

KAMILA MOTTA DE CASTRO

**FOTOPERÍODO, DÉFICE HÍDRICO E ESTRESSE SALINO NO PERFIL DE
ÓLEOS ESSENCIAIS EM *Lippia alba* L. CULTIVADA *in vitro***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C355f
2019
Castro, Kamila Motta de, 1992-
Fotoperíodo, déficit hídrico e estresse salino no perfil de
óleos essenciais em *Lippia alba* L. cultivada *in vitro* / Kamila
Motta de Castro. – Viçosa, MG, 2019.
xi, 98 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Lippia alba*. 2. Expressão gênica. 3. Nerolidol. 4. Plantas
medicinais. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia
Vegetal. II. Título.

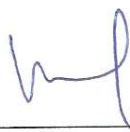
CDD 22. ed. 583.96

KAMILA MOTTA DE CASTRO


**FOTOPERÍODO, DÉFICE HÍDRICO E ESTRESSE SALINO NO PERFIL DE
ÓLEOS ESSENCIAIS EM *Lippia alba* L. CULTIVADA *in vitro***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2019.



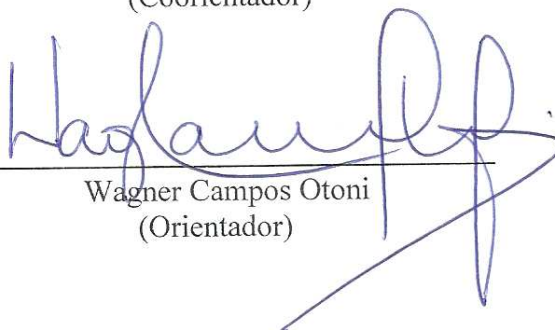
Richard Michael Grazul



Lyderson Facio Viccini



Diego Silva Batista
(Coorientador)



Wagner Campos Otoni
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Acredito que a gratidão é uma das sensações mais belas da vida! Ela é a memória do coração e da alma. Ao recordar o início da minha jornada neste mundo de pesquisas e bancadas sinto uma tremenda nostalgia e meu coração transborda de gratidão pois se cheguei até aqui, foi devido a ajuda de pessoas maravilhosas.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, Ele foi e sempre será meu maior guia, minha força. Sinto que Ele sempre coloca as pessoas mais incríveis em minha vida, em todas as áreas. Deus, muito obrigada, por tudo!!!

Agradeço aos meus pais, Paulo e Eli, por estarem sempre ao meu lado. Vocês passaram os maiores valores da vida: Amor, respeito, humildade, ética e honestidade. Com toda certeza vocês são os meus maiores exemplos de vida!

Agradeço meu Irmão, Felipe, pelos ensinamentos.

Agradeço minha família, em especial, Tia Rita e Tia Sônia que sempre me trataram como uma filha. E meus Tios Ernando e Sandra por me receberem tão bem em sua casa durante minhas idas a Juiz de Fora. Além, é claro, dos nossos papos de doer a barriga de tanto rir!

Agradeço ao meu amor, Iann, por tudo que vivemos até aqui. Durante todos esses anos você foi meu maior incentivador e companheiro. Obrigada por ser quem você é e obrigada por me fazer ser a mulher mais feliz! Você me inspira a ser uma pessoa melhor, e assim aprendo a cada dia mais com você.

Agradeço ao meu Orientador, Prof. Wagner Campos Otoni por ser mais que um orientador, durante todos esses anos o senhor foi como um pai, amigo e mestre. Sempre o admirei, pois vejo nos seus olhos o amor e respeito pela profissão de professor! O senhor é uma grande referência de pessoa, professor e de homem para mim. Muito obrigada por tudo!

Agradeço ao meu coorientador, Diego Batista por estar ao meu lado durante todos esses anos e ser meu maior parceiro na pesquisa. Desde o início, teve paciência e dedicação em transmitir todos os seus conhecimentos. Quem diria que iríamos formar um trio parada dura em? Eu, você e a *Lippia*. Uma mistura, que deu mais do que certo! Diego, serei eternamente grata a você por tudo!

Agradeço ao meu coorientador, Lyderson Viccini por abrir as portas do seu laboratório desde o início dessa jornada, e pela parceria maravilhosa com o LCTII. Se

cheguei até aqui, foi devido ao carinho e atenção que sempre o senhor me deu. Obrigada pelo exemplo de profissionalismo!

Agradeço ao Professor Richard Grazul por aceitar compor a banca de defesa e pelas valiosas sugestões e ensinamentos. Este trabalho só foi possível ser completado graças ao senhor.

Agradeço ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetal (LCT), pelos conhecimentos adquiridos e pelos momentos de descontração da hora do café. É maravilhoso fazer parte desta família, com vocês o trabalho se tornou mais prazeroso. Agradeço em especial a Tatiane, Amanda e Evandro por estarem ao meu lado desde o início do mestrado e por toda a parceria nas aulas, bancadas e noites de trabalho em grupo!! Sem vocês não chegaria até aqui! Agradeço também Sérgio e Raysa por toda ajuda disponibilizada, e por tornarem este trabalho possível.

Agradeço a Laís, Victoria e Elyabe, pelo acolhimento em Juiz de Fora e por não medir esforços em me ajudar. Vocês foram maravilhosas comigo, espero em breve retribuir por tudo o que fizeram por mim!

Agradeço ao Laboratório de Anatomia Vegetal, onde desenvolvi parte do meu trabalho: sou grata pelos ensinamentos e momentos de descontração.

Agradeço, aos amigos da Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, por todo companheirismo e pela boa convivência.

Agradeço a todos meus amigos, em especial Thaís Lopes por todos os ensinamentos, carinho, cuidado, boas conversas e pelos valiosos conselhos.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho: Muito obrigada!!

