affected by the increase of the salts, while in the biomass allocation
66 parameters, accumulation was observed in the stem of the seedlings. In this sense, genotypes
67 114, 171 and 183 were shown to be potentially tolerant while genotypes 218 and 133 were
68 sensitive.

69 **Keywords:** salinity tolerance, seed germination, biomass, biofuel, NaCl

70

71 **Introdução**

72 *Jatropha curcas* (pinhão-manso) é uma espécie pertencente à família Euphorbiaceae com
73 múltiplos usos, abundantemente distribuída em muitas regiões tropicais e subtropicais nas
74 Américas, África e Ásia [1,2]. Nos últimos 20 anos têm ganhado muita atenção como uma
75 cultura potencial para a produção de bioenergia, visto que o óleo das suas sementes pode ser
76 facilmente convertido em biodiesel de boa qualidade. Além do que, a espécie não se apresenta
77 como comestível e, portanto, não compete com as demais espécies oleaginosas [3]. Apresenta
78 rápido crescimento, fácil propagação, curto período da primeira coleta dos frutos, baixo custo
79 das sementes [2], alto conteúdo de óleo (40-58%) [4,5] e boa adaptação a distintas condições
80 agroclimáticas [1,6–9].

81 A germinação é o processo que determina quando e onde as sementes vão iniciar o seu
82 crescimento [10], permitindo ao embrião germinar e desenvolver-se como um organismo
83 fotossinteticamente ativo. Inicia-se com a embebição da semente quiescente e finaliza como o
84 alongamento do eixo embrionário, que pode ser visualizado pela emergência da radícula sob a
85 superfície do solo. Neste momento, as reservas contidas nas sementes começam a ser
86 mobilizadas rendendo energia ao embrião em desenvolvimento [11,12]. Neste sentido, a
87 salinidade pode afetar a germinação, limitando a absorção da água nas sementes (efeito
88 osmótico) [13,14] aumenta a toxicidade por íons ou pela combinação de ambos, podendo o
89 excesso do íon Na^+ afetar os processos bioquímicos nas plantas [15]. Além disso, pode afetar a
90 mobilização das reservas [16], a organização estrutural e a síntese de proteínas nos embriões
91 [17]. Em ambientes salinos, a adaptação das plantas durante a germinação e o desenvolvimento
92 inicial são estágios decisivos para o estabelecimento da espécie e tais fatores podem influenciar
93 negativamente neste processo [18].

94 A estocagem das sementes é um dos fatores que mais afeta negativamente a viabilidade das
95 sementes, que compreende o tempo transcorrido entre sua colheita e utilização [19,20]. *J.*
96 *curcas* não foge deste padrão, uma vez que apresenta elevado metabolismo, fazendo com que
97 suas sementes percam rapidamente sua viabilidade com a estocagem [21]. Marcos-Filho [19]
98 descreve que a estocagem das sementes constitui-se em um grande problema para a agricultura
99 [22], uma vez que é responsável por grandes perdas em todo o mundo, especialmente nos
100 trópicos, onde altas temperaturas e a elevada umidade relativa, prevalecem durante a maturação
101 e armazenamento de sementes [23]. Embora a deterioração seja irreversível e inevitável, a
102 velocidade do processo pode ser controlada com técnicas adequadas de colheita, secagem e
103 armazenamento [21]. Neste sentido, a utilização de ambientes com atmosfera mais seca poderia
104 proteger as sementes [24–26].

105 Outro fator que influencia negativamente à agricultura é a salinidade, principalmente em
106 culturas irrigadas [27], sendo o NaCl o sal predominante. A salinização dos solos pode ocorrer
107 de forma natural, por deposição ou contato com água do mar, sendo que aproximadamente 20%
108 das terras cultivadas no mundo são afetadas por sais [28]. Este problema é mais relevante em
109 regiões áridas e semiáridas do globo, onde a falta de chuva e a alta demanda evaporativa causada
110 pelas altas temperaturas e baixa umidade relativa do ar, contribuem para a intensificação da
111 salinidade no solo. A salinidade afeta o crescimento e o desenvolvimento das plantas [29],
112 influenciando negativamente em diferentes etapas do seu desenvolvimento [13,30,31].
113 Entretanto, ao longo da sua evolução, as plantas desenvolveram mecanismos para a regulação
114 e tolerância aos sais.

115 Alguns trabalhos estudaram os aspectos ecofisiológicos da tolerância de *J. curcas* ao NaCl [32–
116 35]; entretanto, estes estudos focaram em apenas um lote de sementes. Embora o interesse na
117 resposta do crescimento de *J. curcas* seja crescente, não se conhece pesquisas que tenha
118 examinado o efeito dos NaCl em diferentes genótipos durante a germinação e desenvolvimento
119 inicial das plântulas. Neste trabalho foram estudados cinco distintos genótipos de *J. curcas*
120 expostos a diferentes tratamentos com NaCl, para determinar a tolerância, e entender as
121 respostas morfológicas e fisiológicas desta espécie em condições de salinidade na sua
122 germinação e no seu desenvolvimento inicial, que possam ajudar na seleção de plantas com
123 boas características nos seus primeiros estádios do desenvolvimento.

124 Assim, as principais hipóteses desse trabalho foram (i) verificar se a utilização de um agente
125 dessecante poderia auxiliar na manutenção da viabilidade e germinabilidade das sementes de *J.*
126 *curcas*, quando estocadas por longos períodos de tempo, e (ii) identificar genótipos tolerantes a
127 salinidade entre os acessos de *J. curcas* comercializados no Brasil.

128

129 **Materiais e métodos**

130

131 **Testes de envelhecimento.** Para testar o efeito da estocagem sobre a viabilidade das sementes
132 foi empregado um teste de envelhecimento artificial, o qual consiste em reduzir o conteúdo de
133 água no interstício das sementes com um material dessecante, composto por sílica gel (Sigma-
134 Aldrich, Nº 10087). O genótipo usado neste experimento foi o 171 proveniente de Maceió,
135 Alagoas. Em cada unidade experimental foram adicionadas 50 sementes de *J. curcas*, dispostas
136 em caixas do tipo *germbox* (110 x 110 x 35 mm) sob uma malha de aço inoxidável suspensa a
137 2 cm do agente dessecante. Foram testados cinco tempos de estocagem (*i.e.*, 0, 3, 6, 9, 12 meses)
138 sendo que a estocagem se deu em condição de refrigerador com temperatura ajustada para $4 \pm$
139 2°C . Depois de cada período de estocagem, as sementes foram colocadas para germinar.

140 **Análise bioquímica das sementes usadas no teste de envelhecimento.** Uma porção de 10%
141 das amostras em cada período de estocagem foi cuidadosamente triturada em nitrogênio líquido
142 e estocada a -20°C até o uso. Para a análise de carboidratos solúveis totais (CST), aminoácidos
143 solúveis totais (AST) e amido (AMD), as amostras foram solubilizadas em etanol 50% (v/v)
144 [36], enquanto que para a análise de proteínas solúveis totais (PST), as amostras foram extraídas
145 em tampão Stitt [37]. Para a análise de amido, carboidratos solúveis totais, proteínas solúveis
146 totais e aminoácidos solúveis utilizou-se as metodologias descritas em Dubois [38], Bradford
147 [39] e Moore and Stein [40], respectivamente. Para a quantificação do teor de óleo (TDO)
148 utilizou-se a metodologia descrita em detalhes por Ahmad [41] e para a determinação de glicose
149 (GLC), frutose (FTS) e sacarose (SCR) utilizou-se a metodologia de Stitt [42], acoplada a
150 produção de 6-fosfogluconato, na presença sequencial das enzimas hexocinase,
151 fosfoglucoisomerase, glucose-6-fosfato desidrogenase e invertase. Todas estas análises foram
152 realizadas em triplicata.

153

154 **Análises fisiológicas acopladas ao teste de envelhecimento.** O teor relativo de água (TDA)
155 de sementes foi calculado conforme descrito em detalhes em Vertucci [43] e Moncaleano-
156 Escandon [21]. O potencial hídrico (PTH) das sementes foi quantificado com o medidor de
157 potencial hídrico do ponto de orvalho (WP4C; Decagon Devices, Pullman, WA, USA), onde as
158 sementes tiveram suas testas levemente trincadas a ponto de permitir a passagem da água do
159 interior das sementes para o meio externo. Os valores foram obtidos em MPa. Para estimação
160 da taxa respiratória (TRS), 5% das sementes utilizadas em cada período de estocagem foram
161 inseridas inteiras em uma câmara de fluxo de CO₂ (6400-09; LiCOR, Lincoln, NE, USA). Para
162 cada tempo de estocagem, 10 diferentes amostras foram utilizadas como repetições. Em cada
163 processo de mensuração da respiração líquida foram realizados três ciclos de 102 segundos,
164 com intervalo de 2 segundos entre as leituras. Durante esse tempo foi acompanhado o aumento
165 na concentração de CO₂ dentro da câmara. O CO₂ de referência foi calibrado, a cada medida,
166 de acordo com a concentração de CO₂ do ambiente (~400 µmol CO₂ m⁻² s⁻¹). A taxa de
167 respiração líquida foi expressa, portanto em µmol CO₂ h⁻¹ g⁻¹ semente.

168

169 **Testes de germinação com sementes envelhecidas.** Em cada tempo de avaliação, 25 sementes
170 de *J. curcas* foram retiradas do sistema de estocagem e postas para germinar em caixas do tipo
171 germbox (110 x 110 x 35 mm) contendo duas folhas de papel germtest embebido com 2x o peso
172 do papel em água e foram seladas e colocadas em uma câmara de crescimento NT 708 (New
173 Technical Instruments, Piracicaba, SP, Brasil). A incubadora foi dotada de quatro lâmpadas
174 fluorescentes brancas frias de 20 W com 40 µmoles m⁻² s⁻¹ ao nível das caixas de germinação.

175 O fotoperíodo foi de 12 h e as condições de temperatura foi de $25 \pm 0,5$ ° C. As avaliações de
176 germinação se deram diariamente por um período de 25 dias. Considerou-se germinada, a
177 semente cuja radícula tenha emergido do tegumento.

178

179 **Testes de germinação na presença de NaCl.** O experimento de germinação foi desenvolvido
180 em casa de vegetação na Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica,
181 Recife, PE (S 8°02'59.0' W 34°56'54.9', 4 masl) sendo a temperatura média registrada durante
182 os experimentos de $30,6 \pm 1,1$ °C com uma umidade média relativa de $70,4 \pm 5,8$ %. Foram
183 testadas cinco diferentes concentrações de NaCl (0, 50, 75, 100 e 150 mM) na água de irrigação,
184 sendo o tratamento 0 mM, isento de NaCl, em cinco genótipos de *J. curcas* (Tabela 1). Antes
185 da sementeira, as sementes foram desinfetadas com NaOCl (2%) por 10 minutos e triplamente
186 enxaguadas com água destilada. Na sequência, as sementes foram germinadas em bandejas de
187 polipropileno (20 x 20 x 5 cm) contendo 2500 g de areia lavada de rio, secada no ar; cada
188 sistema contendo 25 sementes foi considerada como uma unidade experimental. Os potes foram
189 irrigados diariamente com 300 mL de água contendo solução nutritiva de Hoagland [44] na
190 concentração final de 25%, sendo este o volume de irrigação necessário (*i.e.*, testado
191 previamente) para lixiviar o excesso de sais e evitar a sua acumulação no solo. O experimento
192 foi avaliado diariamente por 25 dias até a coleta das plântulas.

193

194 **Material vegetal.** Sementes de *J. curcas* foram fornecidas pela EMBRAPA Agroenergia
195 (Brasília, DF - Brasil), onde foram mantidas a 4°C até seu uso (Tabela 1).

196

197 **Tabela 1** Informação e localização dos cinco acessos de *Jatropha curcas* estudados sob
198 condições de salinidade com o objetivo de avaliar os parâmetros de germinação e
199 desenvolvimento inicial das plântulas.

Genótipo	Cidade	Estado	Localização geográfica	Altitude (m.asl.)
183	Jaíba	Minas Gerais	S 15°10'27.3' W 43°53'18'	478
114	Umuarama	Paraná	S 23°47'55.0' W 53°18'48'	430
218	São Miguel do Araguaia	Goiás	S 13°55'57.0' O 50°09'17'	350
171	Maceió	Alagoas	S 09°27'60.0' W 35°49'41'	131
133	Santa Inês	Maranhão	S 03°39'24.9' W 45°22'36'	31

200

201

202

203 **Avaliação dos parâmetros de germinação.** Para os dois experimentos foram calculados os
204 diferentes parâmetros de germinação: percentagem da germinação (PGR), tempo médio da
205 germinação (TMG), incerteza da germinação (ICG) e sincronia na germinação (SNG). Todos
206 os cálculos, gráficos e estatísticas foram realizados a partir do pacote GerminaR.

207

208 **Avaliação de parâmetros biométricos e de biomassa.** O comprimento médio da plântula
209 (CMP) e diâmetro médio do caule (DMC) foram avaliados ao final do experimento [21]. Para
210 tanto, as plântulas foram coletadas e separadas em três componentes: folhas, caules e raízes. A
211 altura das plantas foi medida por meio de uma régua calibrada em mm e o diâmetro do caule
212 medido através de um paquímetro digital (Digital Caliper, mod. ROHS, ZAAS Precision,
213 Piracicaba, SP). A área foliar (AF) foi avaliada por planta e por unidade experimental (AFT)
214 [45]. A biomassa seca foi estimada a partir da secagem dos tecidos em estufa de ventilação
215 forçada a 70°C; 72 horas. O peso seco das folhas (PSF), peso seco do caule (PSC) e peso seco
216 das raízes (PSR) foram usados para calcular vários parâmetros de biomassa, tais como: peso
217 seco total (PST); peso seco da parte aérea (PSA); razão do peso da folha (RPF; peso seco da
218 folha dividido pelo peso seco total); razão do peso seco do caule (RPC; peso seco do caule
219 dividido pelo peso seco total); razão do peso seco da parte aérea (RPA; peso seco da parte aérea
220 dividido pelo peso seco total) e razão do peso seco da raiz (RPR; peso seco da raiz dividido pelo
221 peso seco total).

222

223 **Desenho experimental e análises estatísticas.** Ambos os experimentos de germinação foram
224 conduzidos em um delineamento inteiramente casualizado. Para o experimento de estocagem
225 das sementes, utilizou-se cinco tempos de estocagem (0, 3, 6, 9 e 12 meses). Os dados para as
226 parcelas de 9 e 12 meses do experimento de envelhecimento foram submetidas ao cálculo de
227 parcela perdida. O experimento de salinidade foi composto por um fatorial, onde testou-se cinco
228 genótipos de *J. curcas*, e cinco diferentes concentrações de NaCl na água de irrigação (0, 50,
229 75, 100 e 150 mM). Cada tratamento foi composto por quatro repetições com 25 sementes. A
230 análise estatística e geração de gráficos foi realizada no software estatístico R [46]. A análise
231 de variância (ANOVA) foi realizada para avaliar as diferenças entre os fatores e a comparação
232 das médias com o teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0.05$) [47]. Para as análises
233 multivariadas foi realizada análise de correlação [47,48] e análise de componentes principais
234 [49].

235

236

237

238

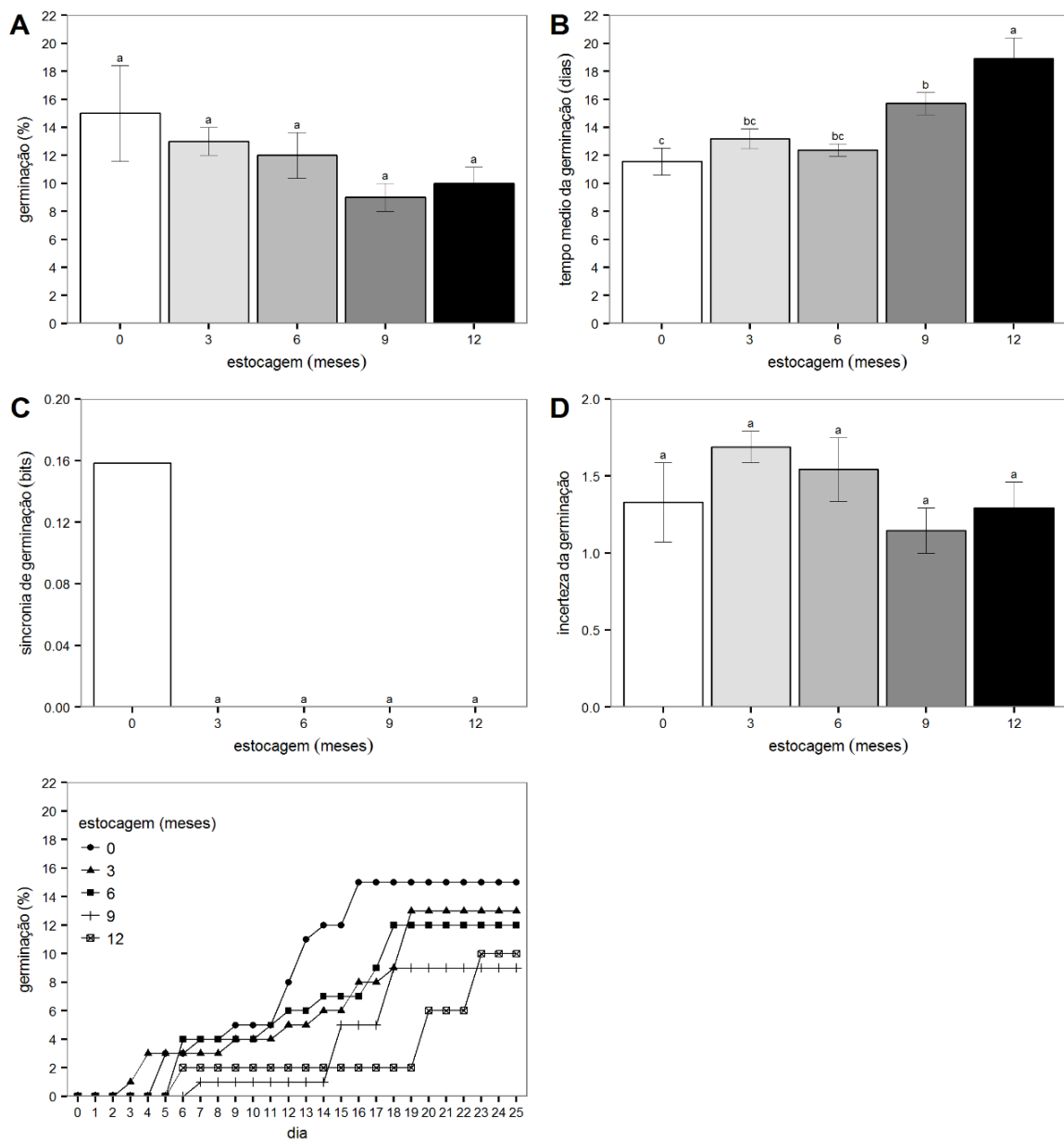
239 **Resultados**

240

241 **Germinação de sementes envelhecidas.** A germinação das sementes de *J. curcas* submetidas
242 ao armazenamento variou de 9% a 15%, com valores estatisticamente semelhantes entre si
243 (Figura 1A). Embora a germinação não tenha sido afetada pela estocagem, o tempo médio de
244 germinação foi sensivelmente aumentado com o tempo (Figura 1B). A germinação foi
245 completamente assincrônica para todos os tempos de estocagem, sendo registrada a média de
246 0,16 antes da estocagem e próximo de zero nos demais tempos (Figura 1C). Como foi
247 observado, a germinação no tempo foi significativamente afetada pelo tempo de estocagem,
248 entretanto, a incerteza da germinação não foi afetada pela estocagem (Figura 1D). Verifica-se
249 que as sementes antes da estocagem e estocadas por 3 meses iniciaram sua germinação no 4º e
250 no 3º dia após a semeadura respectivamente, enquanto nos demais tempos a germinação da
251 primeira semente só foi computada a partir do 6º dia o tempo para a estabilização da germinação
252 foi aumentado à medida que se aumentou o tempo de estocagem, sendo completada aos 15 dias
253 sem estocagem e aos 23 dias aos 12 meses de estocagem (Figura 1E).