BIOGRAFIA

Kamila Motta de Castro, filha de Eli Ferreira Motta de Castro e Paulo Fernando de Castro, é natural da cidade de Viçosa, Minas Gerais e nasceu no dia 30 de novembro de 1992. Graduada em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa em 2017 campus Viçosa/MG. No ano de 2017 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa, em nível de Mestrado, tendo defendido tese em fevereiro de 2019.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	5
CAPÍTULO I	12
Fotoperíodo de 24h modula crescimento, morfoanatomia e teor de linalol em <i>Lippia alba</i> L. (Verbenaceae) cultivada <i>in vitro</i>	12
RESUMO	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	14
MATERIAL E MÉTODOS	17
Material vegetal	17
Efeito do fotoperíodo	17
Análises de desenvolvimento.....	18
Análise anatômica.....	18
Taxa fotossintética <i>in vitro</i>	18
Pigmentos fotossintéticos e quantificação de carboidratos, proteínas, aminoácidos e amido	19
Fluorescência da clorofila.....	20
Microextração dos óleos essenciais	20
Análise qualitativa dos óleos essenciais	20
Extração de mRNA, síntese de cDNA e análise por RT-q PCR.....	21
Análises estatísticas	21
RESULTADOS	21
DISCUSSÃO	33
REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO II	48

Estresse salino modula crescimento, a morfologia e o perfil do óleo essencial em <i>Lippia alba</i> L. (Verbenaceae) cultivada <i>in vitro</i>	48
RESUMO	48
ABSTRACT	49
INTRODUÇÃO	50
MATERIAL E MÉTODOS	52
Material vegetal	52
Efeito do estresse salino.....	52
Análises de desenvolvimento.....	53
Análises anatômicas.....	53
Determinação de pigmentos fotossintéticos e quantificação de carboidratos, proteínas, aminoácidos e amido	54
Microextração dos óleos essenciais	54
Análise qualitativa dos óleos essenciais	54
Extração de mRNA, síntese de cDNA e análise por RT-q PCR.....	55
Análises estatísticas	55
RESULTADOS	56
DISCUSSÃO	62
REFERÊNCIAS	66
CAPÍTULO III	74
O déficit hídrico modula crescimento, morfologia e perfil do óleo essencial em <i>Lippia alba</i> L. (Verbenaceae) cultivada <i>in vitro</i>	74
RESUMO	74
ABSTRACT	76
INTRODUÇÃO	77
MATERIAL E MÉTODOS	78
Material vegetal	79
Efeito do déficit hídrico.....	79

Análises de desenvolvimento.....	80
Determinação de pigmentos fotossintéticos e quantificação de carboidratos, proteínas e aminoácidos	80
Microextração dos óleos essenciais	80
Análise qualitativa dos óleos essenciais	80
Extração de mRNA, síntese de cDNA e análise por RT-q PCR.....	81
Análises estatísticas	81
RESULTADOS	82
DISCUSSÃO	88
REFERÊNCIAS	92
CONCLUSÕES GERAIS	98

RESUMO

CASTRO, Kamila Motta, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Fotoperíodo, déficit hídrico e estresse salino no perfil de óleos essenciais em *Lippia alba* L. cultivada *in vitro***. Orientador: Wagner Campos Otoni. Coorientador: Diego Silva Batista.

Lippia alba (Miller) N.E. Brown, conhecida como erva-cidreira brasileira, é uma planta tradicionalmente utilizada pela medicina popular brasileira. Possui importância econômica devido à produção de óleos essenciais aos quais são utilizados para melhoria da qualidade do sono, alívio do estresse, controle de doenças respiratórias, gastrointestinais, anti-inflamatórias e sedativo natural. Podem também ser utilizados no controle biológico contra diversos patógenos e na conservação de alimentos. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do fotoperíodo, estresse salino e déficit hídrico no perfil de óleos essenciais em *L. alba* cultivada *in vitro*, utilizando-se de técnicas de análises morfoanatômicas, fisiológicas e moleculares. Desse modo, avaliou-se aspectos anatômicos, o crescimento, metabólitos primários, taxa fotossintética, perfil de óleos essenciais e expressão de genes relacionados à síntese de óleos essenciais e ao relógio molecular. Foram conduzidos três experimentos: **I**) Avaliação do efeito de diferentes fotoperíodos (4, 8, 16 e 24 h); **II**) Avaliação do efeito do estresse salino sob diferentes concentrações de NaCl (0, 30 e 60 mM); e **III**) Avaliação do efeito do déficit hídrico sob diferentes concentrações de PEG [0, 1, 2 e 3% (m/v)] no crescimento, nos metabólitos primários, na taxa fotossintética, no perfil de óleos essenciais e na expressão de genes relacionados à síntese dos óleos essenciais. Os resultados demonstraram que *L. alba* é uma espécie que apresenta destacada plasticidade fisiológica nos diferentes fotoperíodos com melhor desempenho em dias longos. O melhor desempenho em crescimento, organização anatômica do mesofilo, caule, raízes e feixes, pigmentos fotossintéticos, maior taxa fotossintética e maior síntese de proteínas totais foi sob fotoperíodo de 24 h. A biossíntese de linalol, componente majoritário do quimiotipo BGEN-04, foi aumentada sob fotoperíodo de 24 h, com a redução da expressão de LaGES. O estresse salino afeta negativamente o metabolismo primário de *L. alba*, em que o crescimento, desenvolvimento e atividades fisiológicas foram comprometidas. O metabolismo secundário foi modulado, tendo aumento nos teores de linalol e redução dos teores de eucaliptol em plantas sob estresse salino mais severo (60 mM). Elevadas concentrações de NaCl podem comprometer a fisiologia das plantas no cultivo *in vitro*, entretanto, esta é uma espécie que apresenta plasticidade

fisiológica sob estresse salino moderado sendo capaz de crescer e desenvolver e não comprometer a via dos monoterpenos e sesquiterpenos. A *Lippia alba* mostrou-se uma espécie capaz de adaptar em solos com baixa disponibilidade hídrica. O metabolismo primário é afetado com redução do crescimento, área foliar e taxa fotossintética. A limitação hídrica aumentou no conteúdo de aminoácidos e proteínas totais. O metabolismo secundário foi modulado, com aumento nos teores de linalol e redução nos teores de germacreno em plantas sob déficit hídrico

ABSTRACT

CASTRO, Kamila Motta, M.Sc., Federal University of Viçosa, February, 2019. **Photoperiod, water deficit and salt stress in the profile of essential oils in *Lippia alba* L. cultured *in vitro*.** Advisor: Wagner Campos Otoni. Co-adviser: Diego Silva Batista.