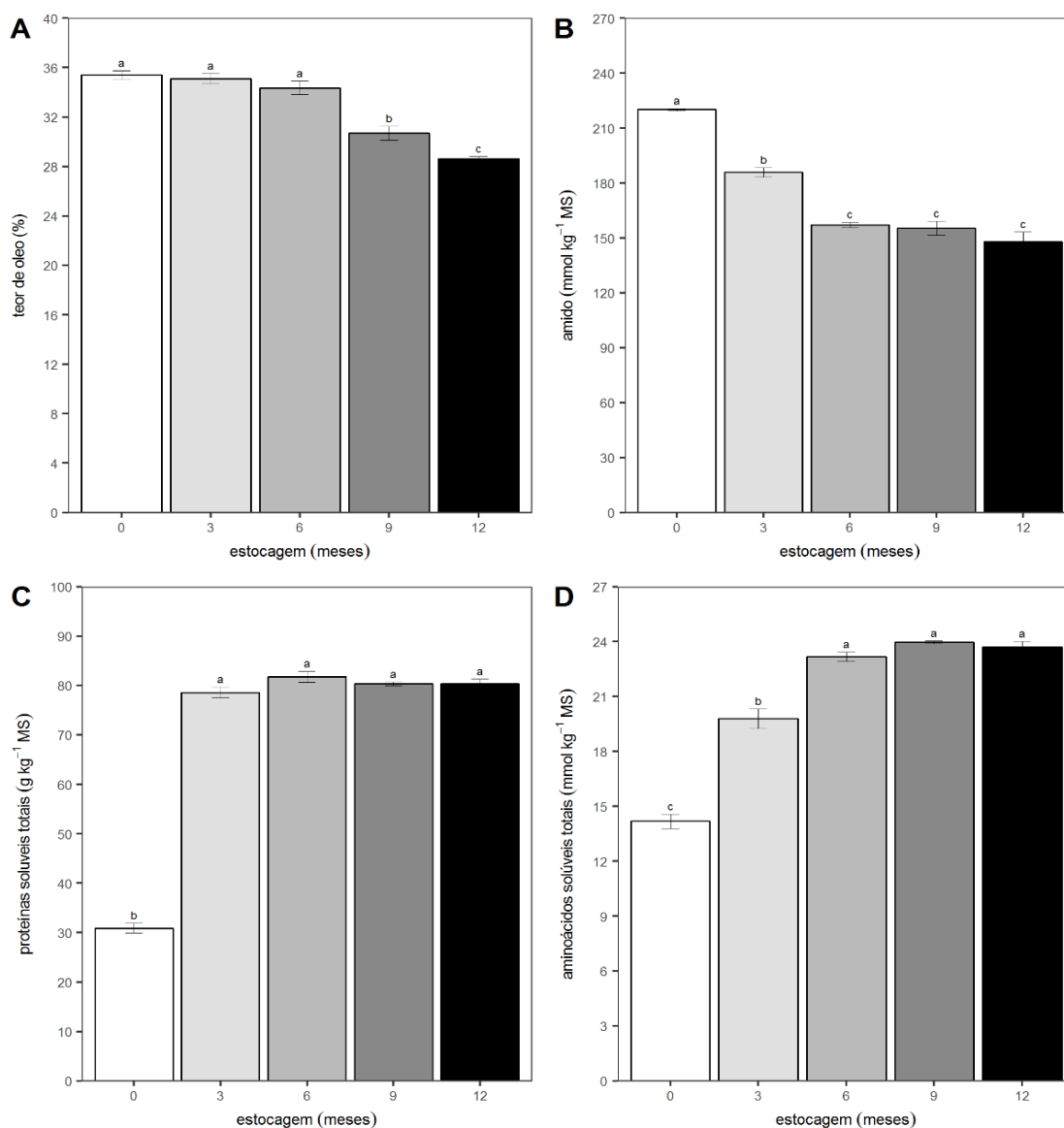
254

255 **Respostas bioquímicas das sementes submetidas ao envelhecimento.** Verifica-se que o teor
256 de óleo nas sementes se manteve praticamente estável até o sexto mês de estocagem na taxa de
257 35%, com reduções significativas a partir dessa data até o 12º mês, quando o teor de óleo foi
258 aproximadamente 29% (Figura 2A), sendo que o conteúdo de óleo nas sementes mostrou
259 redução no tempo ($r = -0,91$, $p \leq 0,05$; Figura 5). Por outro lado, o amido foi rapidamente
260 metabolizado com redução aproximada de 33% com tempo 12 meses de armazenamento (figura
261 2B). O teor de proteínas solúveis totais e aminoácidos solúveis totais foi aumentado em 160%
262 e aproximadamente 67% (figura 2C-D), durante a estocagem. Mostra-se uma correlação alta (r
263 $= 0,92$, $p \leq 0,05$) entre a proteínas solúveis totais e sínteses de aminoácidos.



264

265 **Figura 01.** Germinabilidade (A), tempo médio de germinação (B), índice de sincronia (C),
 266 incerteza da germinação (D) e germinação temporal (E) avaliados em sementes de *Jatropha*
 267 *curcas* no genótipo 171 estocadas por 0, 3, 6, 9 e 12 meses. As barras representam a média (\pm
 268 EP). As diferenças das médias entre os meses de estocagem são representadas pelas letras
 269 minúsculas (SNK, $p \leq 0,05$). $n = 4$.



270

271 **Figura 02.** Conteúdo de óleo (A), aminoácidos B), proteína solúveis totais (C), aminoácidos
 272 solúveis totais (D) avaliados em sementes de *Jatropha curcas* no genótipo 171 estocadas por 0,
 273 3, 6, 9 e 12 meses. As barras representam a média (\pm EP). As diferenças das médias entre os
 274 meses de estocagem são representadas pelas letras minúsculas (SNK, $p \leq 0,05$). $n = 4$.

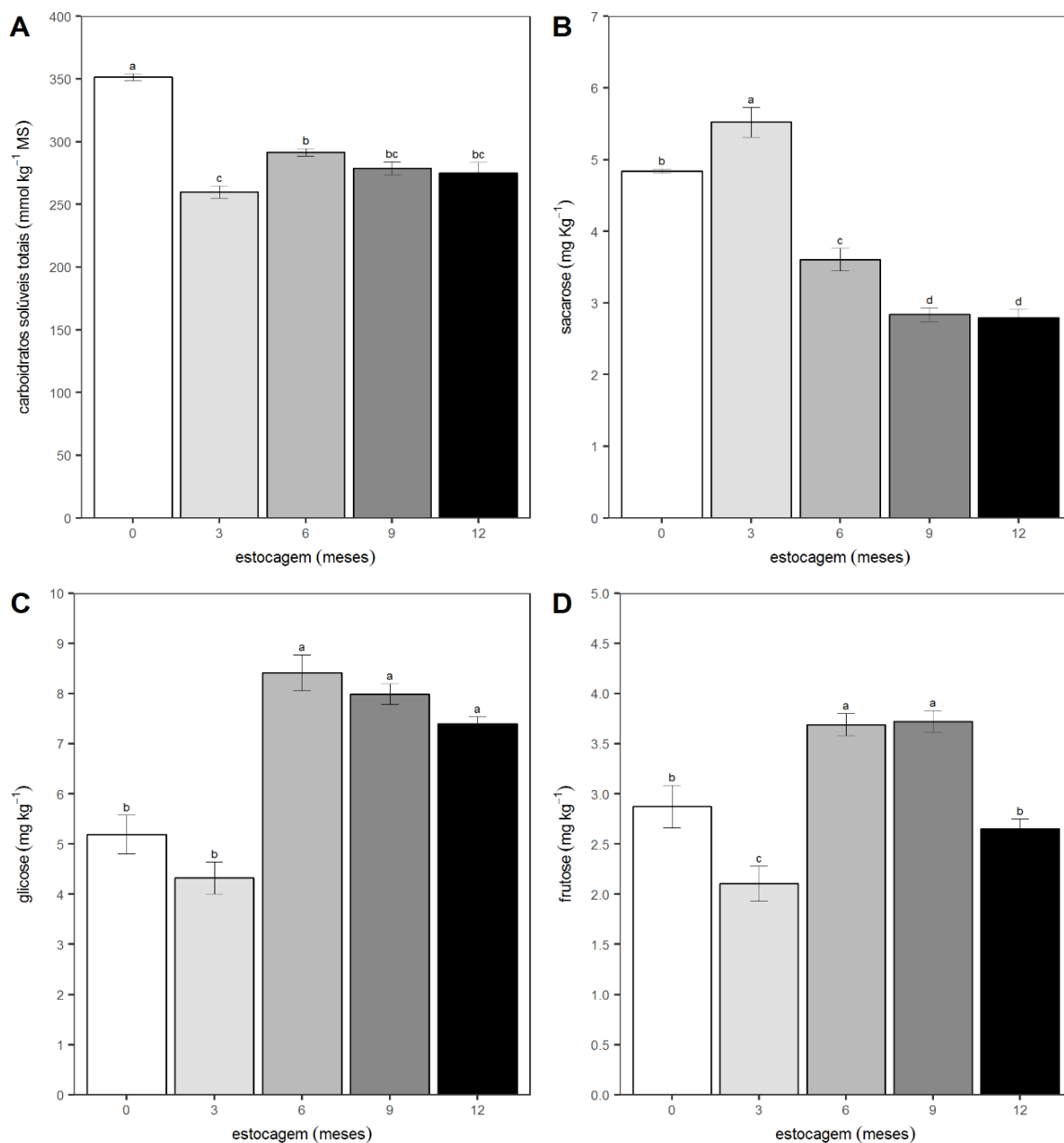
275

276 Foi observada redução gradual no teor de carboidratos solúveis totais, ao terceiro mês de
 277 estocagem comparada com o controle, sem mostrar diferenças até o 12º mês de estocagem
 278 (Figura 3A). Os níveis de sacarose tiveram redução de aproximadamente 49% entre 3º e 12º
 279 meses de estocagem (Figura 3B), mas os níveis de glicose se mantiveram estáveis até o 3º mês
 280 de estocagem. A partir do 6º mês a glicose foi rapidamente elevada, alcançando 71% no 12º
 281 mês em relação às sementes não estocadas (Figura 3C). Por outro lado, os níveis de frutose não
 282 apresentaram uma tendência durante os meses avaliados (Figura 3D), enquanto os níveis de

283 sacarose foram diminuindo ($r = -0,57$, $p \leq 0,05$) ao longo da estocagem. A glicose ($r = 0,67$, p
284 $\leq 0,05$) teve um comportamento contrário, ou seja, aumento com a estocagem (Figura 5)

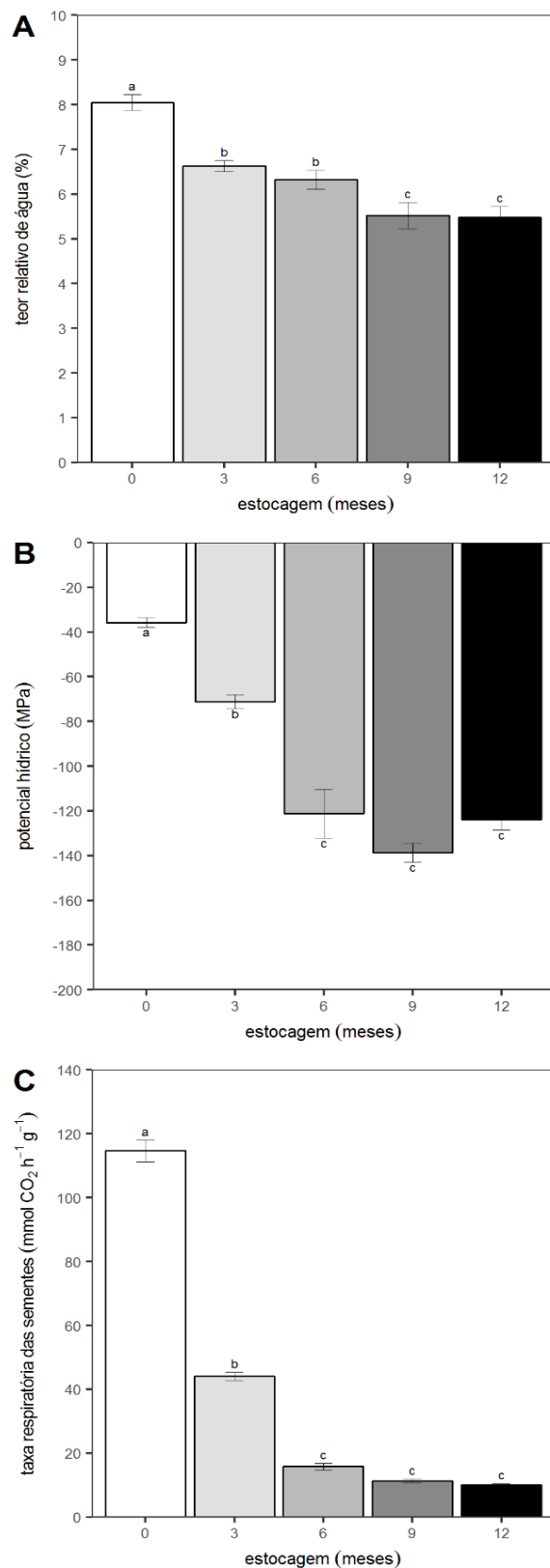
285

286 **Respostas fisiológicas das sementes submetidas ao envelhecimento.** Com o tempo de
287 estocagem em agente dessecante, verificou-se que o teor de água nas sementes foi fortemente
288 reduzido. As sementes antes da estocagem apresentavam conteúdo de água de 8%, mas
289 reduziram para 5,5% aos 12 meses de estocagem (Figura 4A). O potencial hídrico mostrou
290 redução paralela ao teor de água, apresentando forte correlação ($r = 0,83$, $p \leq 0,05$) entre estas
291 duas características (Figura 5). Verifica-se que o potencial hídrico das sementes foi diminuído
292 de -35 Mpa, sem estocagem, para -124 MPa aos 12 meses de estocagem (Figura 4B). Com a
293 redução do teor relativo de água e do potencial hídrico houve drástica redução da taxa
294 respiratória das sementes ($r = 0,88$, $p \leq 0,05$), passando de $115 \text{ mmol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ para 10
295 $\text{mmol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ no tempo zero (Figura 5), ocorrendo uma redução de 91% na taxa
296 respiratória nas sementes ao longo dos 12 meses de estocagem (Figura 4C).



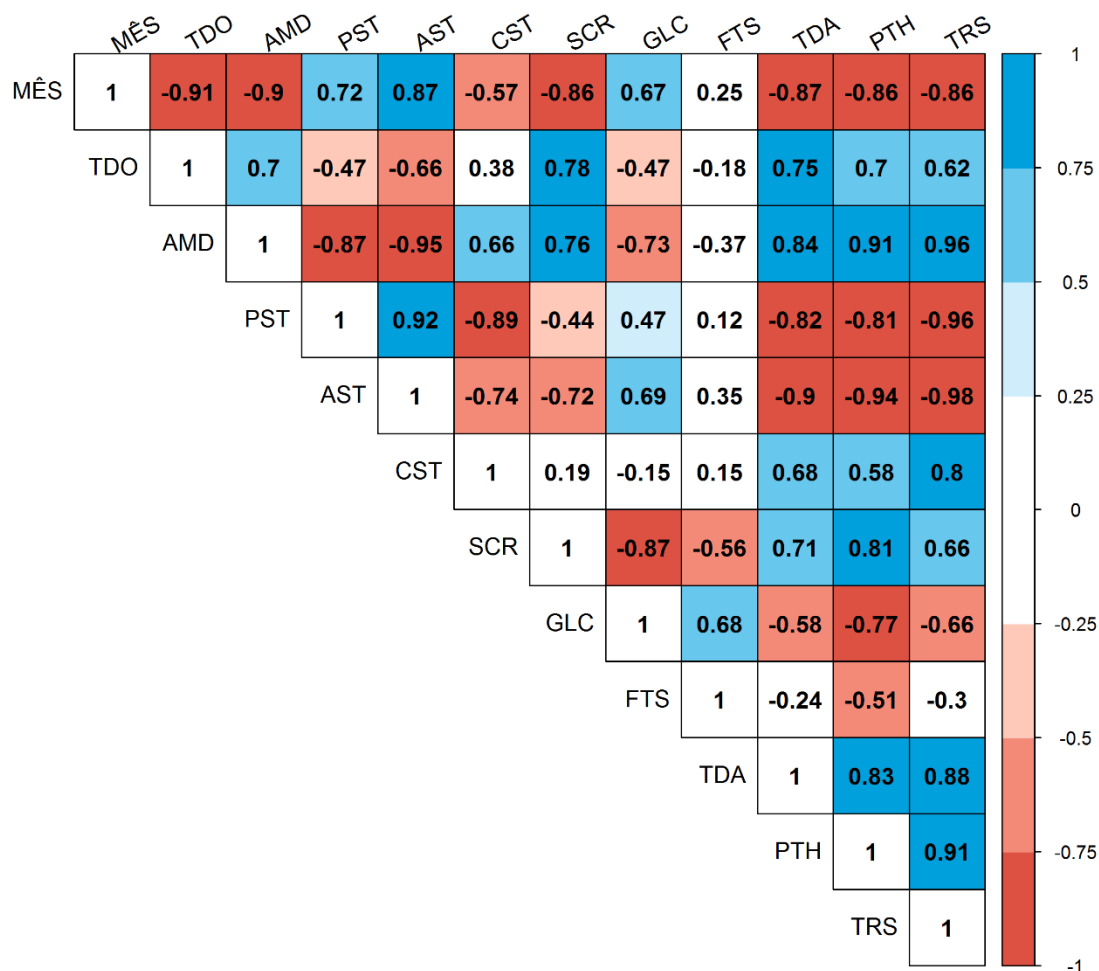
297

298 **Figura 3.** Carboidratos solúveis totais (A), sacarose B), glicose (C) e frutose (D) avaliados em
 299 sementes de *Jatropha curcas* no genótipo 171 estocadas por 0, 3, 6, 9 e 12 meses. As barras
 300 representam a média (\pm EP). As diferenças das médias entre os meses de estocagem são
 301 representadas pelas letras minúsculas (SNK, $p \leq 0,05$). $n = 4$.