Lippia alba (Miller) N.E. Brown is a plant traditionally used by Brazilian popular medicine. It has economic importance due to the production of essential oils, which are used for improve sleep quality, stress relief, control of respiratory and gastrointestinal diseases, anti-inflammatory and natural sedative. They can also be used in biological control against various pathogens and in food preservation. The objective of this study is to evaluate the effect of photoperiod, saline stress and water deficit on the profile of essential oils in *L. alba* cultivated *in vitro*, using morphological, physiological and molecular analysis techniques. For this, three experiments were conducted: **I)** Evaluation of the effect of different photoperiods (4, 8, 16 and 24 h) on anatomy, growth, primary metabolites, photosynthetic rate, essential oils profile and expression of genes related to the synthesis of essential oils and circadian clocks; **II)** Evaluation of the effect of saline stress under different concentrations of NaCl (0, 30 and 60 mM) in anatomy, growth, primary metabolites, essential oils profile and expression of genes related to the synthesis of essential oils; and **III)** Evaluation of the effect of the water deficit under different PEG concentrations [0, 1, 2 and 3% (m / v)] on growth, primary metabolites, photosynthetic rate, essential oils profile and related gene expression to the synthesis of essential oils. The results showed that *L. alba* is a species that presents outstanding physiological plasticity in the different photoperiods with better performance in long days. The best growth performance, anatomical organization of the mesophyll, stem, roots and bundles, photosynthetic pigments, higher photosynthetic rate and higher synthesis of total proteins was under photoperiod of 24 h. The biosynthesis of linalool, a major component of the BGEN-04 chemotype, was increased under a 24-h photoperiod, with reduced expression of LaGES. Saline stress negatively affects the primary metabolism of *L. alba*, in which growth, development and physiological activities were compromised. Secondary metabolism was modulated, with increase in linalool levels and reduction of eucalyptol contents in plants under more severe salt stress (60 mM). High concentrations of NaCl may compromise the physiology of plants in *in vitro* culture, however, this is a species that presents physiological plasticity under moderate salt stress being able to grow and develop and not compromise the pathway of

monoterpenes and sesquiterpenes. *L. alba* has been shown to be able to adapt to soils with low water availability. The primary metabolism is affected with reduced growth, leaf area and photosynthetic rate. Water limitation increased in the content of amino acids and total proteins. Secondary metabolism was modulated, with increase in linalool contents and reduction in germacrene levels in plants under water deficit.

INTRODUÇÃO GERAL

O metabolismo secundário é responsável por originar metabólitos especializados, também chamados de produtos naturais. Estes metabólitos apresentam uma gama de mais de 200.000 compostos com baixo peso molecular, geralmente produzidos em pequenas quantidades, com características químicas diversificadas. Além disso, a composição e concentração desses metabólitos pode variar em nível de indivíduo e população, assim como em diferentes estágios ontogenéticos e tipos de tecidos (Dewick 2002, Hartmann 2007, Kardong et al. 2012). Os mecanismos moleculares responsáveis por promoverem esta diversidade de metabólitos secundários podem ser decorrentes de acúmulo de mutações pontuais, poliploidização natural além dos fatores ambientais (Viccini et al. 2006, Campos et al. 2010, Kroymann 2011, Weng et al. 2012, Moore et al. 2014, Viccini et al. 2014).

Sabe-se que a síntese desses compostos, tais como flavonoides, alcaloides, terpenoides, taninos, esteroides e óleos essenciais requer um custo energético significativo para as plantas (Neilson 2013). Esses compostos também são conhecidos por apresentarem multifuncionalidade como defesa contra herbívoros e microrganismos; proteção contra os raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (Häkkinen et al. 2013, Kliebenstein 2013).

Os óleos essenciais presentes nas plantas representam uma classe de compostos com variadas aplicações em diferentes setores da indústria e podem ser extraídos dos vegetais por diferentes técnicas (Böhme et al. 2014). Eles podem ser empregados no controle fitossanitário, contra agentes oxidantes e atuar como sequestradores e redutores de radicais livres (Pereira 2008, Proestos et al. 2014). Na indústria alimentícia, os óleos essenciais são utilizados como agentes antimicrobianos contra patógenos (Burt 2004, Atarés et al. 2010, Szczepanski e Lipski 2014), em filmes antimicrobianos (Peng e Li 2014, Pola et al. 2016, Otoni et al. 2016) além da aplicação direta como conservantes de alimentos (Hyldgaard et al. 2012). Assim, com a crescente busca por produtos naturais que proporcionam melhoria na qualidade de vida, e que minimizam o impacto ambiental decorrentes de substâncias químicas sintéticas, os metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, destacam-se por serem fontes de substâncias potencialmente bioativas (Andrade et al. 2012).

Os óleos essenciais são compostos lipofílicos e altamente voláteis, que apresentam baixo peso molecular (300 g mol^{-1}) (Turek e Stintzing 2013). Estes compostos são classificados em dois grupos, aqueles derivados da via do acetil-CoA, formando o isopentenil pirofosfato e dimetillalil pirofosfato, que vão originar os terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, dentre outros) e aqueles oriundos da via do chiquimato formando os fenilpropanoides. A partir destes precursores são formados todos os constituintes presentes nos óleos essenciais, que podem apresentar em sua estrutura grupos alcoólicos, éteres, aldólicos, cetônicos, entre outros (Chemat et al. 2013, Pérez Zamora et al. 2018).