302

303 **Figura 4.** Teor relativo de água (A), potencial hídrico (B), taxa respiratória (C), avaliados em
 304 sementes de *Jatropha curcas* no genótipo 171 estocadas por 0, 3, 6, 9 e 12 meses. As barras
 305 representam a média (\pm EP). As diferenças das médias entre os meses de estocagem são
 306 representadas pelas letras minúsculas (SNK, $p \leq 0,05$). $n = 4$.



307

308 **Figura 5** Correlação de Pearson ($P \leq 0,05$) das variáveis avaliadas em sementes de *Jatropha*
 309 *curcas* no genótipo 171 estocadas por 0, 3, 6, 9 e 12 meses. TDO, teor de óleo; AMD, amido;
 310 PST, proteína solúveis totais; AST, aminoácidos solúveis totais; CST, carboidratos solúveis
 311 totais; SCR, sacarose; GLC, glucose; FTS, frutose; TDA, teor de água nas sementes; PTH,
 312 potencial hídrico; TRS, taxa de respiração das sementes.

313

314 **Germinação das sementes tratadas com NaCl.** A germinação foi quase nua na concentração
 315 de 150 mM de NaCl para todos os genótipos. Para a concentração controle (0 mM), sementes
 316 dos acessos 183 e 114 tiveram 71% e 86% de germinação, respectivamente, com diminuição
 317 gradual com o incremento na concentração de NaCl, sendo de 0% para 150 mM e 4% para 100
 318 mM. Os genótipos 218 e 133 não diferiram até 100 mM de NaCl, embora a germinação, tenha
 319 sido reduzida para aproximadamente 5% na concentração de 150 mM. Sementes do acesso 171
 320 apresentaram 65% de germinação no controle, reduzindo para 32% e 9% em 50 mM e 150 mM
 321 de NaCl respectivamente (Figura 6A). O tempo médio da germinação para o controle foi de 5 a

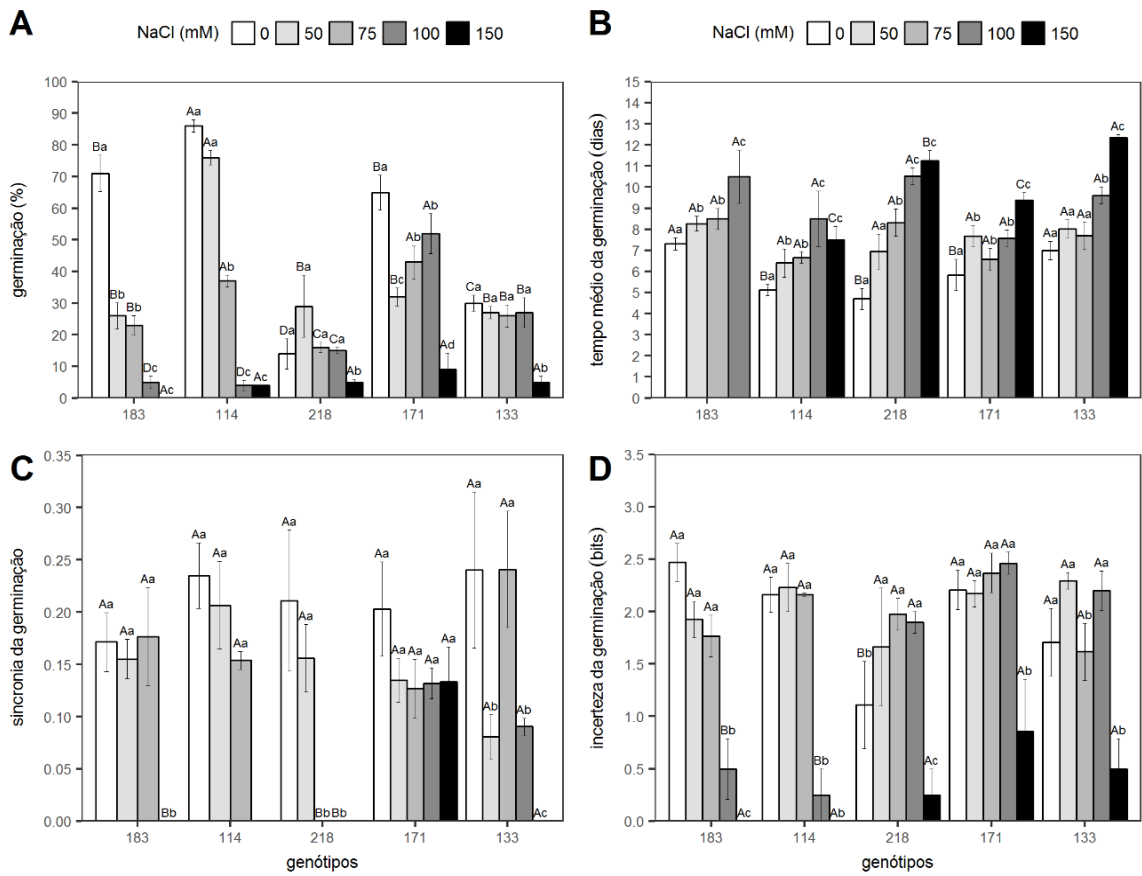
322 7 dias em geral para todos os acessos, enquanto para a concentração de 150 mM de NaCl o
323 intervalo foi maior, compreendido entre 7,2 dias até 12,3 dias. Não foram observadas diferenças
324 significativas no tempo médio da germinação de 50 mM a 75 mM, apresentando média geral
325 de 7,5 dias para todos os genótipos (Figura 6B). Não houve diferença na sincronia da
326 germinação entre os acessos do controle até 75 mM de NaCl; entretanto, a sincronia à 100 mM
327 foi nula nos acessos 183, 114 e 218, assim como foi para o acesso 133 na concentração a 150
328 mM de NaCl. Observou-se que os valores de sincronia foram sempre inferiores à 0,25 para
329 todas as concentrações (Figura 6C), denotando perfil germinativo muito assincrônico. O valor
330 máximo para a incerteza na germinação neste experimento foi 4,64 bits. Os genótipos 183 e 114
331 mostraram tendência a redução da incerteza com o aumento na concentração de NaCl. A
332 incerteza na germinação foi estável até 75 mM de NaCl, mas com sensível elevação na
333 concentração de 100 mM, onde a incerteza foi de 0,5 e 0,3 para os acessos 183 e 114,
334 respectivamente. Os acessos 218, 171 e 133 apresentaram tendência no incremento da incerteza
335 de 0 mM a 100 mM sem apresentar diferenças significativas. Para 150 Mm, a incerteza foi 0,3,
336 0,7 e 0,5 para os genótipos 218, 171 e 133 respectivamente (Figura 6D).

337

338 A germinação cumulativa apresentou diferenças para cada um dos genótipos. Observou-se que,
339 independentemente dos acessos, a germinação nos tratamentos sem estresse iniciou-se entre o
340 3º e 4º dia após a semeadura; enquanto que para os tratamentos com adição de NaCl os valores
341 máximos de germinação foram observados entre o 9º e 12º dia (Figura 7A-E). Independente do
342 genótipo avaliado, verificou-se que a germinação se iniciou no 3º dia no controle, enquanto nos
343 tratamentos de 50 mM e 75 mM a germinação foi em geral iniciada no 4º dia, valores que foram
344 elevados com 100 mM (5º dia) e 150 mM de NaCl (7º dia). Entretanto, independente dos
345 tratamentos e dos níveis de salinidade, a germinação tornou-se estável a partir do 13º dia (Figura
346 7F).

347

348

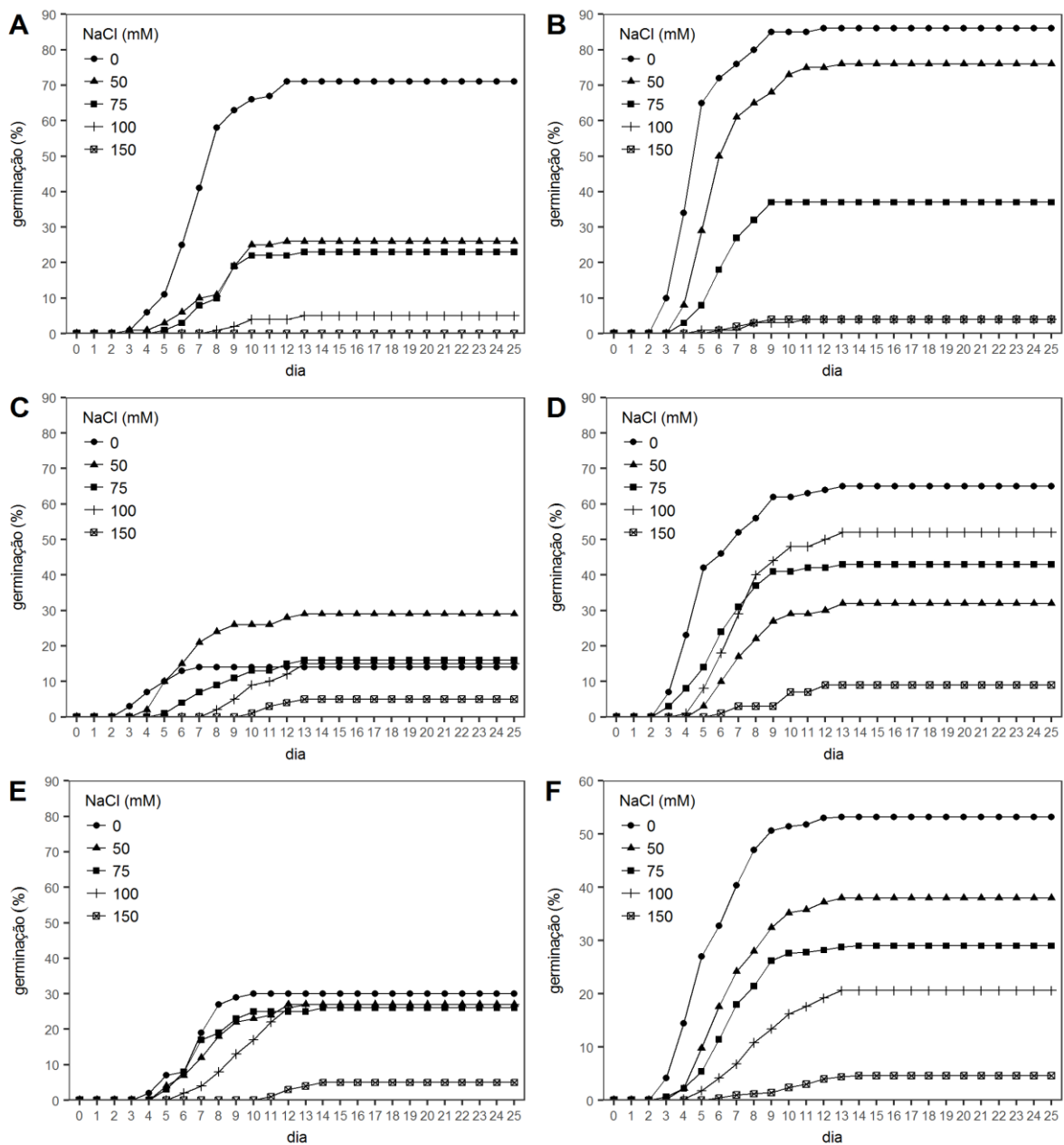


349

350

351 **Figura 6** Percentagem de germinação (A), tempo médio de germinação (B), sincronia da
 352 germinação (C) e incerteza da germinação (D) avaliados em cinco genótipos de *Jatropha curcas*
 353 L. sob distintas concentrações de NaCl (0, 50, 75, 100 e 150 mM). As barras verticais
 354 representam a média (\pm EP). As diferenças das médias entre os acessos são representadas por
 355 diferentes letras maiúsculas e entre os níveis de sal por diferentes letras minúsculas (SNK, $p \leq$
 356 0,05). $n = 4$

357



358

359 **Figura 7** Germinação cumulativa no tempo avaliados em cinco genótipos de *Jatropha curcas*

360 L. sob distintas concentrações de NaCl (0, 50, 75, 100 e 150 mM). (A) Genótipo 183. (B)

361 Genótipo 114. (C) Genótipo 218. (D) Genótipo 171. (E) Genótipo 133. (F) Germinação média

362 dos cinco genótipos por cada concentração de NaCl na água de irrigação.

363

364 Componentes biométricos e de biomassa

365 Embora a germinação tenha sido avaliada até a concentração de 150 mM de NaCl, a produção

366 de biomassa só foi computada até 100 mM de NaCl, sendo os parâmetros de biomassa

367 fortemente afetados pelo incremento da salinidade. Independente do genótipo, o acúmulo de

368 biomassa seca de folha (PSF) foi reduzido a zero em 100 mM. Para o controle, o PSF, não

369 mostrou diferença entre os acessos 114, 171 e 183 com 5,19 g, 4,62 g e 5,11 g respectivamente.
370 Por outro lado, para os genótipos 133 e 218 o PSF foram de 2,37 e 2,43, respectivamente. A
371 concentração de 50 mM, o genótipo 114 obteve o maior PSF com 1,39 g, seguido pelos
372 genótipos 171, 133, 183. O genótipo 218 se mostrou o mais sensível à salinidade, uma vez que
373 apresentou PSF de 0,23 g. Para o tratamento de 75 mM, o PSF foi reduzido a valores próximos
374 de zero para todos os acessos (Tabela 2). Para o peso seco da raiz (PSR), o genótipo 114
375 apresentou o melhor desenvolvimento com 0, 50 e 75 mM de NaCl em comparação aos demais
376 acessos, enquanto para 100 mM o genótipo 218 teve maior acúmulo de biomassa a respeito dos
377 outros acessos. O genótipo 171 não mostrou diferenças no acúmulo de biomassa para a irrigação
378 de 50, 75 e 100 mM com valores de 0,31 g, 0,22 g e 0,26 g respectivamente. Para o peso seco
379 do caule (PSC), o acesso 114 apresentou o melhor desenvolvimento a 0 mM e 50 mM, enquanto
380 o acesso 183 não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos de 50 mM e 75 mM
381 de NaCl. Na concentração de 100 mM os genótipos 218, 133 e 171 mostraram incremento no
382 acúmulo de biomassa do caule com valores de 0,98 g, 1,59 g e 2,40 g respectivamente. Para o
383 peso seco total (PST), o genótipo 114 mostrou-se superior aos demais, pelo menos nas
384 concentrações de 0 e 50 mM, apresentando valores de 20,63 g e 4,31 g, respectivamente. Os
385 genótipos 171 e 183 não mostraram diferenças estatísticas entre si no PST. Os genótipos 133,
386 218 e 171 apresentaram incremento na biomassa em 100 mM, com valores de 1,78 g, 1,85 g e
387 2,26 g, respectivamente, enquanto os mesmos genótipos na concentração de 75 mM não
388 apresentaram diferenças significativas.

389 Os parâmetros de área foliar unitária (AF) e área foliar total (AFT) só foram possíveis de serem
390 avaliados até a concentração de 75 mM de NaCl, uma vez que estes foram os parâmetros mais
391 afetados pelo incremento dos sais na solução de irrigação. A AF dos genótipos 218, 171 e 133
392 apresentou os valores mais altos na concentração controle, enquanto para 50 mM os genótipos
393 com maior performance foram 133, 114 e 183. Os genótipos 133, 114, 171 e 183 para 75 mM
394 apresentaram valores de 0,4, 0,58, 0,73 e 1,97 cm², respectivamente. Para a variável AFT, o
395 acesso 114 apresentou o maior valor no tratamento controle, seguido pelos acessos 183 e 171
396 que não mostraram diferenças significativas entre si. Na concentração de 50 mM, o genótipo
397 114 continuou apresentando maior área foliar, seguido pelo acesso 133, enquanto na
398 concentração de 75 mM não existiu diferença entre os acessos. Houve tendência de redução da
399 altura (CMP) das plantas com o aumento dos sais (Tabela 2). A CMP atingiu aproximadamente
400 13 cm no controle, mas foi fortemente reduzida até valores menores de 3 cm a 100 Mm de NaCl,
401 fato registrado claramente no genótipo 183 (Tabela 2). O diâmetro do caule (DMC) apresentou
402 redução com o aumento da concentração dos sais, mesmo sem apresentar diferenças estatísticas.
403 Na concentração de 50 mM e 75 mM, os acessos 183 e 114 obtiveram os maiores valores de

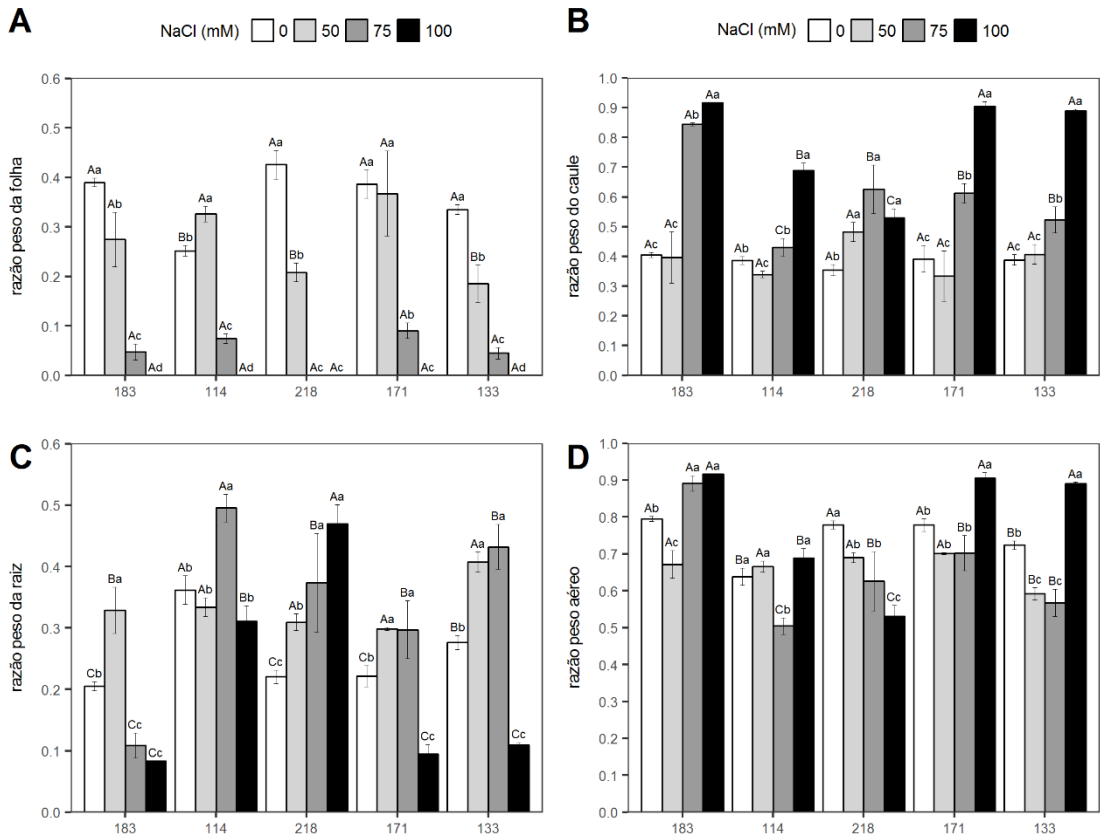
404 diâmetro do caule, enquanto para a concentração de 100 mM tiveram os valores mais baixos
405 (Tabela 2).

406 Para a razão do peso da folha (RPF) pode-se observar tendência na redução com o aumento da
407 salinidade, sendo o genótipo 218 apresentando razão de 0,42, seguido pelo genótipo 183 com
408 razão de 0,39. Estes dois genótipos foram os que melhor se comportaram neste parâmetro
409 alométrico. O genótipo 171 não apresentou diferença significativa em RPF até 50 mM,
410 enquanto o genótipo 114 incrementou seu acúmulo de biomassa a 50 mM. Todos os genótipos
411 mostraram drástica redução a partir de 75 mM de NaCl, observando-se uma redução de acúmulo
412 de biomassa na folha com o incremento da concentração de NaCl na água de irrigação (Figura
413 8A). Perfil distinto verifica-se na razão peso seco do caule (RPC), o qual foi aumentado com a
414 elevação da salinidade, mesmo que não se tenha verificado efeito significativo até a
415 concentração de 50 mM. Para a concentração de 75 mM, o genótipo 183 se mostrou melhor do
416 que os demais, embora semelhante aos genótipos 171 e 133 na concentração de 100 mM (Figura
417 8B). A razão do peso da raiz (RPR) mostrou comportamento distinto para cada genótipo, sendo
418 que os genótipos 171, 133 e 218, apresentaram incremento de biomassa das raízes até 75 mM,
419 sendo que este último apresentou incremento contínuo até a concentração de 100 mM. Por outro
420 lado, o genótipo 183 apresentou incremento até 50 mM e a partir daí teve seus valores reduzidos.
421 O genótipo 114, aparentemente não foi afetado pelo incremento da concentração de NaCl
422 (Figura 8C). Na característica peso aéreo (RPA) não foi possível observar tendência com o
423 incremento da concentração de NaCl; entretanto, os genótipos 183, 114, 171 e 133, no
424 tratamento do 100 mM obtiveram os valores mais elevados de RPA a respeito

Tabela 2 Parâmetros dos componentes biométricos e de biomassa avaliados em cinco acessos de *Jatropha curcas* L. sob estresse de salinidade aos 25 dias depois da semeadura. Onde: PSF, peso seco da folha. PSR, peso seco da raiz. PSC, peso seco do caule. PST, peso seco total. AF, área foliar. AFT, área foliar total. CMP, comprimento da planta. DMC, diâmetro do caule. Os valores estão representados pela média (\pm EP) para quatro réplicas de 25 sementes em cada unidade experimental. As diferenças das médias entre os acessos são representadas pelas diferentes por letras maiúsculas e entre os diferentes níveis de sal por letras minúsculas (SNK, $p \leq 0,05$)

Genótipos	NaCl (mM)	PSF (g)	PSR (g)	PSC (g)	PST (g)	AF (cm ²)	AFT (cm ²)	DMC (mm)	CMP (cm)
183	0	5.12 \pm 0.37 Aa	2.68 \pm 0.13 Ba	5.34 \pm 0.51 Ba	13.13 \pm 0.99 Ba	93.04 \pm 6.69 Ba	1624.49 \pm 43.69 Ba	6.61 \pm 0.21 Aa	13 \pm 0.35 Aa
	50	0.55 \pm 0.06 Bb	0.68 \pm 0.06 Bb	0.93 \pm 0.32 Ab	2.15 \pm 0.31 Bb	5.26 \pm 1.22 Bb	31.45 \pm 4.11 Ab	5.65 \pm 0.13 Ab	6.24 \pm 0.39 Ab
	75	0.06 \pm 0.01 Ac	0.12 \pm 0.04 Cc	0.99 \pm 0.15 Ab	1.32 \pm 0.17 Ab	1.97 \pm 0.11 Ab	11.83 \pm 2.08 Ab	5.16 \pm 0.17 Ab	5.12 \pm 0.31 Ab
	100	0 \pm 0 Ad	0.01 \pm 0.01 Cd	0.12 \pm 0.12 Bc	0.13 \pm 0.13 Bc	0 \pm 0 Ac	0 \pm 0 Ac	1.8 \pm 1.15 Bc	0.88 \pm 0.88 Bc
114	0	5.19 \pm 0.27 Aa	7.48 \pm 0.58 Aa	7.97 \pm 0.28 Aa	20.64 \pm 0.66 Aa	87.33 \pm 4.19 Ba	1875.27 \pm 82.33 Aa	7.33 \pm 0.2 Aa	12.38 \pm 0.34 Aa
	50	1.39 \pm 0.15 Ab	1.44 \pm 0.19 Ab	1.48 \pm 0.24 Ab	4.32 \pm 0.56 Ab	12.54 \pm 2.56 Bb	239.59 \pm 52.25 Ab	5.29 \pm 0.1 Ab	6.8 \pm 0.35 Ab
	75	0.08 \pm 0.01 Ac	0.55 \pm 0.09 Ac	0.49 \pm 0.11 Ac	1.11 \pm 0.19 Ac	0.58 \pm 0.11 Bc	5.28 \pm 0.83 Ab	5.23 \pm 0.11 Ab	4.14 \pm 0.23 Ac
	100	0 \pm 0 Ad	0.15 \pm 0.03 Cd	0.34 \pm 0.02 Bc	0.49 \pm 0.04 Bc	0 \pm 0 Ad	0 \pm 0 Ac	4.25 \pm 0.26 Ac	2.33 \pm 0.33 Bd
218	0	2.43 \pm 0.34 Ba	1.24 \pm 0.08 Da	1.99 \pm 0.16 Ca	5.65 \pm 0.54 Ca	178.15 \pm 11.75 Aa	839.17 \pm 110.24 Ca	7.27 \pm 0.23 Aa	10.81 \pm 0.4 Aa
	50	0.23 \pm 0.01 Bb	0.35 \pm 0.01 Cc	0.55 \pm 0.08 Ab	1.12 \pm 0.08 Bb	2.69 \pm 0.33 Bb	25.86 \pm 2.91 Ab	5.11 \pm 0.15 Ab	4.96 \pm 0.35 Cb
	75	0 \pm 0 Ac	0.28 \pm 0.06 Bc	0.47 \pm 0.07 Ab	0.74 \pm 0.04 Ab	0 \pm 0 Bb	0 \pm 0 Ab	4.19 \pm 0.24 Ab	2.33 \pm 0.31 Bc
	100	0 \pm 0 Bc	0.87 \pm 0.06 Ab	0.98 \pm 0.07 Ab	1.85 \pm 0.07 Ab	0 \pm 0 Ac	0 \pm 0 Ac	4.45 \pm 0.24 Ab	2.57 \pm 0.44 Ac
171	0	4.62 \pm 0.49 Aa	2.64 \pm 0.26 Ba	5.13 \pm 1.37 Ba	12.4 \pm 2.11 Ba	97.45 \pm 5.44 Ba	1595.74 \pm 199.32 Ba	7.34 \pm 0.25 Aa	12 \pm 0.48 Aa
	50	0.38 \pm 0.09 Bb	0.31 \pm 0.03 Cb	0.36 \pm 0.11 Ac	1.05 \pm 0.11 Bc	4.33 \pm 0.35 Bb	33.99 \pm 1.39 Ab	4.94 \pm 0.14 Ab	5.16 \pm 0.3 Cb
	75	0.08 \pm 0.01 Ac	0.22 \pm 0.06 Bb	0.49 \pm 0.08 Ac	0.9 \pm 0.25 Ac	0.73 \pm 0.08 Bb	8.83 \pm 1.67 Ab	4.71 \pm 0.2 Ab	4.54 \pm 0.3 Ab
	100	0 \pm 0 Ad	0.26 \pm 0.08 Bb	2.4 \pm 0.38 Ac	2.66 \pm 0.45 Ab	0 \pm 0 Ac	0 \pm 0 Ac	4.61 \pm 0.15 Ab	3.58 \pm 0.29 Ab
133	0	2.37 \pm 0.2 Ba	1.94 \pm 0.1 Ca	2.78 \pm 0.35 Ca	7.09 \pm 0.62 Ca	105.52 \pm 5.19 Ba	794.77 \pm 84.01 Ca	6.62 \pm 0.17 Aa	11.65 \pm 0.44 Aa
	50	0.54 \pm 0.21 Bb	1.05 \pm 0.15 Bb	1.04 \pm 0.13 Ab	2.63 \pm 0.47 Bb	23.57 \pm 4.41 Ab	161.47 \pm 37.86 Ab	5.21 \pm 0.15 Ab	6.91 \pm 0.42 Bb
	75	0.04 \pm 0.01 Ac	0.39 \pm 0.09 Bc	0.45 \pm 0.05 Ab	0.88 \pm 0.13 Ab	0.4 \pm 0.05 Bc	2.67 \pm 0.63 Ab	4.87 \pm 0.19 Ab	5.04 \pm 0.23 Ac
	100	0 \pm 0 Ad	0.19 \pm 0.02 Bc	1.59 \pm 0.23 Ab	1.78 \pm 0.25 Ab	0 \pm 0 Ad	0 \pm 0 Ac	4.61 \pm 0.22 Ab	3.35 \pm 0.33 Ad

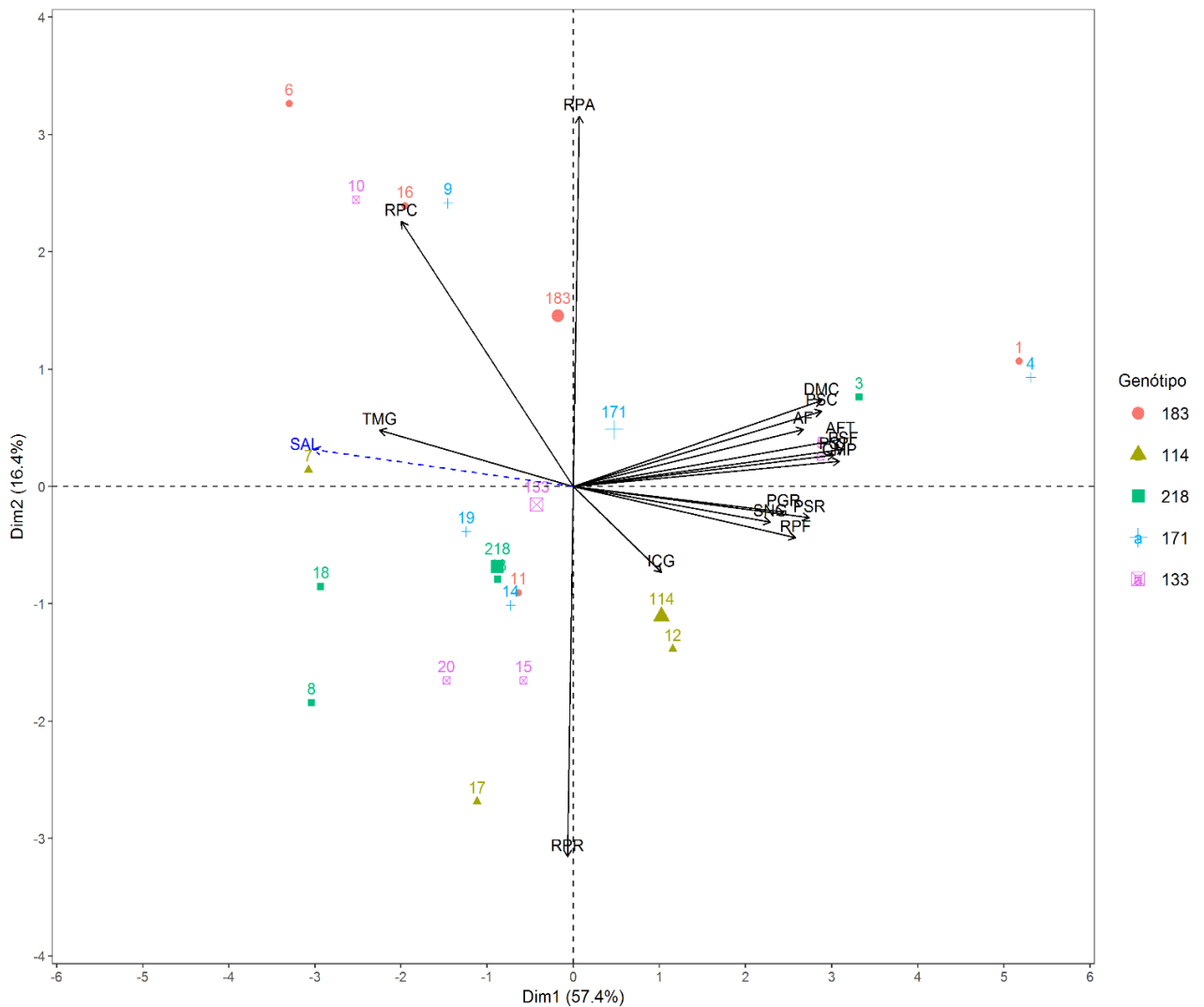
426 dos outros tratamentos de sais, enquanto o genótipo 218 apresentou redução do RPA quando se
 427 incrementou a salinidade (Figura 8D).
 428



429
 430 **Figura 8** Razão de peso seco da folha (A), razão do peso seco do caule (B), razão do peso da
 431 raiz (C) e razão do peso da parte aérea (D) avaliados em cinco genótipos de *Jatropha curcas* L.
 432 sob distintas concentrações de NaCl (0, 50, 75, 100 e 150 mM). As barras verticais representam
 433 a média (\pm EP). As diferenças das médias entre os acessos são representadas por diferentes
 434 letras maiúsculas e entre os níveis de sal por diferentes letras minúsculas (SNK, $p \leq 0,05$). $n =$
 435 4.
 436
 437
 438

439 *Análise multivariada do experimento de salinidade*

440 Os parâmetros de germinação foram negativamente afetados pelo incremento na concentração
441 de sais; existindo correlação negativa entre porcentagem de germinação ($r = -0,55$, $p \leq 0,05$) e
442 a sincronia na germinação ($r = -0,69$, $p \text{ valor} \leq 0,001$). Por outro lado, o tempo médio da
443 germinação foi positivamente significativo quando correlacionado com o incremento de sais
444 ($r = 0,66$, $p \leq 0,001$). Entretanto, não houve correlação significativa entre incerteza da
445 germinação e o incremento de sais ($r = -0,23$, $p = 0,321$). Os parâmetros de biomassa foram
446 significativamente afetados com o aumento dos sais. Cita-se as correlações entre este parâmetro
447 em relação ao peso seco da folha ($r = -0,86$, $p \leq 0,001$), a área foliar ($r = -0,89$, $p \leq 0,001$), com
448 a altura da planta ($r = -0,89$, $p \leq 0,001$) e com o diâmetro do caule ($r = -0,91$, $p \leq 0,001$). Outros
449 parâmetros alométricos também foram influenciados pela adição salina; cita-se a relação
450 negativa entre a salinidade e a razão do peso da folha ($r = -0,90$, $p \leq 0,001$) e razão da área foliar
451 ($r = -0,94$, $p \leq 0,001$). Outras características alométricas, por outro lado, foram fortemente
452 aumentadas com a salinidade; cita-se o incremento na razão do peso do caule
453 ($r = 0,74$, $p \leq 0,001$). A análise dos componentes principais mostra que aproximadamente 74%
454 da variação pode ser explicada pelos parâmetros estudados neste trabalho. No primeiro
455 componente as variáveis PSF, AFT, CMP e PST foram as que apresentaram maior aporte na
456 variância e estão correlacionadas negativamente com o incremento de NaCl, enquanto as
457 variáveis com correlação positiva foram o TMG e RPC. Os genótipos que mostraram melhor
458 resposta foram 114, 171 e 183 e os genótipos susceptíveis 133 e 218 (Figura 9).



459

460

461 **Figura 9.** Análise de componentes principais (PCA) das variáveis avaliadas em cinco genótipos
 462 de *Jatropha curcas* L. sob distintas concentrações de NaCl (0, 50, 75, 100 e 150 mM). PGR,
 463 Percentagem de germinação; TMG, Tempo médio da germinação; ICG, Incerteza da
 464 germinação; SNG, Sincronia da germinação; PSF, peso seco da folha; PSR, peso seco da raiz;
 465 PSC, peso seco do caule; PST, peso seco total; AF, área foliar total; AFT, área foliar total; RPF,
 466 razão de peso seco da folha; RPC, razão do peso seco do caule; RPR, razão do peso da raiz;
 467 RPA, razão do peso seco da parte aérea; CMP, comprimento da planta; DMC, diâmetro do
 468 caule.

469

470 **Discussão**

471 As sementes de *J. curcas*, por serem classificadas como ortodoxas [24], resistentes a
472 dessecação, muitas vezes podem apresentar teores de água de até 18% [5], quando recém
473 colhidas. Moncaleano-Escandon [21], mostrou que as sementes de *J. curcas* podem reduzir
474 drasticamente sua germinabilidade durante a estocagem em temperaturas de 4°C ou 25°C,
475 acompanhado da redução de alguns compostos como amido e proteínas solúveis totais. Este
476 autor demonstrou também que à temperatura de 4°C era mais interessante para a estocagem das
477 sementes dessa espécie. Neste trabalho, foi observado que a redução da umidade relativa no
478 interstício das sementes com o uso de material dessecante reduziu o teor de água das sementes
479 e diminuiu o potencial hídrico, auxiliando na manutenção da germinabilidade das sementes
480 durante a estocagem sem redução significativa. Em relação às características fisiológicas, pode
481 se observar redução na concentração de proteínas solúveis totais e em aminoácidos solúveis
482 totais, provavelmente para fornecer energia para o embrião, que se manteve viável durante o
483 período de estocagem. Igualmente ao descrito anteriormente, o teor de carboidratos solúveis
484 totais deve ter sido reduzido por meio da metabolização da sacarose, a qual atuou como fonte
485 de carbono para o embrião. Uma evidência circunstancial dessa ideia se baseia na elevação dos
486 teores de glicose e frutose ao mesmo tempo que houve uma redução nos níveis de amido e
487 sacarose. Entretanto, mesmo nestas condições, as sementes mantiveram-se viáveis, com níveis
488 expressivos de respiração, o que permitiu a viabilidade do embrião às custas da solubilização
489 de reservas. Tal hipótese pode ser corroborada pela forte correlação negativa entre os teores de
490 óleo, amido e sacarose com os produtos da sua degradação (*i.e.*, proteínas solúveis totais,
491 aminoácidos solúveis totais e glicose). Algumas destas respostas são distintas das que foram
492 previamente descritas para a espécie [21]. Cumpre ressaltar que no trabalho de Moncaleano-
493 Escandon [21] não houve alteração da umidade no interstício das sementes, fato que foi levado
494 em consideração neste trabalho. Ademais, foi reportado, que sementes contendo entre 6% e 8%
495 de umidade, apresentaram rápida redução no teor de óleo das sementes nos primeiros 3 meses
496 de estocagem, aliado ao aumento na concentração de ácidos graxos livres [50,51] os quais são
497 parâmetros de suma importância nesta cultura. Desse modo, verifica-se que o controle da
498 umidade no interstício das sementes deva ser levado em conta para conservar tanto a viabilidade
499 como o conteúdo de óleo das sementes de *J. curcas*.