Os óleos essenciais são armazenados em células especializadas denominadas de tricomas, presentes na superfície epidérmica de folhas e caules. Estas estruturas têm a capacidade de biosintetizar, armazenar e secretar uma gama de compostos bioativos (Werker 2000, Schillmiller et al. 2008). Em *Lippia sidoides*, Guimarães et al. (2014) identificaram diferentes tipos de tricomas, glandulares e não-glandulares nas superfícies foliares, onde foi comprovado a presença de substâncias lipídicas e terpênicas nos tricomas glandulares. De modo similar, Batista et al. (2016) através do teste histoquímico em seção transversal da folha de *Lippia alba*, evidenciaram presença de óleos essenciais nos tricomas glandulares na superfície foliar.

O gênero *Lippia* apresenta grande diversidade de aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores que podem ser facilmente encontradas em países da América do Sul como Brasil, Paraguai e Argentina e no continente africano (Pascual et al. 2001). No Brasil, na Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais, e na Chapada Diamantina, na Bahia, são encontrados alguns dos importantes centros de diversidade biológica de *Lippia* (Viccini et al. 2006). Dentro da grande diversidade desse gênero, a espécie *Lippia alba*, denominada popularmente de cidreira, falsa-melissa, alecrim-do-campo ou sálvia apresenta grande importância social e econômica (Lorenzi e Matos 2008).

Adotada na medicina popular, a *L. alba* é utilizada para tratamentos de resfriados, bronquite, tosse, asma, distúrbios estomacais e intestinais, por apresentarem propriedades anti-ulcerogênicas, anti-microbianas, anti-inflamatórias, anti-helmínticas, antioxidantes e gastroprotetoras (Pascual et al. 2001, Lorenzi e Matos 2008).

Lippia alba apresenta uma peculiaridade interessante em relação à variabilidade química entre os genótipos (Viccini et al. 2014). Há rica variabilidade tanto na composição dos óleos essenciais quanto na composição dos compostos não-voláteis

(Hennebelle et al. 2008). Ademais, *Lippia* é considerado um gênero que apresenta grande plasticidade fisiológica em resposta a fatores abióticos, o que pode levar alterações no metabolismo secundário, em especial no perfil dos óleos essenciais (Ragagninet al. 2014, Batista et al. 2016, Batista et al. 2017). Dentre os fatores abióticos podem-se ressaltar variação espectral da luz (qualidade), irradiância (intensidade), concentração de CO₂ e temperatura (Morais 2009, Batista et al. 2016, Pacheco et al. 2016, Batista et al. 2017). Batista et al. (2017) observaram que elevadas concentrações de CO₂ promovem alterações na morfoanatomia de *Lippia alba* cultivada *in vitro*, além de modular a produção dos óleos essenciais e da expressão de genes envolvidos na biossíntese.

Dessa forma, ampliar o entendimento do fotoperíodo e seus potenciais efeitos no metabolismo secundário, em especial, os óleos essenciais é valioso. A luz é percebida pelas plantas através de fotorreceptores, que são estruturas capazes de identificar a quantidade e qualidade lumínicas, além da duração do dia (Parihar et al. 2016, Nohales e Kay 2016). Desse modo, os fotorreceptores são responsáveis pela percepção da luz, o que permite identificar o fotoperíodo e controlar o relógio circadiano das plantas (Devlin e Kay 2000).

O relógio circadiano é um oscilador endógeno com duração aproximada de 24 horas presente em vários indivíduos, que permite interagir e sincronizar sua fisiologia com o meio ambiente. De forma autônoma, o processo evolutivo culminou na diversificação dos componentes do relógio circadiano, que se mostram pouco conservados entre os Reinos (Loudon 2012, Nohales e Kay 2016).

Diversos processos fisiológicos das plantas são controlados pelo ritmo circadiano, como fotossíntese e movimentos estomáticos (Dodd et al. 2005; Salomé e McClung 2005). As vias metabólicas que envolvem o relógio circadiano em plantas são caracterizadas pela complexidade, no qual há ampla rede regulatória que envolve o encadeamento de genes para atuar em horários distintos no decorrer do dia e da noite (Harmer et al. 2000, Hsu e Harmer 2014).

A informação de tempo pelo ritmo circadiano nos organismos é compreendida através da expressão ou repressão de genes rítmicos, como *Circadian clock associated1 (CCA1)*, *Late elongated hypocotyl (LHY)*, *Pseudo response regulator (PRR)* e *Timing of cab expression1 (TOC1)* em *Arabidopsis thaliana* (Huang et al. 2012, Hydon et al. 2013). Em horários matinais níveis elevados de transcritos dos genes *CCA1* e *LHY* em conjunto com *PRR5*, 7 e 9 são observados. Do mesmo modo, observa-se em horários

noturnos a elevada expressão dos genes *TOC1*, *Gigantea (GI)*, *Early flowering 3 e 4 (ELF3/4)* e *Luxarrhythmo (LUX)* (Lu et al. 2009, Nusinow et al. 2011).

Os osciladores centrais do relógio circadiano são coordenados por fatores externos como temperatura e principalmente pela luz. A variação da temperatura pode afetar o *splicing* alternativo diminuindo a expressão de genes do relógio como *LHY* e *PRR7* em *Arabidopsis thaliana*, no qual transcritos não-funcionais são produzidos (James et al. 2012). Diversos estudos mencionam a influência da luz na regulação do ritmo circadiano, alterando a transcrição e tradução dos genes rítmicos e a estabilidade de RNA mensageiro (Staiger e Green 2011).

Barbosa et al. (2012) buscaram analisar a influência do ritmo circadiano em *Piper divaricatum* na composição de óleos essenciais, coletando folhas em diferentes estágios do dia. No entanto, não houve variação no conteúdo de safrol ao longo do dia. A regulação de genes envolvidos na biossíntese dos óleos essenciais ainda é desconhecida. Alguns fatores de transcrição foram preditos como candidatos reguladores da expressão de genes ou grupos de genes em diferentes espécies de plantas. O gene *ISPS (isoprenoid synthase)* em *Populus* tem sua expressão regulada pelos fatores de transcrição *LHY* e *CCA1* (Loivamäki et al. 2007). No entanto, não há estudos que correlacionem a expressão de genes do relógio a efeitos na biossíntese de óleos essenciais em *L. alba*.