500 Os efeitos negativos do estresse salino foram refletidos no retardo no período de germinação,
501 de 3 dias no controle e até 13 dias em 150 mM de NaCl na água de irrigação, o qual é confirmado
502 pela redução significativa na porcentagem de germinação e tempo médio de germinação [17].
503 Independentemente do tempo de estocagem, a germinação foi iniciada entre o terceiro e quinto
504 dia, com completa finalização após 23 dias da semeadura, fato que ocorreu principalmente com

505 12 meses de estocagem. Tanto a salinidade quanto a estocagem atrasaram a germinação; mas
506 entre estes, a estocagem parecer ser o fator que desacelera a germinabilidade com maior
507 magnitude. Observou-se que a sincronia da germinação foi reduzida com o aumento da
508 concentração dos sais, sendo que o estresse pela salinidade promove lenta e mais desorganizada
509 germinação, fato corroborado pelos altos valores de incerteza da germinação. Assim, verifica-
510 se que a sincronia e a incerteza da germinação das sementes não podem ser consideradas bons
511 parâmetros para julgamento, pelo menos em *J. curcas*. Uma possível explicação para isso
512 poderia advir do fato de que *J. curcas* ainda não é uma espécie domesticada [52], o que faz ela
513 apresentar elevados índices de incerteza na germinação [53]; um fator altamente atrelado a
514 sobrevivência da espécie no seu habitat de origem [54] e muito instável do ponto de vista
515 fisiológico.

516 O experimento de salinidade revela que *J. curcas* pode tolerar até 150 mM de NaCl na água de
517 irrigação para a germinação das sementes, embora tenha dificuldades para o desenvolvimento
518 das plântulas em concentrações acima de 75 mM de NaCl, ocorrendo uma redução no acúmulo
519 de biomassa, fato que pode, inclusive, levar a morte da planta. Uma possível explicação para
520 isso é apresentada por Alencar [17] como um incremento do conteúdo de Na⁺ e Cl⁻ nos eixos
521 embrionários e no endosperma das sementes de *J. curcas*; ou pela perda da mobilização das
522 reservas dos cotilédones na germinação [55] que afeta o estabelecimento das plântulas [56]. O
523 retardo da germinação acompanhado com a diminuição do desenvolvimento das folhas e a
524 redução do crescimento da raiz promove atraso da fase autotrófica das plantas que, em casos
525 extremos, leva a morte da mesma. Mesmo que a germinação cumulativa seja diferente para os
526 distintos genótipos, pode-se observar uma tendência marcante entre a salinidade e a redução na
527 germinação e o acúmulo de biomassa. Dentre os parâmetros de alocação de biomassa, a RPC
528 mostrou forte incremento com a salinidade. É comum que plantas aumentem sua biomassa do
529 caule em detrimento de outros órgãos quando submetidas a salinidade [57–59]. Munns [58]
530 descreve isso como um efeito indireto da diminuição da captação de água pelas raízes e menor
531 expansão foliar, enquanto Praxedes [59] descreve esse efeito como menor taxa de crescimento
532 relativo da planta como um todo. Por outro lado, Bayuelo-Jiménez [60] e Debez [61] descrevem
533 que todos os componentes biométricos são reduzidos em plantas submetidas à salinidade, seja
534 esta uma espécie sensível a salinidade [60] ou uma halófita [61]. Ademais, Hasewaga [62],
535 atribui essa redução e/ou inibição do crescimento das plantas, quando submetidas a salinidade,
536 a diversos fatores tais como mudança no status de água na planta causada pelo efeito osmótico
537 dos sais, incremento na concentração de íons tóxicos, produzindo variações fisiológicas e
538 bioquímicas e alteração na absorção de nutrientes essenciais. A análise de componentes
539 principais mostrou que os parâmetros biométricos explicam melhor a resposta à salinidade do

540 que os parâmetros de germinação. Sendo os genótipos 114, 171 e 183 possíveis candidatos a
541 tolerância ao estresse por sais, enquanto os genótipos 133 e 218 apresentam sensibilidade a
542 adição de NaCl na água de irrigação.

543

544 **Conclusões**

545 A viabilidade da germinação e o conteúdo de óleo nas sementes de *Jatropha curcas* pode ser
546 mantida, desde que exista controle da umidade no interstício da semente durante a estocagem.

547 A salinidade afeta fortemente a germinação e desenvolvimento inicial de *Jatropha curcas* L.,
548 sendo que dos genótipos avaliados, o 114, 171 e 183 apresentam-se como possíveis candidatos
549 a futuros programas de melhoramento.

550

551 **Agradecimentos**

552 Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
553 (Processo CNPq nº 404357/2013-0) pelo apoio financeiro. O primeiro autor agradece a
554 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.
555 À Mariana Lins de Oliveira Campos pela ajuda no fortalecimento dos dados deste artigo para
556 futura parceria em publicação

557

558 **Referências**

559

- 560 [1] Y. Takeda, Development study on *Jatropha curcas* (sabu dum) oil as a substitute for
561 diesel engine oil in Thailand., J. Agric. Assoc. China. (1982) 1–8. doi:19830313879.
- 562 [2] J. Heller, Physic nut, *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and the use of
563 underutilized and neglected crops., Bioversity international, Roma, 1996.
- 564 [3] M.F. Pompelli, A. De Jesús, J. Orozco, M.T. De Oliviera, B. Rafael, M. Rodrigues, M.O.
565 Barbosa, M.G. Santos, Crise energética mundial e o papel do Brasil na problemática de
566 biocombustíveis., Agron. Colomb. 29 (2011) 361–371.
- 567 [4] V.C. Pandey, K. Singh, J.S. Singh, A. Kumar, B. Singh, R.P. Singh, *Jatropha curcas*: A
568 potential biofuel plant for sustainable environmental development, Renew. Sustain.
569 Energy Rev. 16 (2012) 2870–2883. doi:10.1016/j.rser.2012.02.004.
- 570 [5] M.F. Pompelli, D.T. da R.G. Ferreira, P.G. da S. Cavalcante, T. de L. Salvador, B. Shiue
571 de Hsie, L. Endres, Environmental influence on the physico-chemical and physiological
572 properties of *Jatropha curcas* seeds, Aust. J. Bot. 58 (2010) 421. doi:10.1071/BT10102.

573

574

- 575 [6] A. Fini, C. Bellasio, S. Pollastri, M. Tattini, F. Ferrini, Water relations, growth, and leaf
576 gas exchange as affected by water stress in *Jatropha curcas*, *J. Arid Environ.* 89 (2013)
577 21–29. doi:10.1016/j.jaridenv.2012.10.009.
- 578 [7] J. Ogunwole, D. Chaudhary, A. Ghosh, C.K. Daudu, J. Chikara, J.S. Patolia, Contribution
579 of *Jatropha curcas* to soil quality improvement in a degraded Indian entisol, *Acta Agric.*
580 *Scand. Sect. B - Plant Soil Sci.* 58 (2008) 245–251. doi:10.1080/09064710701628925.
- 581 [8] B.N. Divakara, H.D. Upadhyaya, S.P. Wani, C.L.L. Gowda, Biology and genetic
582 improvement of *Jatropha curcas* L.: A review, *Appl. Energy.* 87 (2010) 732–742.
583 doi:10.1016/j.apenergy.2009.07.013.
- 584 [9] S. Gao, C. Ouyang, S. Wang, Y. Xu, L. Tang, F. Chen, Effects of salt stress on growth,
585 antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L.
586 seedlings, *Plant Soil Env.* 54 (2008) 374–381.
- 587 [10] A. Günster, Seed bank dynamics — longevity, viability and predation of seeds of
588 serotinous plants in the central Namib Desert, *J. Arid Environ.* 28 (1994) 195–205.
589 doi:10.1016/S0140-1963(05)80057-6.
- 590 [11] J.D. Bewley, K.J. Bradford, H.W.M. Hilhorst, H. Nonogaki, Mobilization of Stored
591 Reserves, in: *Seeds*, Springer New York, New York, NY, 2013: pp. 183–246.
592 doi:10.1007/978-1-4614-4693-4_5.
- 593 [12] L. Sanchez-Linares, M. Gavilanes-Ruiz, D. Diaz-Pontones, F. Guzman-Chavez, V.
594 Calzada-Alejo, V. Zurita-Villegas, V. Luna-Loaiza, R. Moreno-Sanchez, I. Bernal-Lugo,
595 S. Sanchez-Nieto, Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize
596 germination, *J. Exp. Bot.* 63 (2012) 4513–4526. doi:10.1093/jxb/ers130.
- 597 [13] M. Almansouri, J. Kinet, S. Lutts, Effect of salt and osmotic stresses on germination in
598 durum wheat (*Triticum durum* Desf.), *Plant Soil.* 231 (2001) 243–254.
599 doi:10.1023/A:1010378409663.
- 600 [14] T.W. HEGARTY, Seed and Seedling Susceptibility to Phased Moisture Stress in Soil, *J.*
601 *Exp. Bot.* 28 (1977) 659–668. doi:10.1093/jxb/28.3.659.
- 602 [15] M.P. Apse, Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiport
603 in *Arabidopsis*, *Science* (80). 285 (1999) 1256–1258.
604 doi:10.1126/science.285.5431.1256.
- 605 [16] A. Bouaziz, D.R. Hicks, Consumption of wheat seed reserves during germination and
606 early growth as affected by soil water potential, *Plant Soil.* 128 (1990) 161–165.
607 doi:10.1007/BF00011105.
- 608
- 609

- 610 [17] N.L.M. Alencar, C.G. Gadelha, M.I. Gallão, M.A.H. Dolder, J.T. Prisco, E. Gomes-
611 Filho, Ultrastructural and biochemical changes induced by salt stress in *Jatropha curcas*
612 seeds during germination and seedling development, *Funct. Plant Biol.* 42 (2015) 865.
613 doi:10.1071/FP15019.
- 614 [18] I.A. Ungar, Seed germination and seed-bank ecology in halophytes, *Seed Dev.*
615 *Germination.* (1995) 599–628.
- 616 [19] J. Marcos-Filho, New approaches to seed vigor testing, *Sci. Agric.* 55 (1998) 27–33.
617 doi:10.1590/S0103-90161998000500005.
- 618 [20] J.M. Filho, H. Pescarin, Y. Komatsu, Testes para avaliação do vigor de sementes de soja
619 e suas relações com a emergência das plântulas em campo, *Pesqui. Agropecuária Bras.*
620 19 (1984).
- 621 [21] J. Moncaleano-Escandon, B.C.F. Silva, S.R.S. Silva, J.A.A. Granja, M.C.J.L. Alves,
622 M.F. Pompelli, Germination responses of *Jatropha curcas* L. seeds to storage and aging,
623 *Ind. Crops Prod.* 44 (2013) 684–690. doi:10.1016/j.indcrop.2012.08.035.
- 624 [22] D.M. TeKrony, *Seeds*, *Crop Sci.* 46 (2006) 2263. doi:10.2135/cropsci2005.12.0445.
- 625 [23] D.A.C. Bilia, A.L. Fancelli, J.M. Filho, J. Marcos Filho, J.A. Machado, Comportamento
626 de sementes de milho híbrido durante o armazenamento sob condições variáveis de
627 temperatura e umidade relativa do ar, *Sci. Agric.* 51 (1994) 153–157.
- 628 [24] F.R. Hay, R.J. Probert, Advances in seed conservation of wild plant species: a review of
629 recent research, *Conserv. Physiol.* 1 (2013) 1–11. doi:10.1093/conphys/cot030.
- 630 [25] R.G.S. Rao, P.M. Singh, M. Rai, Storability of onion seeds and effects of packaging and
631 storage conditions on viability and vigour, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 110 (2006) 1–6.
632 doi:10.1016/j.scienta.2006.06.002.
- 633 [26] F.R. Hay, P. Thavong, P. Taridno, S. Timple, Evaluation of zeolite seed “Drying
634 Beads®” for drying rice seeds to low moisture content prior to long-term storage, *Seed*
635 *Sci. Technol.* 40 (2012) 374–395. doi:10.15258/sst.2012.40.3.09.
- 636 [27] N. Kumar, S. Pamidimarri, M. Kaur, G. Boricha, M. Reddy, Effects of NaCl on growth,
637 ion accumulation, protein, proline contents and antioxidant enzymes activity in callus
638 cultures of *Jatropha curcas*, *Biologia (Bratisl)*. 63 (2008). doi:10.2478/s11756-008-
639 0054-7.
- 640 [28] J. Sun, S. Chen, S. Dai, R. Wang, N. Li, X. Shen, X. Zhou, C. Lu, X. Zheng, Z. Hu, Z.
641 Zhang, J. Song, Y. Xu, NaCl-Induced Alternations of Cellular and Tissue Ion Fluxes in
642 Roots of Salt-Resistant and Salt-Sensitive Poplar Species, *PLANT Physiol.* 149 (2008)
643 1141–1153. doi:10.1104/pp.108.129494.
- 644

- 645 [29] R. Munns, M. Tester, Mechanisms of Salinity Tolerance, *Annu. Rev. Plant Biol.* 59
646 (2008) 651–681. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911.
- 647 [30] M. Khajeh-Hosseini, A.A.A. Powell, I.J. Bingham, The interaction between salinity
648 stress and seed vigour during germination of soyabean seeds, *Seed Sci. Technol.* 31
649 (2003) 715–725. doi:10.15258/sst.2003.31.3.20.
- 650 [31] M.A. Khan, S. Gulzar, Light, salinity, and temperature effects on the seed germination
651 of perennial grasses, *Am. J. Bot.* 90 (2003) 131–134. doi:10.3732/ajb.90.1.131.
- 652 [32] L. Díaz-López, V. Gimeno, V. Lidón, I. Simón, V. Martínez, F. García-Sánchez, The
653 tolerance of *Jatropha curcas* seedlings to NaCl: An ecophysiological analysis, *Plant*
654 *Physiol. Biochem.* 54 (2012) 34–42. doi:10.1016/j.plaphy.2012.02.005.
- 655 [33] M.F. Pompelli, R. Barata-Luís, H.S. Vitorino, E.R. Gonçalves, E. V. Rolim, M.G.
656 Santos, J.S. Almeida-Cortez, V.M. Ferreira, E.E. Lemos, L. Endres, Photosynthesis,
657 photoprotection and antioxidant activity of purging nut under drought deficit and
658 recovery, *Biomass and Bioenergy.* 34 (2010) 1207–1215.
659 doi:10.1016/j.biombioe.2010.03.011.
- 660 [34] A.M. Rajaona, H. Brueck, C. Seckinger, F. Asch, Effect of salinity on canopy water
661 vapor conductance of young and 3-year old *Jatropha curcas* L., *J. Arid Environ.* 87
662 (2012) 35–41. doi:10.1016/j.jaridenv.2012.06.014.
- 663 [35] A.Z. Elhag, M.O. Gafar, Effect of Sodium Chloride on Growth of *Jatropha* (*Jatropha*
664 *curcas* L .) Young Transplants, *Univers. J. Plant Sci.* 2 (2014) 19–22.
665 doi:10.13189/ujps.2014.020103.
- 666 [36] R.N. Trethewey, P. Geigenberger, K. Riedel, M.-R. Hajirezaei, U. Sonnewald, M. Stitt,
667 J.W. Riesmeier, L. Willmitzer, Combined expression of glucokinase and invertase in
668 potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of
669 glycolysis, *Plant J.* 15 (1998) 109–118. doi:10.1046/j.1365-313X.1998.00190.x.
- 670 [37] P. Armengaud, R. Sulpice, A.J. Miller, M. Stitt, A. Amtmann, Y. Gibon, Multilevel
671 analysis of primary metabolism provides new insights into the role of potassium nutrition
672 for glycolysis and nitrogen assimilation in *Arabidopsis* roots., *Plant Physiol.* 150 (2009)
673 772–85. doi:10.1104/pp.108.133629.
- 674 [38] M. DuBois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Colorimetric Method for
675 Determination of Sugars and Related Substances, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–356.
676 doi:10.1021/ac60111a017.
- 677 [39] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
678 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72
679 (1976) 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.

- 680 [40] S. Moore, W. Stein, A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of
681 amino acids and related compounds., J. Biol. Chem. 211 (1954) 907–913.
- 682 [41] M.U. Ahmad, S.K. Husain, S.M. Osman, Ricinoleic acid in *Phyllanthus niruri* seed oil, J.
683 Am. Oil Chem. Soc. 58 (1981) 673–674. doi:10.1007/BF02899445.
- 684
- 685 [42] M. Stitt, R.M. Lilley, R. Gerhardt, H.W. Heldt, Metabolite levels in specific cells and
686 subcellular compartments of plant leaves, in: Methods Enzymol., 1989: pp. 518–552.
687 doi:10.1016/0076-6879(89)74035-0.
- 688 [43] C.W. Vertucci, Predicting the optimum storage conditions for seeds using
689 thermodynamic principles, J. Seed Technol. 17 (1993).
- 690 [44] E. Epstein, Mineral nutrition of plants: principles and perspectives., 1972.
- 691 [45] M.F. Pompelli, W.C. Antunes, D.T.R.G. Ferreira, P.G.S. Cavalcante, H.C.L. Wanderley-
692 Filho, L. Endres, Allometric models for non-destructive leaf area estimation of *Jatropha*
693 *curcas*, Biomass and Bioenergy. 36 (2012) 77–85. doi:10.1016/j.biombioe.2011.10.010.
- 694 [46] R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, (2016).
- 695 [47] F. De Mendiburu, agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research, R CRAN.
696 (2016). <http://cran.r-project.org/package=agricolae>.
- 697 [48] T. Wei, M.T. Wei, Package “corrplot,” Statistician. 56 (2016) 316–324.
- 698 [49] S. Lê, J. Josse, F. Husson, FactoMineR: an R package for multivariate analysis, J. Stat.
699 Softw. 25 (2008) 1–18.
- 700 [50] J. Akowuah, A. Addo, F. Kemausuor, Influence of storage duration of *Jatropha curcas*
701 seed on oil yield and free fatty acid content, ARPN J. Agric. Biol. Sci. 7 (2012) 41–45.
- 702 [51] R.L. Worang, O.S. Dharmaputra, R. Syarief, Miftahuddin, The quality of physic nut
703 (*Jatropha curcas* L.) seeds packed in plastic material during storage., BIOTROPIA -
704 Southeast Asian J. Trop. Biol. 15 (2008) 25–36. doi:10.11598/BTB.2008.15.1.3.
- 705 [52] M.B. Achten W.M.J, Nielsen L.R., Aerts R., Lengkeek A.G., Kjaer E.D., Trabucco A.,
706 Hansen J.K., Maes W.H., Graudal L., Akinnifesi F.K., Towards domestication of
707 *Jatropha curcas*, Biofuels. 1 (2010) 91–107. doi:10.4155/bfs.09.4.
- 708 [53] D. SANTANA, M. RANAL, Análise estatística na germinação. Brasília, Brasília, 2004.
- 709 [54] W. Maes, A. Trabucco, W. Achten, B. Muys, Climatic growing conditions of *Jatropha*
710 *curcas* L., Biomass and Bioenergy. 33 (2009) 1481–1485.
711 doi:10.1016/j.biombioe.2009.06.001.
- 712 [55] J. Liu, W.Q. Guo, D.C. Shi, Seed germination , seedling survival , and physiological
713 response of sunflowers under saline and alkaline conditions, Photosynthetica. 48 (2010)
714 278–286. doi:10.1007/s11099-010-0034-3.