Vários metabólitos secundários podem ser modulados por diferentes estresses abióticos, como estresse salino (Yildiztugay et al. 2014, Wang et al. 2015, Ahmad et al. 2017) e déficit hídrico (Sancho-Knapik et al. 2017, Zandalinas et al. 2017). De acordo com Neffati e Marzouk (2008), níveis elevados de salinidade (75 mM) podem reduzir as concentrações dos compostos químicos em *Coriandrum sativum* L. e quando submetidos a baixas concentrações de NaCl (25 mM), há aumento nos componentes do óleo essencial, como (E)-2-decenal e decanal, dodecanal. Em contraste, Taarit et al. (2010) relataram que a exposição a 25-75 mM de NaCl aumentou o rendimento do óleo essencial em *Salvia officinalis*.

Em plantas medicinais o efeito do déficit hídrico no cultivo *in vitro* pode promover o aumento dos componentes dos óleos essenciais (Razavizadeh e Adabavazeh 2017). No entanto, ainda são escassos estudos que avaliam déficit hídrico na biossíntese dos óleos essenciais. Diversos estudos visam à utilização do polietilenoglicol (PEG) e sorbitol como reagentes indutores de seca no meio de cultura (Rai et al. 2011, Bidabadi et al. 2012, Placide et al. 2012, Vanhove et al. 2012).

Devido à crescente importância dos óleos essenciais para a indústria, torna-se necessário entender como diferentes condições ambientais podem alterar rotas metabólicas da biossíntese dos óleos essenciais. Desse modo, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do fotoperíodo, estresse salino e déficit hídrico no perfil de óleos essenciais e na morfoanatomia em *Lippia alba* cultivada *in vitro*, utilizando-se análises morfoanatômicas, fisiológicas e moleculares.

REFERÊNCIAS

Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th ed. Carol Stream: Allured.

Ahmad N, Rab A, Ahmad N (2016) Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). Journal of Photochemical Photobiology B 154:51-56

Andrade MA, Cardoso MG, Batista LR, Mallet ACT, Machado SMF (2012) Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. Revista Ciência Agronômica 43:399-408.

Atarés L, Bonilla J, Chiralt A (2010) Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. Journal of Food Engineering 100:678-687.

Barbosa QP, da Câmara CA, Ramos CS, Nascimento DC, Lima-Filho JV, Guimarães EF (2012) Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: a new source of safrole. Química Nova 35(9):1806-1808.

Batista DS, Castro KM, Silva AR, Teixeira ML, Sales TA, Soares LI, Cardoso MG, Santos MO, Viccini LF, Otoni WC (2016) Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 52:276-282.

Bidabadi SS, Meon S, Wahab Z, Subramaniam S, Mahmood M (2012) In vitro selection and characterization of water stress tolerant lines among ethyl methanesulphonate (EMS) induced variants of banana (*Musa* spp., with AAA genome). Australian Journal of Crop Science 6(3):567.

Böhme K, Barros-Velázquez J, Calo-Mata P, Aubourg SP (2014) Antibacterial, antiviral and antifungal activity of essential oils: Mechanisms and applications. In: Villa TG, Veiga-Crespo P (eds.) Antimicrobial compounds. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 51–81

Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology 94:223-253.

Campos JMS, Sousa SM, Silva PS, Pinheiro LC, Sampaio F, Viccini LF (2010) Chromosome numbers and DNA C values in the genus *Lippia* (Verbenaceae). Plant Systematics and Evolution 291:133-140.

Chemat F, Maryline A-V, Xavier F (2013) Microwave-assisted extraction of essential oils and aromas. Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds. Springer: New York. 53-68.

Devlin PF, Kay SA (2000) Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. The Plant Cell 12(12):2499-2509.

Dewick PM (2002) Medicinal natural products: A biosynthetic approach. 2nd ed. Baffins Lane, Chichester: England: John Wiley & Sons.

Dodd AN, Salathia N, Hall A, Kévei E, Tóth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ, Webb AAR (2005) Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. Science 309:630-3.

Gupta SD, Jatothu B (2013) Fundamentals and applications of light emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. Plant Biotechnology Reports 7:211-220

Häkkinen ST, Ritala A, Rischer H, Oksman-Caldentey KM (2013) Medicinal plants engineering of secondary metabolites in cell cultures. In: Christou P, Savin R, Costa-

Pierce BA, Misztal I, Whitelaw CBA (eds.) Sustainable Food Production. New York, Springer, pp 1182-1200.

Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA (2000) Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* 290:2110-2113.

Hartmann T (2007) From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68:2831-2846.

Hennebelle T, Sahpaz S, Joseph H, Bailleul F (2008) Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology* 116:211-222.

Hsu PY, Harmer SL (2014) Wheels within wheels: the plant circadian system. *Trends in Plant Science*, 19:240-249.

Huang W, Pérez-García P, Pokhilko A, Millar AJ, Antoshechkin I, Riechmann JL, Mas P (2012) Mapping the core of the Arabidopsis circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science* 336:75-9.

Hyldgaard M, Tina M, Rikke LM (2012) Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 3:12

Haydon MJ, Hearn TJ, Bell LJ, Hannah MA, Webb AA (2013) Metabolic regulation of circadian clocks. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24:414-421.

James AB, Syed NH, Bordage S, Marshall J, Nimmo GA, Jenkins GI, Herzyk P, Brown JW, Nimmo HG (2012) Alternative splicing mediates responses of the Arabidopsis circadian clock to temperature changes. *The Plant Cell* 24:961-981

Kardong D, Upadhyaya S, Saikia LR (2012) Screening of phytochemicals, antioxidant and antibacterial activity of crude extract of *Pteridium aquilinum* Kuhn. *Journal of Pharmacy Research* 5:5194-5196.

Kliebenstein DJ (2013) Making new molecules-evolution of structures for novel metabolites in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 16:112-117.

- Kroymann J (2011) Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 14:246-251.
- Loudon AS (2012) Circadian biology: a 2.5 billion year old clock. *Current Biology* 22(14):R570-R571.
- Loivamäki M, Louis S, Cinege G, Zimmer I, Fischbach RJ, Schnitzler JP (2007) Circadian rhythms of isoprene biosynthesis in grey poplar leaves. *Plant Physiology* 143:540-551.
- Lorenzi H, Matos FJA (2008) *Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 512p.
- Lu SX, Knowles SM, Andronis C, Ong MS, Tobin EM (2009) CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL function synergistically in the circadian clock of Arabidopsis. *Plant Physiology* 150(2):834-843
- Morais TP, Luz JMQ, Silva SM, Resende RF, Silva AS (2012) Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 14 (1): 110-121.
- Morais LAS (2009) Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira* 27:50-63.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Moore BD, Andrew RL, Küheim C, Foley WJ (2014) Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytologist* 201:733-750.
- Nohales MA, Kay SA (2016). Molecular mechanisms at the core of the plant circadian oscillator. *Nature Structural and Molecular Biology* 23(12): 1061
- Neilson EH, Goodger JQ, Woodrow IE, Møller BL (2013) Plant chemical defense: at what cost? *Trends in Plant Science* 18(5):250-258.

Neffati M, Marzouk B (2008) Changes in essential oil and fatty acid composition in coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves under saline conditions. *Industrial Crops and Products* 28:137-142.

Nusinow DA, Helfer A, Hamilton EE, King JJ, Imaizumi T, Schultz TF, Kay SA (2011) The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* 475(7356):398.

Otoni CG, Espitia PJ, Avena-Bustillos RJ, McHugh TH (2016) Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. *Food Research International* 83:60-73.

Parihar P, Singh R, Singh S, Tripathi DK, Chauhan DK, Singh VP, Prasad SM (2016) Photoreceptors mapping from past history till date. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 162:223-231.

Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez Mata D, Villar A (2001) *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 76:201-214.

Pereira AA, Cardoso MG, Abreu LR, Morais AR, Guimarães LGL, Salgado APSP (2008) Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Ciência Agrotécnica* 32:887-893.

Pérez Zamora CM, Torres CA, Nuñez MB (2018). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae species growing in South America. *Molecules* 23(3):544.

Pola CC, Medeiros EA, Pereira OL, Souza VG, Otoni CG, Camilloto GP, Soares NF (2016) Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. *Food Packaging and Shelf Life* 9:69-78.

Placide R, Christian CS, Rony S (2012) Development of *in vitro* technique to screen for drought tolerant banana varieties by sorbitol induced osmotic stress. African Journal of Plant Science 6(15):16-425.

Proestos C, Lytoudi K, Mavromelanidou OK, Zoumpoulakis P, Sinanoglou VJ (2014) Antioxidant capacity of selected plant extracts and their essential oils. Antioxidants 2:11-22.

Peng Y, Li Y (2014) Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. Food Hydrocolloids 36:287-293.

Rai MK, Kalia RK, Singh R, Gangola MP, Dhawan AK (2011) Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection—an overview of the recent progress. Environmental and Experimental Botany 71(1):89-98.

Ragagnin RCG, Albuquerque CC, Oliveira FFM, Santos RG, Gurgel EP, Diniz JC Viana FA (2014) Effect of salt stress on the growth of *Lippia gracilis* Schauer and on the quality of its essential oil. Acta Botanica Brasilica 28(3):346-351.

Razavizadeh R, Adabavazeh F (2017) Effects of sorbitol on essential oil of *Carum copticum* L. under *in vitro* culture. Romanian Biotechnological Letters 22(1):12281.

Sancho-Knapik D, Sanz MÁ, Peguero-Pina JJ, Niinemets Ü, Gil-Pelegrín E (2017) Changes of secondary metabolites in *Pinus sylvestris* L. needles under increasing soil water deficit. Annals of Forest Science 74(1):24.

Staiger D, Green R (2011) RNA-based regulation in the plant circadian clock. Trends in Plant Science 16:517-523.

Salomé PA, McClung CR (2005) PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for temperature responsiveness of the Arabidopsis circadian clock. The Plant Cell 17:791-803.

Szopa A, Ekiert H (2016) The importance of applied light quality on the production of lignans and phenolic acids in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. cultures *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 127(1):115-121.

Szczepanski S, Lipski A (2014) Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Control* 36:224-229.

Taarit MB, Msaada K, Hosni K, Marzouk B (2010) Changes in fatty acid and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under NaCl stress. *Food Chemistry* 119:951-956.

Turek C, Stintzing FC (2013) Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12:40-53.

Vanhove AC, Vermaelen W, Panis B, Swennen R, Carpentier S (2012) Screening the banana biodiversity for drought tolerance: can an in vitro growth model and proteomics be used as a tool to discover tolerant varieties and understand homeostasis. *Frontiers in Plant Science* 3:176.

Viccini LF, Pierre PMO, Praça MM, Souza-Costa DC, Costa Romanel E, Sousa SM, Peixoto PHP, Salimena FRG (2006) Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). *Plant Systematics and Evolution* 256:171-178.

Viccini LF, Silveira RS, Vale AA, Campos JMS, Reis AC, Santos MO, Campos VR, Carpanez AG, Grazul RM (2014). Citral and linalool content has been correlated to DNA content in *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). *Industrial Crops and Products* 59: 14–19.

Weng J, Philippe R, Noel J (2012) The rise of chemodiversity in plants. *Science* 336:1667-1670.

Zandalinas SI, Sales C, Beltrán J, Gómez-Cadenas A, Arbona V (2017) Activation of secondary metabolism in citrus plants is associated to sensitivity to combined drought and high temperatures. *Frontiers in Plant Science* 7:1954.