- 715 [56] E.C. Marques, P.A.F. de Freitas, N.L.M. Alencar, J.T. Prisco, E. Gomes-Filho, Increased
716 Na⁺ and Cl⁻ accumulation induced by NaCl salinity inhibits cotyledonary reserve
717 mobilization and alters the source-sink relationship in establishing dwarf cashew
718 seedlings, *Acta Physiol. Plant.* 35 (2013) 2171–2182. doi:10.1007/s11738-013-1254-5.
- 719 [57] B.F. Dantas, L. de S. Ribeiro, C.A. Aragão, Germination, initial growth and cotyledon
720 protein content of bean cultivars under salinity stress, *Rev. Bras. Sementes.* 29 (2007)
721 106–110. doi:10.1590/S0101-31222007000200014.
- 722 [58] R. Munns, A. Termaat, R. Munns, A. Termaat, Whole-Plant Responses to Salinity, *Aust.*
723 *J. Plant Physiol.* 13 (1986) 143. doi:10.1071/PP9860143.
- 724 [59] S.C. Praxedes, C.F. De Lacerda, F.M. DaMatta, J.T. Prisco, E. Gomes-Filho, Salt
725 Tolerance is Associated with Differences in Ion Accumulation, Biomass Allocation and
726 Photosynthesis in Cowpea Cultivars, *J. Agron. Crop Sci.* 196 (2009) 193–204.
727 doi:10.1111/j.1439-037X.2009.00412.x.
- 728 [60] J.S. Bayuelo-Jiménez, R. Craig, J.P. Lynch, Salinity Tolerance of Species during
729 Germination and Early Seedling Growth, *Crop Sci.* 42 (2002) 1584.
730 doi:10.2135/cropsci2002.1584.
- 731 [61] A. Debez, K. Ben Hamed, C. Grignon, C. Abdelly, Salinity effects on germination,
732 growth, and seed production of the halophyte *Cakile maritima*, *Plant Soil.* 262 (2004)
733 179–189. doi:10.1023/B:PLSO.0000037034.47247.67.
- 734 [62] P.M. Hasegawa, R.A. Bressan, J.-K. Zhu, H.J. Bohnert, Plant cellular and molecular
735 responses to high salinity, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51 (2000) 463–
736 499. doi:10.1146/annurev.arplant.51.1.463.
- 737

ANEXOS

Normas da revista PLOS ONE

Style and Format

File format

Length
Font
Headings
Layout
Page and line numbers
Footnotes
Language
Abbreviations
Reference style
Equations
Nomenclature

Manuscript Organization

Parts of a Submission

Additional Information Requested at Submission

Guidelines for Specific Study Types

Feedback

Submission Guidelines

 Read the Chinese translation of the PLOS policies referred to in this page. PLOS编辑与出版规定

Style and Format

File format	Manuscript files can be in the following formats: DOC, DOCX, RTF, or PDF. Microsoft Word documents should not be locked or protected. LaTeX manuscripts must be submitted as PDFs. Read the LaTeX guidelines.
Length	Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information. We encourage you to present and discuss your findings concisely.
Font	Use a standard font size and any standard font, except for Symbol font.
Headings	Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.
Layout	Manuscript text should be double-spaced. Do not format text in multiple columns.
Page and line numbers	Include page numbers and line numbers in the manuscript file.
Footnotes	Footnotes are not permitted. If your manuscript contains footnotes, move the information into the main text or the reference list, depending on the content.
Language	Manuscripts must be submitted in English. You may submit translations of the manuscript or abstract as supporting information. Read the supporting information guidelines.
Abbreviations	Define abbreviations upon first appearance in the text. Do not use non-standard abbreviations unless they appear at least three times in the text. Keep abbreviations to a minimum.
Reference style	PLOS uses "Vancouver" style, as outlined in the ICMJE sample references. See reference formatting examples and additional instructions below.
Equations	We recommend using MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome. If this is not possible, Equation Editor is acceptable. Avoid using MathType or Equation Editor to insert single variables (e.g., "a ² + b ² = c ² "), Greek or other symbols (e.g., β, Δ, or ' [prime]), or mathematical operators (e.g., x, ≥, or ±) in running text. Wherever possible, insert single symbols as normal text with the correct Unicode (hex) values. Do not use MathType or Equation Editor for only a portion of an equation. Rather, ensure that the entire equation is included. Avoid "hybrid" inline or display equations, in which part is text and part is MathType, or part is MathType and part is Equation Editor.

Use correct and established nomenclature wherever possible.

21 min to Spread

Nomenclature

<i>Units of measurement</i>	Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value. Read more about SI units.
<i>Drugs</i>	Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN).
<i>Species names</i>	Write in italics (e.g., <i>Homo sapiens</i>). Write out in full the genus and species, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper. After first mention, the first letter of the genus name followed by the full species name may be used (e.g., <i>H. sapiens</i>).
<i>Genes, mutations, genotypes, and alleles</i>	Write in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database (e.g., HUGO for human genes). It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman typeface (e.g., v-fes, c-MYC).

Copyediting manuscripts

Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author, and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like "scientific editing service" or "manuscript editing service."

Submissions are not copyedited before publication.

Submissions that do not meet the *PLOS ONE* publication criterion for language standards may be rejected.

Manuscript Organization

Manuscripts should be organized as follows. Instructions for each element appear below the list.

Beginning section

The following elements are required, in order:

- > Title page: List title, authors, and affiliations as first page of manuscript
- > Abstract
- > Introduction

Middle section

The following elements can be renamed as needed and presented in any order:

- > Materials and Methods
- > Results
- > Discussion
- > Conclusions (optional)

Ending section

The following elements are required, in order:

- > Acknowledgments
- > References
- > Supporting information captions (if applicable)

Other elements

- > Figure captions are inserted immediately after the first paragraph in which the figure is cited. Figure files are uploaded separately.
- > Tables are inserted immediately after the first paragraph in which they are cited.
- > Supporting information files are uploaded separately.

i Please refer to our downloadable sample files to make sure that your submission meets our formatting requirements:

- › Download sample title, author list, and affiliations page (PDF)
- › Download sample manuscript body (PDF)

Viewing Figures and Supporting Information in the compiled submission PDF

The compiled submission PDF includes low-resolution preview images of the figures after the reference list. The function of these previews is to allow you to download the entire submission as quickly as possible. Click the link at the top of each preview page to download a high-resolution version of each figure. Links to download Supporting Information files are also available after the reference list.

Parts of a Submission

Title

Include a full title and a short title for the manuscript.

Title	Length	Guidelines	Examples
Full title	250 characters	Specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the field	Impact of cigarette smoke exposure on innate immunity: A <i>Caenorhabditis elegans</i> model Solar drinking water disinfection (SODIS) to reduce childhood diarrhoea in rural Bolivia: A cluster-randomized, controlled trial
Short title	100 characters	State the topic of the study	Cigarette smoke exposure and innate immunity SODIS and childhood diarrhoea

Titles should be written in sentence case (only the first word of the text, proper nouns, and genus names are capitalized). Avoid specialist abbreviations if possible. For clinical trials, systematic reviews, or meta-analyses, the subtitle should include the study design.

Author List

i Authorship requirements

All authors must meet the criteria for authorship as outlined in the authorship policy. Read the policy. Those who contributed to the work but do not meet the criteria for authorship can be mentioned in the Acknowledgments. Read more about Acknowledgments.

The corresponding author must provide an ORCID iD at the time of submission by entering it in the user profile in the submission system. Read more about ORCID.

Author names and affiliations

Enter author names on the title page of the manuscript and in the online submission system.

On the title page, write author names in the following order:

- › First name (or initials, if used)
- › Middle name (or initials, if used)
- › Last name (surname, family name)

Each author on the list must have an affiliation. The affiliation includes department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country.

If an author has multiple affiliations, enter all affiliations on the title page only. In the submission system, enter only the preferred or primary affiliation.

! Author names will be published exactly as they appear in the manuscript file. Please double-check the information carefully to make sure it is correct.

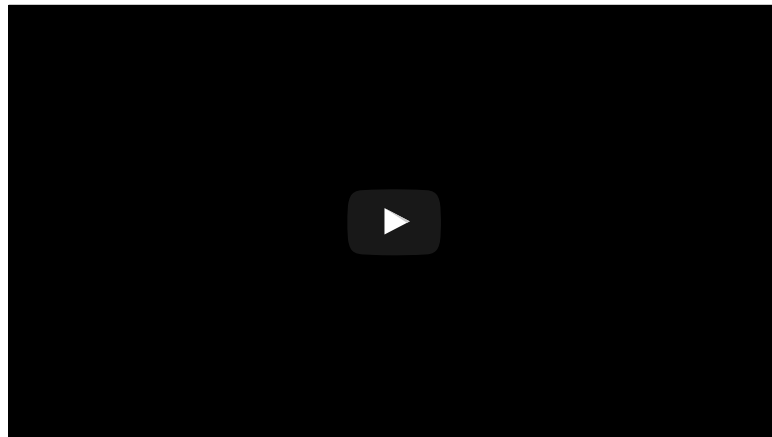
Corresponding author

The submitting author is automatically designated as the corresponding author in the submission system. The corresponding author is the primary contact for the journal office and the only author able to view or change the manuscript while it is under editorial consideration.

The corresponding author role may be transferred to another coauthor. However, note that transferring the corresponding author role also transfers access to the manuscript. (To designate a new corresponding author while the manuscript is still under consideration, watch the video tutorial below.)

Only one corresponding author can be designated in the submission system, but this does not restrict the number of corresponding authors that may be listed on the article in the event of publication. Whoever is designated as a corresponding author on the title page of the manuscript file will be listed as such upon publication. Include an email address for each corresponding author listed on the title page of the manuscript.

▶ How to select a new corresponding author in Editorial Manager



Consortia and group authorship

If a manuscript is submitted on behalf of a consortium or group, include the consortium or group name in the author list, and include the full list of members in the Acknowledgments or in a supporting information file. Read the group authorship policy.

Author Contributions

Enter all author contributions in the submission system during submission. The contributions of all authors must be described using the CRediT Taxonomy of author roles. Read the policy.

Contributions will be published with the final article, and they should accurately reflect contributions to the work. The submitting author is responsible for completing this information at submission, and it is expected that all authors will have reviewed, discussed, and agreed to their individual contributions ahead of this time.

PLOS ONE will contact all authors by email at submission to ensure that they are aware of the submission.

Cover letter

Upload a cover letter as a separate file in the online system. The length limit is 1 page.

The cover letter should include the following information:

- › Summarize the study's contribution to the scientific literature
- › Relate the study to previously published work
- › Specify the type of article (for example, research article, systematic review, meta-analysis, clinical trial)
- › Describe any prior interactions with PLOS regarding the submitted manuscript
- › Suggest appropriate Academic Editors to handle your manuscript (see the full list of Academic Editors)

- › List any opposed reviewers

! **IMPORTANT:** Do not include requests to reduce or waive publication fees in the cover letter. This information will be entered separately in the online submission system.

Read about publication fee assistance.

Title page

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

i Download sample title, author list, and affiliations page (PDF)

Abstract

The Abstract comes after the title page in the manuscript file. The abstract text is also entered in a separate field in the submission system.

The Abstract should:

- › Describe the main objective(s) of the study
- › Explain how the study was done, including any model organisms used, without methodological detail
- › Summarize the most important results and their significance
- › Not exceed 300 words

Abstracts should not include:

- › Citations
- › Abbreviations, if possible

Introduction

The introduction should:

- › Provide background that puts the manuscript into context and allows readers outside the field to understand the purpose and significance of the study
- › Define the problem addressed and why it is important
- › Include a brief review of the key literature
- › Note any relevant controversies or disagreements in the field
- › Conclude with a brief statement of the overall aim of the work and a comment about whether that aim was achieved

Materials and Methods

The Materials and Methods section should provide enough detail to allow suitably skilled investigators to fully replicate your study. Specific information and/or protocols for new methods should be included in detail. If materials, methods, and protocols are well established, authors may cite articles where those protocols are described in detail, but the submission should include sufficient information to be understood independent of these references.

We encourage authors to submit detailed protocols for newer or less well-established methods as supporting information. Read the supporting information guidelines.

Human or animal subjects and/or tissue or field sampling

Methods sections describing research using human or animal subjects and/or tissue or field sampling must include required ethics statements. See the reporting guidelines for human research, clinical trials, animal research, and observational and field studies for more information.

Data

PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available without restriction, with rare exception.

Large data sets, including raw data, may be deposited in an appropriate public repository. See our list of recommended repositories.

For smaller data sets and certain data types, authors may provide their data within supporting information files accompanying the manuscript. Authors should take care to maximize the accessibility and reusability of the data by selecting a file format from which data can be efficiently extracted (for example, spreadsheets or flat files should be provided rather than PDFs when providing tabulated data).

For more information on how best to provide data, read our policy on data availability. PLOS does not accept references to “data not shown.”

Cell lines

Methods sections describing research using cell lines must state the origin of the cell lines used. See the reporting guidelines for cell line research for more information.

New taxon names

Methods sections of manuscripts adding new taxon names to the literature must follow the reporting guidelines below for a new zoological taxon, botanical taxon, or fungal taxon.

Results, Discussion, Conclusions

These sections may all be separate, or may be combined to create a mixed Results/Discussion section (commonly labeled “Results and Discussion”) or a mixed Discussion/Conclusions section (commonly labeled “Discussion”). These sections may be further divided into subsections, each with a concise subheading, as appropriate. These sections have no word limit, but the language should be clear and concise.

Together, these sections should describe the results of the experiments, the interpretation of these results, and the conclusions that can be drawn.

Authors should explain how the results relate to the hypothesis presented as the basis of the study and provide a succinct explanation of the implications of the findings, particularly in relation to previous related studies and potential future directions for research.

PLOS ONE editorial decisions do not rely on perceived significance or impact, so authors should avoid overstating their conclusions. See the *PLOS ONE* Criteria for Publication for more information.

Acknowledgments

Those who contributed to the work but do not meet our authorship criteria should be listed in the Acknowledgments with a description of the contribution.

Authors are responsible for ensuring that anyone named in the Acknowledgments agrees to be named.

! Do not include funding sources in the Acknowledgments or anywhere else in the manuscript file. Funding information should only be entered in the financial disclosure section of the submission system.

References

Any and all available works can be cited in the reference list. Acceptable sources include:

- › Published or accepted manuscripts
- › Manuscripts on preprint servers, if the manuscript is submitted to a journal and also publicly available as a preprint

Do not cite the following sources in the reference list:

- › Unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., “unpublished work,” “data not shown”). Instead, include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.
- › Personal communications (these should be supported by a letter from the relevant authors but not included in the reference list)

References are listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, cite the reference number in square brackets (e.g., “We used the techniques developed by our colleagues [19] to analyze the data”). PLOS uses the numbered citation (citation-sequence) method and first six authors, et al.

Do not include citations in abstracts or author summaries.

Make sure the parts of the manuscript are in the correct order *before* ordering the citations.

Formatting references

! Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial.

PLOS uses the reference style outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), also referred to as the "Vancouver" style. Example formats are listed below. Additional examples are in the ICMJE sample references.

A reference management tool, EndNote, offers a current style file that can assist you with the formatting of your references. If you have problems with any reference management program, please contact the source company's technical support.

Journal name abbreviations should be those found in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases.

Source	Format
Published articles	<p>Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, Sun B, et al. cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). <i>Genet Mol Res.</i> 2011;10: 1576-1588.</p> <p>Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, Negi VS. Susceptibility to SLE in South Indian Tamils may be influenced by genetic selection pressure on TLR2 and TLR9 genes. <i>Mol Immunol.</i> 2014 Nov 22. pii: S0161-5890(14)00313-7. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005</p> <p><i>Note: A DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers.</i></p>
Accepted, unpublished articles	Same as published articles, but substitute "Forthcoming" for page numbers or DOI.
Web sites or online articles	Huynen MMTE, Martens P, Hilderink HBM. The health impacts of globalisation: a conceptual framework. <i>Global Health.</i> 2005;1: 14. Available from: http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14 .
Books	Bates B. <i>Bargaining for life: A social history of tuberculosis.</i> 1st ed. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1992.
Book chapters	Hansen B. New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. <i>AIDS and the historian.</i> Bethesda: National Institutes of Health; 1991. pp. 21-28.
Deposited articles (preprints, e-prints, or arXiv)	Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreira DU, Alonso LG, Shub M, et al. Amino acid metabolism conflicts with protein diversity; 1991. Preprint. Available from: arXiv:1403.3301v1. Cited 17 March 2014.
Published media (print or online newspapers and magazine articles)	Fountain H. For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. <i>The New York Times.</i> 29 Jan 2014. Available from: http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html . Cited 17 March 2014.
New media (blogs, web sites, or other written works)	Allen L. Announcing PLOS Blogs. 2010 Sep 1 [cited 17 March 2014]. In: PLOS Blogs [Internet]. San Francisco: PLOS 2006 - . [about 2 screens]. Available from: http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/ .
Masters' theses or doctoral dissertations	Wells A. Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. 1999. Available from: http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09
Databases and repositories (Figshare, arXiv)	Roberts SB. QPX Genome Browser Feature Tracks; 2013 [cited 2013 Oct 5]. Database: figshare [Internet]. Available from: http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214 .
Multimedia (videos, movies, or TV shows)	Hitchcock A, producer and director. <i>Rear Window</i> [Film]; 1954. Los Angeles: MGM.

Supporting Information

Authors can submit essential supporting files and multimedia files along with their manuscripts. All supporting information will be subject to peer review. All file types can be submitted, but files must be smaller than 10 MB in size.

Authors may use almost any description as the item name for a supporting information file as long as it contains an “S” and number. For example, “S1 Appendix” and “S2 Appendix,” “S1 Table” and “S2 Table,” and so forth.

Supporting information files are published exactly as provided, and are not copyedited.

Supporting information captions

List supporting information captions at the end of the manuscript file. Do not submit captions in a separate file.


The file number and name are required in a caption, and we highly recommend including a one-line title as well. You may also include a legend in your caption, but it is not required.

Example caption

S1 Text. Title is strongly recommended. Legend is optional.

In-text citations

We recommend that you cite supporting information in the manuscript text, but this is not a requirement. If you cite supporting information in the text, citations do not need to be in numerical order.

 Read the supporting information guidelines for more details about submitting supporting information and multimedia files.

Figures and Tables

Figures

Do not include figures in the main manuscript file. Each figure must be prepared and submitted as an individual file.

Cite figures in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.

 Read the guidelines for figures.


Figure captions

Figure captions must be inserted in the text of the manuscript, immediately following the paragraph in which the figure is first cited (read order). Do not include captions as part of the figure files themselves or submit them in a separate document.

At a minimum, include the following in your figure captions:

- › A figure label with Arabic numerals, and “Figure” abbreviated to “Fig” (e.g. Fig 1, Fig 2, Fig 3, etc). Match the label of your figure with the name of the file uploaded at submission (e.g. a figure citation of “Fig 1” must refer to a figure file named “Fig1.tif”).
- › A concise, descriptive title

The caption may also include a legend as needed.


 Read more about figure captions.

Tables

Cite tables in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.


Place each table in your manuscript file directly after the paragraph in which it is first cited (read order). Do not submit your tables in separate files.

Tables require a label (e.g., “Table 1”) and brief descriptive title to be placed above the table. Place legends, footnotes, and other text below the table.


 Read the guidelines for tables.