CAPÍTULO I

Fotoperíodo de 24 h modula o crescimento, a morfoanatomia e o teor de linalol em *Lippia alba* L. (Verbenaceae) cultivada *in vitro*

RESUMO

As interações entre a regulação do relógio circadiano de plantas, metabolismo primário e secundário são frequentemente estudadas para explicar a importância rítmica no crescimento e sobrevivência das plantas. *Lippia alba* possui importância em virtude de suas propriedades medicinais provenientes do extrato do óleo essencial. O objetivo foi avaliar o efeito do fotoperíodo na anatomia, no crescimento, no perfil de óleos essenciais e na expressão de genes relacionados à síntese dos óleos essenciais e relógio circadiano em *L. alba* cultivada *in vitro*. As plantas foram cultivadas *in vitro* sob diferentes fotoperíodos (4, 8, 16 e 24 h de luz) e irradiância de $41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por duas lâmpadas LED branca (SMD 100 - 18W). Após 40 dias de cultivo, as análises dos metabólitos primários, crescimento, anatomia, fotossíntese, perfil dos óleos essenciais, e da expressão dos genes envolvidos na rota de biossíntese de sesquiterpenos e monoterpenos e do relógio endógeno foram realizadas. Os resultados demonstraram que *L. alba* é uma espécie que apresenta destacada plasticidade fisiológica nos diferentes fotoperíodos com melhor desempenho em dias longos. O melhor desempenho em crescimento, organização anatômica do mesófilo, caule, raízes e feixes, pigmentos fotossintéticos, maior taxa fotossintética e maior síntese de proteínas totais foi sob fotoperíodo de 24 h. A biossíntese de linalol, componente majoritário do quimiotipo BGEN-04, foi aumentada sob fotoperíodo de 24 h, com a redução da expressão de *LaGES*. Essas descobertas permitem melhor compreensão de como o fotoperíodo atua na regulação dos metabolismos primário e secundário, em especial, na composição dos óleos essenciais.

Palavras-chave: Expressão gênica • Fotossíntese • Nerolidol sintase • Planta medicinal • Relógio interno • Ritmo circadiano.

ABSTRACT

The interactions between circadian clock regulation of plants, primary and secondary metabolism are often studied to explain the rhythmic importance in plant growth and survival. *Lippia alba* is important because of its medicinal properties derived from the essential oil extract. The objective was to evaluate the effect of photoperiod on anatomy, growth, essential oils profile and expression of genes related to the synthesis of essential oils and circadian clock in *L. alba* cultured *in vitro*. The plants were cultured *in vitro* under different photoperiods (4, 8, 16 and 24 h light) and irradiance of $41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provided by two white LED bulbs (SMD 100-18W). After 40 days of cultivation, analyzes of the primary metabolites, growth, anatomy, photosynthesis, profile of the essential oils, and expression of the genes involved in the route of biosynthesis of sesquiterpenes and monoterpenes and the endogenous clock were performed. The results showed that *L. alba* is a species that presents outstanding physiological plasticity in the different photoperiods with better performance in long days. The best growth performance, anatomical organization of the mesophyll, stem, roots and bundles, photosynthetic pigments, higher photosynthetic rate and higher synthesis of total proteins was under photoperiod of 24 h. The biosynthesis of linalool, a major component of the BGEN-04 chemotype, was increased under a 24 h photoperiod, with reduced expression of *LaGES*. These findings allow a better understanding of how the photoperiod acts in the regulation of primary and secondary metabolism, especially in the composition of essential oils.

Key words: Photosynthesis • Nerolidol synthase • Medicinal plant • Internal clock • Circadian rhythm.

INTRODUÇÃO

A duração do dia (fotoperíodo) é estabelecida mediante a rotação da Terra ao redor do seu eixo e ao redor do sol o que permite impacto significativo no metabolismo da maioria dos seres vivos. Organismos de todos os reinos desde cianobactérias, fungos, plantas e até animais desenvolveram mecanismos capazes de detectar ciclos diurnos e noturnos e oscilações na temperatura, possibilitando-os interagir e se adaptar ao meio ambiente (Serrano-Bueno et al. 2017). Em plantas, diversas funções fisiológicas são controladas pelo fotoperíodo tais como crescimento (Dodd et al. 2005, Bordage et al. 2016, Maurya e Bhalerao 2017, Wang et al. 2018, Mahmud et al. 2018), indução do florescimento (Searle e Coupland 2004, Imaizumi e Kay 2006, Triozzi et al. 2018, Song et al. 2018), tolerância ao frio (Barros et al. 2017) e regulação do relógio circadiano (Dodd et al. 2014, Shin et al. 2017, Mahmud et al. 2018).

As interações entre a regulação do relógio circadiano de plantas, metabolismo primário e sinalização são frequentemente estudadas para explicar a importância rítmica no crescimento e sobrevivência das plantas (Harmer et al. 2000, Harmer 2009, Farré e Weise et al. 2012, Dodd et al. 2014, Shin et al. 2017). Em *Arabidopsis*, por exemplo, a superexpressão de um dos componentes do relógio endógeno *circadian clock associated1(CCA1)* é capaz de promover disfunção nos mecanismos circadianos, afetando a fixação líquida de CO₂ e consequente redução da taxa fotossintética (Dodd et al. 2005). Além disso, para sincronizar com o ambiente, plantas são capazes de cronometrar a degradação do amido em períodos noturnos, evitando que essa reserva energética esgote até que se inicie o dia (Graf et al. 2010). Apesar dos vários relatos envolvendo a regulação circadiana de vias no metabolismo primário, a compreensão de como os osciladores rítmicos são influenciados pelo metabolismo ainda permanece desconhecida (Dodd et al. 2014).

Diversos genes rítmicos estão envolvidos na regulação do relógio endógeno em plantas. Em *Arabidopsis thaliana*, os genes *CCA1*, *late elongated hypocotyl (LHY)*, *pseudo response regulator (PRR)* e *timing of cab expression1 (TOC1)* podem ser expressos ou regulados negativamente ao longo do dia e da noite (Huang et al. 2012, Hydon et al. 2013). Em horários matinais os genes *CCA1* e *LHY* (Alabadí et al. 2001) em conjunto com *PRR5*, 7 e 9 são expressos (Farré et al. 2009). De forma similar, em horários noturnos ocorre aumento do número de transcritos dos genes *TOC1* (Ito et al.