Data reporting

All data and related metadata underlying the findings reported in a submitted manuscript should be deposited in an appropriate public repository, unless already provided as part of the submitted article.

 Read our policy on data availability.

Repositories may be either subject-specific (where these exist) and accept specific types of structured data, or generalist repositories that accept multiple data types. We recommend that authors select repositories appropriate to their field. Repositories may be subject-specific (e.g., GenBank for sequences and PDB for structures), general, or institutional, as long as DOIs or accession numbers are provided and the data are at least as open as CC BY. Authors are encouraged to select repositories that meet accepted criteria as trustworthy digital repositories, such as criteria of the Centre for Research Libraries or Data Seal of Approval. Large, international databases are more likely to persist than small, local ones.

 See our list of recommended repositories.

To support data sharing and author compliance of the PLOS data policy, we have integrated our submission process with a select set of data repositories. The list is neither representative nor exhaustive of the suitable repositories available to authors. Current repository integration partners include Dryad and FlowRepository. Please contact data@plos.org to make recommendations for further partnerships.

Instructions for PLOS submissions with data deposited in an integration partner repository:

- › Deposit data in the integrated repository of choice.
- › Once deposition is final and complete, the repository will provide you with a dataset DOI (provisional) and private URL for reviewers to gain access to the data.
- › Enter the given data DOI into the full Data Availability Statement, which is requested in the Additional Information section of the PLOS submission form. Then provide the URL passcode in the Attach Files section.

If you have any questions, please email us.

Accession numbers

All appropriate data sets, images, and information should be deposited in an appropriate public repository. See our list of recommended repositories.

Accession numbers (and version numbers, if appropriate) should be provided in the Data Availability Statement. Accession numbers or a citation to the DOI should also be provided when the data set is mentioned within the manuscript.

In some cases authors may not be able to obtain accession numbers of DOIs until the manuscript is accepted; in these cases, the authors must provide these numbers at acceptance. In all other cases, these numbers must be provided at submission.

Identifiers

As much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- › Ensembl
- › Entrez Gene
- › FlyBase
- › InterPro
- › Mouse Genome Database (MGD)
- › Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)
- › PubChem

Identifiers should be provided in parentheses after the entity on first use.


Striking image

You can choose to upload a “Striking Image” that we may use to represent your article online in places like the journal homepage or in search results.

The striking image must be derived from a figure or supporting information file from the submission, i.e., a cropped portion of an image or the entire image. Striking images should ideally be high resolution, eye-catching, single panel images, and should ideally avoid containing added details such as text, scale bars,

and arrows.

If no striking image is uploaded, we will designate a figure from the submission as the striking image.

 Striking images should not contain potentially identifying images of people. Read our policy on identifying information.

The PLOS licenses and copyright policy also applies to striking images.


Additional Information Requested at Submission

Funding statement

This information should not be in your manuscript file; you will provide it via our submission system.

This information will be published with the final manuscript, if accepted, so please make sure that this is accurate and as detailed as possible. You should not include this information in your manuscript file, but it is important to gather it prior to submission, because your financial disclosure statement cannot be changed after initial submission.


Your statement should include relevant grant numbers and the URL of any funder's web site. Please also state whether any individuals employed or contracted by the funders (other than the named authors) played any role in: study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. If so, please name the individual and describe their role.

 Read our policy on disclosure of funding sources.

Competing interests

This information should not be in your manuscript file; you will provide it via our submission system.

All potential competing interests must be declared in full. If the submission is related to any patents, patent applications, or products in development or for market, these details, including patent numbers and titles, must be disclosed in full.

 Read our policy on competing interests.

Manuscripts disputing published work

For manuscripts disputing previously published work, it is *PLOS ONE* policy to invite input from the disputed author during the peer review process. This procedure is aimed at ensuring a thorough, transparent, and productive review process.

If the disputed author chooses to submit a review, it must be returned in a timely fashion and contain a full declaration of all competing interests. The Academic Editor will consider any such reviews in light of the competing interest.

Authors submitting manuscripts disputing previous work should explain the relationship between the manuscripts in their cover letter, and will be required to confirm that they accept the conditions of this review policy before the manuscript is considered further.


Related manuscripts

Upon submission, authors must confirm that the manuscript, or any related manuscript, is not currently under consideration or accepted elsewhere. If related work has been submitted to *PLOS ONE* or elsewhere, authors must include a copy with the submitted article. Reviewers will be asked to comment on the overlap between related submissions.

We strongly discourage the unnecessary division of related work into separate manuscripts, and we will not consider manuscripts that are divided into "parts." Each submission to *PLOS ONE* must be written as an independent unit and should not rely on any work that has not already been accepted for publication. If related manuscripts are submitted to *PLOS ONE*, the authors may be advised to combine them into a single manuscript at the editor's discretion.

PLOS does support authors who wish to share their work early and receive feedback before formal peer review. Deposition of manuscripts with preprint servers does not impact consideration of the manuscript at any PLOS journal.

Authors choosing bioRxiv may now concurrently submit directly to select PLOS journals through bioRxiv's direct transfer to journal service.

 Read our policy on preprint servers.

Guidelines for Specific Study Types

Human subjects research

All research involving human participants must have been approved by the authors' Institutional Review Board (IRB) or by equivalent ethics committee(s), and must have been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Authors should be able to submit, upon request, a statement from the IRB or ethics committee indicating approval of the research. We reserve the right to reject work that we believe has not been conducted to a high ethical standard, even when formal approval has been obtained.

Subjects must have been properly instructed and have indicated that they consent to participate by signing the appropriate informed consent paperwork. Authors may be asked to submit a blank, sample copy of a subject consent form. If consent was verbal instead of written, or if consent could not be obtained, the authors must explain the reason in the manuscript, and the use of verbal consent or the lack of consent must have been approved by the IRB or ethics committee.

All efforts should be made to protect patient privacy and anonymity. Identifying information, including photos, should not be included in the manuscript unless the information is crucial and the individual has provided written consent by completing the Consent Form for Publication in a PLOS Journal (PDF). Download additional translations of the form from the Downloads and Translations page. More information about patient privacy, anonymity, and informed consent can be found in the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Privacy and Confidentiality guidelines.

Manuscripts should conform to the following reporting guidelines:

- › Studies of diagnostic accuracy: STARD
- › Observational studies: STROBE
- › Microarray experiments: MIAME
- › Other types of health-related research: Consult the EQUATOR web site for appropriate reporting guidelines

Methods sections of papers on research using human subjects or samples must include ethics statements that specify:

- › **The name of the approving institutional review board or equivalent committee(s).** If approval was not obtained, the authors must provide a detailed statement explaining why it was not needed
- › **Whether informed consent was written or oral.** If informed consent was oral, it must be stated in the manuscript:
 - › Why written consent could not be obtained
 - › That the Institutional Review Board (IRB) approved use of oral consent
 - › How oral consent was documented

For studies involving humans categorized by race/ethnicity, age, disease/disabilities, religion, sex/gender, sexual orientation, or other socially constructed groupings, authors should:

- › Explicitly describe their methods of categorizing human populations
- › Define categories in as much detail as the study protocol allows
- › Justify their choices of definitions and categories, including for example whether any rules of human categorization were required by their funding agency
- › Explain whether (and if so, how) they controlled for confounding variables such as socioeconomic status, nutrition, environmental exposures, or similar factors in their analysis

In addition, outmoded terms and potentially stigmatizing labels should be changed to more current, acceptable terminology. Examples: "Caucasian" should be changed to "white" or "of [Western] European descent" (as appropriate); "cancer victims" should be changed to "patients with cancer."

For papers that include identifying, or potentially identifying, information, authors must download the Consent Form for Publication in a PLOS Journal, which the individual, parent, or guardian must sign once they have read the paper and been informed about the terms of PLOS open-access license. The signed consent form should not be submitted with the manuscript, but authors should securely file it in the individual's case notes and the methods section of the manuscript should explicitly state that consent authorization for publication is on file, using wording like:

The individual in this manuscript has given written informed consent (as outlined in PLOS consent form) to publish these case details.

For more information about *PLOS ONE* policies regarding human subjects research, see the Publication Criteria and Editorial Policies.

Clinical trials

Clinical trials are subject to all policies regarding human research. *PLOS ONE* follows the World Health Organization's (WHO) definition of a clinical trial:

A clinical trial is any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes [...] Interventions include but are not restricted to drugs, cells and other biological products, surgical procedures, radiologic procedures, devices, behavioural treatments, process-of-care changes, preventive care, etc.

All clinical trials must be registered in one of the publicly-accessible registries approved by the WHO or ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors). Authors must provide the trial registration number. Prior disclosure of results on a clinical trial registry site will not affect consideration for publication. We reserve the right to inform authors' institutions or ethics committees, and to reject the manuscript, if we become aware of unregistered trials.

PLOS ONE supports prospective trial registration (i.e. before participant recruitment has begun) as recommended by the ICMJE's clinical trial registration policy. **Where trials were not publicly registered before participant recruitment began**, authors must:

- › Register all related clinical trials and confirm they have done so in the Methods section
- › Explain in the Methods the reason for failing to register before participant recruitment

Clinical trials must be reported according to the relevant reporting guidelines, i.e. CONSORT for randomized controlled trials, TREND for non-randomized trials, and other specialized guidelines as appropriate. The intervention should be described according to the requirements of the TIDieR checklist and guide. Submissions must also include the study protocol as supporting information, which will be published with the manuscript if accepted.

Authors of manuscripts describing the results of clinical trials must adhere to the CONSORT reporting guidelines appropriate to their trial design, available on the CONSORT Statement web site. Before the paper can enter peer review, authors must:

- › Provide the registry name and number in the methods section of the manuscript
- › Provide a copy of the trial protocol as approved by the ethics committee and a completed CONSORT checklist as supporting information (which will be published alongside the paper, if accepted). This should be named S1 CONSORT Checklist.
- › Include the CONSORT flow diagram as the manuscript's "Fig 1"

Any deviation from the trial protocol must be explained in the paper. Authors must explicitly discuss informed consent in their paper, and we reserve the right to ask for a copy of the patient consent form.

The methods section must include the name of the registry, the registry number, and the URL of your trial in the registry database for each location in which the trial is registered.

Animal research

We work in consultation with the *PLOS ONE* Animal Research Advisory Group to develop policies. Animal Research Advisory Group members may also be consulted on individual submissions.

All research involving vertebrates or cephalopods must have approval from the authors' Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) or equivalent ethics committee(s), and must have been conducted according to applicable national and international guidelines. Approval must be received prior to beginning research.

If we note differences between an IACUC-approved protocol and the methods reported in a submitted manuscript, we may report these discrepancies to the relevant institution or committee.

Methods sections of manuscripts reporting results of animal research must include required ethics statements that specify:

- › The full name of the relevant ethics committee that approved the work, and the associated permit number(s). Where ethical approval is not required, the manuscript should include a clear statement of this and the reason why.
- › Relevant details for efforts taken to ameliorate animal suffering

Example ethics statement

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Minnesota (Permit Number: 27-2956). All surgery was performed under sodium pentobarbital anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

The organism(s) studied should always be stated in the abstract. Where research may be confused as pertaining to clinical research, the animal model should also be stated in the title.

Where unregulated animals are used or ethics approval is not required, authors should make this clear in submitted articles and explain why ethical approval was not required. Relevant regulations that grant exemptions should be cited in full. It is the authors' responsibility to understand and comply with all relevant regulations.

We reserve the right to reject work that the editors believe has not been conducted to a high ethical standard, even if authors have obtained formal approval or approval is not required under local regulations.

We encourage authors to follow the Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments (ARRIVE) guidelines for all submissions describing laboratory-based animal research and to upload a completed ARRIVE Guidelines Checklist to be published as supporting information. Please note that inclusion of a completed ARRIVE Checklist may be a formal requirement for publication at a later date.

Non-human primates

Manuscripts describing research involving non-human primates must include details of animal welfare, including information about housing, feeding, and environmental enrichment, and steps taken to minimize suffering, including use of anesthesia and method of sacrifice if appropriate, in accordance with the recommendations of the Weatherall report, *The use of non-human primates in research* (PDF).

Random source animals

Manuscripts describing studies that use random source (e.g. Class B dealer-sourced in the USA), shelter, or stray animals will be subject to additional ethics consideration and may be rejected if sufficient ethical and scientific justification for the study design is lacking.

Humane endpoints

For studies in which death of a regulated animal (vertebrate, cephalopod) is a likely outcome or a planned experimental endpoint, *PLOS ONE* asks authors to report additional details related to the study design. This applies to research that involves, for instance, assessment of survival, toxicity, longevity, terminal disease, or high rates of incidental mortality. These studies may be subject to additional ethical considerations, and *PLOS ONE* may reject submissions if they lack sufficient reporting, appropriate justification for the study design, or adequate consideration of humane endpoints, regardless of study-specific institutional animal ethics committee approval.

Definition of a humane endpoint

A humane endpoint is an experimental endpoint at which animals are euthanized when they display early markers associated with death or poor prognosis of quality of life, or specific signs of severe suffering or distress. Humane endpoints are used as an alternative to allowing such conditions to continue or progress to death following the experimental intervention ("death as an endpoint"), or only euthanizing animals at the end of an experiment. Before a study begins, researchers define the practical observations or measurements that will be used during the study to recognize a humane endpoint, based on anticipated clinical, physiological, and behavioral signs. These may include, for instance, body temperature or weight changes, tumor size or appearance, abnormal behaviors, pathological changes, ruffled fur, reduced mobility, body posture, or expression of specific body fluid markers. Please see the NC3Rs guidelines for more information.

Authors of these studies should report all of the following information in the Methods section:

1. Describe whether humane endpoints were used for all animals involved in the study

If humane endpoints were used, report the following:

- The specific criteria used to determine when animals should be euthanized
- Once animals reached endpoint criteria, the amount of time elapsed before euthanasia
- Whether any animals died before meeting criteria for euthanasia

If humane endpoints were not used, report the following:

- A scientific and ethical justification for the study design, including the reasons why humane endpoints could not be used, and discussion of alternatives that were considered but could not be used
- Whether the institutional animal ethics committee specifically reviewed and approved the anticipated mortality in the study design

2. Include the following details of the study design and outcomes:

- The duration of the experiment
- The numbers of animals used, euthanized, and found dead (if any); the cause of death for all animals
- How frequently animal health and behavior were monitored
- All animal welfare considerations taken, including efforts to minimize suffering and distress, use of analgesics or anaesthetics, or special housing conditions
- Any special training in animal care or handling provided for research staff

Observational and field studies

Methods sections for submissions reporting on any type of field study must include ethics statements that specify:

- Permits and approvals obtained for the work, including the full name of the authority that approved the study; if none were required, authors should explain why
- Whether the land accessed is privately owned or protected
- Whether any protected species were sampled
- Full details of animal husbandry, experimentation, and care/welfare, where relevant

Paleontology and archaeology research

Manuscripts reporting paleontology and archaeology research must include descriptions of methods and specimens in sufficient detail to allow the work to be reproduced. Data sets supporting statistical and phylogenetic analyses should be provided, preferably in a format that allows easy re-use.

Specimen numbers and complete repository information, including museum name and geographic location, are required for publication. Locality information should be provided in the manuscript as legally allowable, or a statement should be included giving details of the availability of such information to qualified researchers.

If permits were required for any aspect of the work, details should be given of all permits that were obtained, including the full name of the issuing authority. This should be accompanied by the following statement:

All necessary permits were obtained for the described study, which complied with all relevant regulations.

If no permits were required, please include the following statement:

No permits were required for the described study, which complied with all relevant regulations.

Manuscripts describing paleontology and archaeology research are subject to the following policies:

- **Sharing of data and materials.** Any specimen that is erected as a new species, described, or figured must be deposited in an accessible, permanent repository (i.e., public museum or similar institution). If study conclusions depend on specimens that do not fit these criteria, the article will be rejected under *PLOS ONE*'s data availability criterion.
- **Ethics.** *PLOS ONE* will not publish research on specimens that were obtained without necessary permission or were illegally exported

Systematic reviews and meta-analyses

A systematic review paper, as defined by The Cochrane Collaboration, is a review of a clearly formulated question that uses explicit, systematic methods to identify, select, and critically appraise relevant research, and to collect and analyze data from the studies that are included in the review. These reviews differ substantially from narrative-based reviews or synthesis articles. Statistical methods (meta-analysis) may or may not be used to analyze and summarize the results of the included studies.

Reports of systematic reviews and meta-analyses must include a completed PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) checklist and flow diagram to accompany the main text. Blank templates are available here:

- Checklist: PDF or Word document
- Flow diagram: PDF or Word document

Authors must also state in their “Methods” section whether a protocol exists for their systematic review, and if so, provide a copy of the protocol as supporting information and provide the registry number in the abstract.

If your article is a systematic review or a meta-analysis you should:

- › State this in your cover letter
- › Select “Research Article” as your article type when submitting
- › Include the PRISMA flow diagram as Fig 1 (required where applicable)
- › Include the PRISMA checklist as supporting information


Meta-analysis of genetic association studies

Manuscripts reporting a meta-analysis of genetic association studies must report results of value to the field and should be reported according to the guidelines presented in *Systematic Reviews of Genetic Association Studies* by Sagoo *et al.*

On submission, authors will be asked to justify the rationale for the meta-analysis and how it contributes to the base of scientific knowledge in the light of previously published results. Authors will also be asked to complete a checklist (DOCX) outlining information about the justification for the study and the methodology employed. Meta-analyses that replicate published studies will be rejected if the authors do not provide adequate justification.

Personal data from third-party sources

For all studies using personal data from internet-based and other third-party sources (e.g., social media, blogs, other internet sources, mobile phone companies), data must be collected and used according to company/website Terms and Conditions, with appropriate permissions. All data sources must be acknowledged clearly in the Materials and Methods section.

 Read our policy on data availability.


In the Ethics Statement, authors should declare any potential risks to individuals or individual privacy, or affirm that in their assessment, the study posed no such risks. In addition, the following Ethics and Data Protection requirements must be met.

For interventional studies, which impact participants’ experiences or data, the study design must have been prospectively approved by an Ethics Committee, and informed consent is required. The Ethics Committee may waive the requirement for approval and/or consent.

For observational studies in which personal experiences and accounts are not manipulated, consultation with an Ethics or Data Protection Committee is recommended. Additional requirements apply in the following circumstances:

- › If information used could threaten personal privacy or damage the reputation of individuals whose data are used, an Ethics Committee should be consulted and informed consent obtained or specifically addressed.
- › If authors accessed any personal identifying information, an Ethics or Data Protection Committee should oversee data anonymization. If data were anonymized and/or aggregated before access and analysis, informed consent is generally not required.

Note that Terms of Use contracts do not qualify as informed consent, even if they address the use of personal data for research.

 See our reporting guidelines for human subjects research.

Cell lines

Authors reporting research using cell lines should state when and where they obtained the cells, giving the date and the name of the researcher, cell line repository, or commercial source (company) who provided the cells, as appropriate.

Authors must also include the following information for each cell line:

For *de novo* (new) cell lines, including those given to the researchers a gift, authors must follow our policies for human subjects research or animal research, as appropriate. The ethics statement must include:

- › Details of institutional review board or ethics committee approval; AND
- › For human cells, confirmation of written informed consent from the donor, guardian, or next of kin

For established cell lines, the Methods section should include:

- › A reference to the published article that first described the cell line; AND/OR
- › The cell line repository or company the cell line was obtained from, the catalogue number, and whether the cell line was obtained directly from the repository/company or from another laboratory

Authors should check established cell lines using the ICLAC Database of Cross-contaminated or Misidentified Cell Lines to confirm they are not misidentified or contaminated. Cell line authentication is recommended – e.g., by karyotyping, isozyme analysis, or short tandem repeats (STR) analysis – and may be required during peer review or after publication.

Blots and gels

Manuscripts reporting results from blots (including Western blots) and electrophoretic gels should follow these guidelines:

- › In accordance with our policy on image manipulation, the image should not be adjusted in any way that could affect the scientific information displayed, e.g. by modifying the background or contrast.
- › All blots and gels that support results reported in the manuscript should be provided.
- › Original uncropped and unadjusted blots and gels, including molecular size markers, should be provided in either the figures or the supplementary files.
- › Lanes should not be overcropped around the bands; the image should show most or all of the blot or gel. Any non-specific bands should be shown and an explanation of their nature should be given.
- › The image should include all relevant controls, and controls should be run on the same blot or gel as the samples.
- › A figure panel should not include composite images of bands originating from different blots or gels. If the figure shows non-adjacent bands from the same blot or gel, this should be clearly denoted by vertical black lines and the figure legend should provide details of how the figure was made.

Antibodies

Manuscripts reporting experiments using antibodies should include the following information:

- › The name of each antibody, a description of whether it is monoclonal or polyclonal, and the host species.
- › The commercial supplier or source laboratory.
- › The catalogue or clone number and, if known, the batch number.
- › The antigen(s) used to raise the antibody.
- › For established antibodies, a stable public identifier from the Antibody Registry.

The manuscript should also report the following experimental details:

- › The final antibody concentration or dilution.
- › A reference to the validation study if the antibody was previously validated. If not, provide details of how the authors validated the antibody for the applications and species used.

We encourage authors to consider adding information on new validations to a publicly available database such as Antibodypedia or CiteAb.

Methods, software, databases, and tools

PLOS ONE will consider submissions that present new methods, software, or databases as the primary focus of the manuscript if they meet the following criteria:

Utility

The tool must be of use to the community and must present a proven advantage over existing alternatives, where applicable. Recapitulation of existing methods, software, or databases is not useful and will not be considered for publication. Combining data and/or functionalities from other sources may be acceptable, but simpler instances (i.e. presenting a subset of an already existing database) may not be considered. For software, databases, and online tools, the long-term utility should also be discussed, as relevant. This discussion may include maintenance, the potential for future growth, and the stability of the hosting, as applicable.

Validation

Submissions presenting methods, software, databases, or tools must demonstrate that the new tool achieves its intended purpose. If similar options already exist, the submitted manuscript must demonstrate that the new tool is an improvement over existing options in some way. This requirement may be met by including a proof-of-principle experiment or analysis; if this is not possible, a discussion of the possible applications and some preliminary analysis may be sufficient.

Availability

Software should be open source, deposited in an appropriate archive, and conform to the Open Source Definition. Databases must be open-access and hosted somewhere publicly accessible, and any software used to generate a database should also be open source. If relevant, databases should be open for appropriate deposition of additional data. Dependency on commercial software such as Mathematica and MATLAB does not preclude a paper from consideration, although complete open source solutions are preferred. Authors should provide a direct link to the deposited software or the database hosting site from within the paper.

Software submissions

Manuscripts describing software should provide full details of the algorithms designed. Describe any dependencies on commercial products or operating system. Include details of the supplied test data and explain how to install and run the software. A brief description of enhancements made in the major releases of the software may also be given. Authors should provide a direct link to the deposited software from within the paper.

Database submissions

For descriptions of databases, provide details about how the data were curated, as well as plans for long-term database maintenance, growth, and stability. Authors should provide a direct link to the database hosting site from within the paper.

New taxon names

Zoological names

When publishing papers that describe a new zoological taxon name, PLOS aims to comply with the requirements of the International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN). Effective 1 January 2012, the ICZN considers an online-only publication to be legitimate if it meets the criteria of archiving and is registered in ZooBank, the ICZN's official registry.

For proper registration of a new zoological taxon, we require two specific statements to be included in your manuscript.

In the **Results** section, the globally unique identifier (GUID), currently in the form of a Life Science Identifier (LSID), should be listed under the new species name, for example:

Anochetus boltoni Fisher sp. nov. urn:lsid:zoobank.org:act:B6C072CF-1CA6-40C7-8396-534E91EF7FBB

You will need to contact Zoobank to obtain a GUID (LSID). Please do this as early as possible to avoid delay of publication upon acceptance of your manuscript. It is your responsibility to provide us with this information so we can include it in the final published paper.

Please also insert the following text into the **Methods** section, in a sub-section to be called "Nomenclatural Acts":

The electronic edition of this article conforms to the requirements of the amended International Code of Zoological Nomenclature, and hence the new names contained herein are available under that Code from the electronic edition of this article. This published work and the nomenclatural acts it contains have been registered in ZooBank, the online registration system for the ICZN. The ZooBank LSIDs (Life Science Identifiers) can be resolved and the associated information viewed through any standard web browser by appending the LSID to the prefix "http://zoobank.org/". The LSID for this publication is: urn:lsid:zoobank.org:pub: XXXXXXX. The electronic edition of this work was published in a journal with an ISSN, and has been archived and is available from the following digital repositories: PubMed Central, LOCKSS [author to insert any additional repositories].

All PLOS articles are deposited in PubMed Central and LOCKSS. If your institute, or those of your co-authors, has its own repository, we recommend that you also deposit the published online article there and include the name in your article.

Botanical names

When publishing papers that describe a new botanical taxon, PLOS aims to comply with the requirements of the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (ICN). The following guidelines for publication in an online-only journal have been agreed such that any scientific botanical name published by us is considered effectively published under the rules of the Code. Please note that these guidelines differ from those for zoological nomenclature, and apply only to seed plants, ferns, and lycophytes.

Effective January 2012, the description or diagnosis of a new taxon can be in either Latin or English. This does not affect the requirements for scientific names, which are still to be Latin.

Also effective January 2012, the electronic PDF represents a published work according to the ICN for algae, fungi, and plants. Therefore the new names contained in the electronic publication of PLOS article are effectively published under that Code from the electronic edition alone, so there is no longer any need to provide printed copies.

Additional information describing recent changes to the Code can be found [here](#).

For proper registration of the new taxon, we require two specific statements to be included in your manuscript.

In the **Results** section, the globally unique identifier (GUID), currently in the form of a Life Science Identifier (LSID), should be listed under the new species name, for example:

Solanum aspersum S.Knapp, sp. nov. [urn:lsid:ipni.org:names:77103633-1] Type: Colombia. Putumayo: vertiente oriental de la Cordillera, entre Sachamates y San Francisco de Sibundoy, 1600-1750 m, 30 Dec 1940, J. Cuatrecasas 11471 (holotype, COL; isotypes, F [F-1335119], US [US-1799731]).

Journal staff will contact IPNI to obtain the GUID (LSID) after your manuscript is accepted for publication, and this information will then be added to the manuscript during the production phase

In the **Methods** section, include a sub-section called “Nomenclature” using the following wording:

The electronic version of this article in Portable Document Format (PDF) in a work with an ISSN or ISBN will represent a published work according to the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, and hence the new names contained in the electronic publication of a PLOS article are effectively published under that Code from the electronic edition alone, so there is no longer any need to provide printed copies.

In addition, new names contained in this work have been submitted to IPNI, from where they will be made available to the Global Names Index. The IPNI LSIDs can be resolved and the associated information viewed through any standard web browser by appending the LSID contained in this publication to the prefix <http://ipni.org/>. The online version of this work is archived and available from the following digital repositories: [INSERT NAMES OF DIGITAL REPOSITORIES WHERE ACCEPTED MANUSCRIPT WILL BE SUBMITTED (PubMed Central, LOCKSS etc)].

All PLOS articles are deposited in PubMed Central and LOCKSS. If your institute, or those of your co-authors, has its own repository, we recommend that you also deposit the published online article there and include the name in your article.

Fungal names

When publishing papers that describe a new botanical taxon, PLOS aims to comply with the requirements of the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (ICN). The following guidelines for publication in an online-only journal have been agreed such that any scientific botanical name published by us is considered effectively published under the rules of the Code. Please note that these guidelines differ from those for zoological nomenclature.

Effective January 2012, the description or diagnosis of a new taxon can be in either Latin or English. This does not affect the requirements for scientific names, which are still to be Latin.

Also effective January 2012, the electronic PDF represents a published work according to the ICN for algae, fungi, and plants. Therefore the new names contained in the electronic publication of PLOS article are effectively published under that Code from the electronic edition alone, so there is no longer any need to provide printed copies.

Additional information describing recent changes to the Code can be found [here](#).

For proper registration of the new taxon, we require two specific statements to be included in your manuscript.

In the **Results** section, the globally unique identifier (GUID), currently in the form of a Life Science Identifier (LSID), should be listed under the new species name, for example:

Hymenogaster huthii. Stielow et al. 2010, sp. nov. [urn:lsid:indexfungorum.org:names:518624]

You will need to contact either Mycobank or Index Fungorum to obtain the GUID (LSID). Please do this as early as possible to avoid delay of publication upon acceptance of your manuscript. It is your responsibility to provide us with this information so we can include it in the final published paper. Effective January 2013, all papers describing new fungal species must reference the identifier issued by a recognized repository in the protologue in order to be considered effectively published.

In the **Methods** section, include a sub-section called “Nomenclature” using the following wording (this example is for taxon names submitted to MycoBank; please substitute appropriately if you have submitted to Index Fungorum):

The electronic version of this article in Portable Document Format (PDF) in a work with an ISSN or ISBN will represent a published work according to the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, and hence the new names contained in the electronic publication of a PLOS article are effectively published under that Code from the electronic edition alone, so there is no longer any need to provide printed copies.

In addition, new names contained in this work have been submitted to MycoBank from where they will be made available to the Global Names Index. The unique MycoBank number can be resolved and the associated information viewed through any standard web browser by appending the MycoBank number contained in this publication to the prefix <http://www.mycobank.org/MB/>. The online version of this work is archived and available from the following digital repositories: [INSERT NAMES OF DIGITAL REPOSITORIES WHERE ACCEPTED MANUSCRIPT WILL BE SUBMITTED (PubMed Central, LOCKSS etc)].

All PLOS articles are deposited in PubMed Central and LOCKSS. If your institute, or those of your co-authors, has its own repository, we recommend that you also deposit the published online article there and include the name in your article.

Qualitative research

Qualitative research studies use non-quantitative methods to address a defined research question that may not be accessible by quantitative methods, such as people's interpretations, experiences, and perspectives. The analysis methods are explicit, systematic, and reproducible, but the results do not involve numerical values or use statistics. Examples of qualitative data sources include, but are not limited to, interviews, text documents, audio/video recordings, and free-form answers to questionnaires and surveys.

Qualitative research studies should be reported in accordance to the Consolidated criteria for reporting qualitative research (COREQ) checklist. Further reporting guidelines can be found in the Equator Network's Guidelines for reporting qualitative research.

Feedback

Was this information helpful?

Help us improve this page by leaving feedback below. For questions about a specific manuscript, please email the journal.

Yes

No

Send feedback

Normas da revista Biomass and Bioenergy



TABLE OF CONTENTS

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



ISSN: 0961-9534

DESCRIPTION

Biomass & Bioenergy is an international journal publishing original research papers and short communications, review articles and case studies on **biological resources**, chemical and biological processes, and biomass products for new **renewable sources of energy and materials**. The scope of the journal extends to the **environmental, management and economic** aspects of biomass and bioenergy.

Key areas covered by the journal:

- **Biomass:** sources, energy crop production processes, genetic improvements, composition. Please note that research on these biomass subjects must be linked directly to bioenergy generation.
- **Biological Residues:** residues/rests from agricultural production, forestry and plantations (palm, sugar etc), processing industries, and municipal sources (MSW). Papers on the use of biomass residues through innovative processes/technological novelty and/or consideration of feedstock/system sustainability (or unsustainability) are welcomed. However waste treatment processes and pollution control or mitigation which are only tangentially related to bioenergy are not in the scope of the journal, as they are more suited to publications in the environmental arena. Papers that describe conventional waste streams (ie well described in existing literature) that do not empirically address 'new' added value from the process are not suitable for submission to the journal.
- **Bioenergy Processes:** fermentations, thermochemical conversions, liquid and gaseous fuels, and petrochemical substitutes
- **Bioenergy Utilization:** direct combustion, gasification, electricity production, chemical processes, and by-product remediation
- **Biomass and the Environment:** carbon cycle, the net energy efficiency of bioenergy systems, assessment of sustainability, and biodiversity issues.

The journal does not accept for review papers on the following subjects:

- Performance of fuel combustion in engines
- Technical aspects of first generation biofuels
- Soil science papers with no direct linking to bioenergy generation
- Isolation of yeast/bacterial strains
- Purely analytical biochemistry derived studies that have no direct linking to bioenergy generation

Benefits to authors

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

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Agroindustrialists, biotechnologists, chemical engineers, renewable energy and resources researchers.

IMPACT FACTOR

2015: 3.249 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

ABSTRACTING AND INDEXING

AGRICOLA
Biotechnology Citation Index
Elsevier BIOBASE
Compendex
Current Biotechnology
Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences
Engineering Index Monthly
Ecological Abstracts
Environmental Periodicals Bibliography
FLUIDEX
Focus on Global Change
GEOBASE
OCLC Contents Alert
Plant Science Database (Elsevier)
PubMed
Research Alert
SCISEARCH
Web of Science
Biological Abstracts
BIOSIS Previews
SciSearch/Science Citation Index Expanded
Engineering Information Database EnCompass LIT (Elsevier)
Personal Alert
Scopus
Academic Search (EBSCO)

EDITORIAL BOARD

Editors:

C. Paul Mitchell, University of Aberdeen, Aberdeen, UK

Ralph P. Overend, Ottawa, Canada

Associate Editors:

Manuel Garcia-Perez, Washington State University, Pullman, Washington, USA

Walter Haslinger, Bioenergy 2020+ GmbH, Graz, Austria

Patricia Thornley, University of Manchester, Manchester, UK

International Editorial Board:

P.C. Abhilash, Inst. of Environment & Sustainable Development (IESD), Banaras Hindu University, Varanasi, India

Lawrence P. Abrahamson, Department of Psychology, State University of New York (SUNY), Binghamton, New York, USA

D.I. Bransby, Dept. of Agronomy & Soils, Auburn University, Auburn, Alabama, USA

Tony Bridgewater, Dept. of Engineering and Applied Science, Aston University, Birmingham, UK

Robert Brown, Iowa State University, Ames, Iowa, USA

Andre Faaij, Academic Director of the Energy Academy Europe, Groningen, Netherlands
Distinguished Professor at Groningen University
Affiliated to ESRIG, the Energy and Sustainability Research Institute Groningen
J. Fernandez, ETSI Agronomos-Botanica, Madrid, Spain
G. Gosse, Unite de Recherche en Bioclimatologie, INRA Centre d'Orléans, Thiverval-Grignon, France
Stephen Karekezi, African Energy Policy Res Netw, Nairobi, Kenya
Michael Ladisch, Laboratory of Renewable Resources Engineering, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA
I. Obernberger, Inst. of Chemical Engineering, Graz University of Technology, Graz, Austria
Charles Peterson, Dept. of Biological & Agric Eng, Idaho State University, Moscow, Idaho, USA
N.H. Ravindranath, Centre for Ecological Sciences, Indian Institute of Science, Bangalore, India
Fernando Rubiera, INCAR - Instituto Nacional del Carbón, Spanish National Research Council, Oviedo, Spain
Raffaele Spinelli, Istituto per la Valorizzazione del Legno (IVALSA), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Sesto Fiorentino, Italy
M. Tanticharoen, School Energy & Materials, King Mongkuts Inst Technology, Bangkok, Thailand
David Tillman, Global New Products, Foster Wheeler Development Cor, Clinton, New Jersey, USA
R.L. Vetter, AgriBio Systems Inc, Elgin, Illinois, USA
Avigad Vonshak, J. Blaustein Institutes for Desert Research, Ben Gurion University of the Negev, Beersheva, Israel
Ann Wilkie, Dept. of Soil and Water Science, University of Florida, Gainesville, Florida, USA
Lynn Wright, Biofuels Feedstock Devel Prog, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, USA

GUIDE FOR AUTHORS

Types of Contributions

These may take the form of research papers describing original studies (4000 to 6000 words), shorter technical notes and short communications (600 to 2000 words), state-of-the-art reviews, and topical reports. Society news and reviews of publications in this field are also accepted.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>. All authors of the manuscript must mutually agree that it is to be submitted to the journal.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Changes to authorship

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

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

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

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

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

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

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

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

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

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

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

Creative Commons Attribution (CC BY)

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

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

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

The open access publication fee for this journal is **USD 3300**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

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

This journal has an embargo period of 24 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal (<http://ees.elsevier.com/jbb>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail. When submitting a manuscript, authors must choose one or more classifications that best describe their manuscript. A list of classifications can be found [here](#).

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

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

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor. All submitted manuscripts must be double-spaced. Manuscripts must also have all pages numbered consecutively and line numbering activated.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class [elsarticle.cls](#) to prepare your manuscript and [BibTeX](#) to generate your bibliography.

Our [LaTeX site](#) has detailed submission instructions, templates and other information.

Article structure

Subdivision - numbered sections

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

Introduction

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

Material and methods

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

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Conclusions

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

Appendices

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

Essential title page information

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

Abstract

A concise and factual abstract is required of no more than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

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

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

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

Abbreviations

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

Acknowledgements

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

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry](#) for further information.

Math formulae

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

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

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

Formats

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

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

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

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

Figure captions

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

Tables

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

All tables should be submitted as a separate file.

References

Citation in text

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

Web references

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

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

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

Reference management software

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

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

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/biomass-and-bioenergy>

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

Reference style

Reference Style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: "..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result"

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] M. Renouf, M. Wegener, L. Nielsen, An environmental life cycle assessment comparing Australian sugarcane with US corn and UK sugar beet as producers of sugars for fermentation, *Biomass Bioener.* 32 (12) (2008) 1144-1155.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, Macmillan, New York, 3rd ed., 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age, E-Publishing*, New York, 1994, p. 281.

[4] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

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

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

ARTICLE ENRICHMENTS

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Google Maps and KML files

KML (Keyhole Markup Language) files (optional): You can enrich your online articles by providing KML or KMZ files which will be visualized using Google maps. The KML or KMZ files can be uploaded in our online submission system. KML is an XML schema for expressing geographic annotation and visualization within Internet-based Earth browsers. Elsevier will generate Google Maps from the submitted KML files and include these in the article when published online. Submitted KML files will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. [More information](#).

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions](#).

Submission checklist

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

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

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

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- Figures must be submitted as a separate document

- Tables must be submitted as a separate document
- Figure caption must be submitted as a separate document
- Line numbers must be numbered throughout the manuscript until the end of the references
- Page numbers must be included
- Author must suggest 3 potential reviewers without any conflict of interest

Further considerations

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

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

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

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

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

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

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

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