2009), *Gigantea (GI)* (Park et al. 1999), *early flowering 3 and 4 (ELF3/4)* e *luxar rhythm (LUX)* (Lu et al. 2009, Nusinow et al. 2011).

Alguns autores buscaram correlacionar a influência do relógio endógeno de plantas com o metabolismo secundário. Barbosa et al. (2012) analisaram a influência do ritmo circadiano em *Piper divaricatum* na composição de óleos essenciais, coletando folhas em diferentes horários do dia. No entanto, não houve variação no conteúdo de safrol ao longo do dia. A regulação de genes envolvidos na biossíntese dos óleos essenciais ainda é desconhecida. Alguns fatores de transcrição foram preditos como candidatos reguladores da expressão de genes ou grupos de genes em diferentes espécies de plantas. A síntese de isoprenoides em *Populus* é regulada em nível transcricional pelos fatores de transcrição *LHY* e *CCAI* (Loivamäkiet al. 2007).

Plantas medicinais e aromáticas são adotadas pela humanidade há milhares de anos como fonte de compostos naturais com amplo espectro de aplicações farmacológicas (Böhme et al. 2014, Wagas et al. 2016). O crescente interesse por esses compostos associado ao desenvolvimento tecnológico permitiu a produção em grande escala de metabólitos secundários como via alternativa de produtos farmacêuticos (Wei et al. 2016).

Os metabólitos secundários como flavonoides, alcaloides, terpenoides, taninos, esteroides e óleos essenciais são conhecidos por apresentarem multifuncionalidade em plantas como: defesa contra herbívoros e microrganismos; proteção contra os raios UV; e atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (Häkkinen et al. 2013, Kliebenstein 2013).

Os óleos essenciais são compostos bioativos utilizados pelas indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia e agroquímica. Estes compostos são empregados no tratamento de doenças cardiovasculares, bronquite, tosse, asma, distúrbios estomacais e intestinais (Pascual et al. 2001, Lorenzi e Matos 2008, Saljoughian et al. 2018), por apresentarem propriedades analgésica, anti-inflamatória, anti-ulcerogênicas, anti-helmínticas (Raut e Karuppayil 2014, Amin e Hosseinzadeh 2016). Podem ser usados também no controle de pragas (Pavela e Govindarajan 2017, Benelli et al. 2018), na ação conta agentes oxidantes (Proestos et al. 2014, Msaada et al. 2015) e na conservação de alimentos (Szczechanski e Lipski 2014, Peng e Li 2014, Otoni et al. 2016, Pola et al. 2016).

De modo geral, os compostos terpenoides dos óleos essenciais são sintetizados em duas vias distintas: via do mevalonato (MEV) e via do metileritritol-fosfato (MEP),

ambas responsáveis pela síntese de isopentenil pirofosfato (IPP). A primeira via é responsável pela síntese de sesquiterpenos no citosol, cujos precursores são piruvato e acetilcoenzima-A. A segunda via é a que origina monoterpenos e ocorre nos plastídios, tendo como precursores piruvato e gliceraldeído-3-fosfato. A partir destes, são formados todos os constituintes presentes nos óleos essenciais (Chemat et al. 2013, Pérez et al. 2018).

O gênero *Lippia* ostenta rica diversidade de espécies distribuída na América Latina (Almeida et al. 2018). No Brasil alguns dos centros de diversidade biológica localizam-se na Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais e na Chapada Diamantina na Bahia (Viccini et al. 2006).

A espécie *Lippia alba* exprime grande importância no cenário social e econômico, em virtude de suas propriedades medicinais provenientes do extrato do óleo essencial (Pascual et al. 2001, Lorenzi e Matos 2008). Uma peculiaridade desse gênero é que há variabilidade química entre os genótipos (quimiotipos), tanto na composição dos óleos essenciais, quanto na composição dos compostos não-voláteis (Hennebelle et al. 2008). Ademais, *L. alba* é caracterizada por apresentar não somente elevada plasticidade fenotípica, como também genômica (Reis et al. 2014).

A plasticidade fisiológica existente neste gênero pode ocorrer em resposta a diferentes fatores abióticos, o que pode levar a alterações no metabolismo secundário, em especial no perfil dos óleos essenciais (Ragagninet al. 2014, Batista et al. 2016, Batista et al. 2017a, Lazzarini et al. 2018). Dentre esses fatores, pode-se ressaltar variação espectral da luz (qualidade), irradiância (intensidade) concentração de CO₂ e temperatura (Morais 2009, Batista et al. 2016, Pacheco et al. 2016, Batista et al. 2017a, Lazzarini et al. 2018). Batista et al. (2017a) observaram que elevadas concentrações de CO₂ promovem alterações na morfoanatomia de *L. alba* cultivada *in vitro*, além de alterar o perfil de produção dos óleos essenciais e da expressão de genes envolvidos na biossíntese destes.

Dada a importância dos óleos essenciais para a indústria, a relevância da *L. alba* como espécie aromática e ainda a plasticidade e capacidade de resposta do metabolismo secundário dessa espécie à fatores ambientais, faz-se necessário entender como diferentes ambientes podem alterar a produção de óleos essenciais assim como suas rotas de biossíntese. Este conhecimento fornecerá subsídios para o estabelecimento de estratégias que visam otimizar a produção de óleos essenciais em *L. alba*. Além disso, não há estudos até o momento sobre a influência do fotoperíodo no metabolismo e na

produção de óleos essenciais nessa espécie. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do fotoperíodo na anatomia, no crescimento, no perfil de óleos essenciais e na expressão de genes relacionados à síntese dos óleos essenciais e relógio circadiano em *L. alba* cultivada *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foi utilizado o acesso de *Lippia alba* (BGEN-04) do Banco de Germoplasma do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil), sendo os propágulos provenientes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen, Brasília, DF, Brasil). O acesso foi identificado pela Profa. Dra. Fátima Salimena (Departamento de Botânica, UFJF). Os espécimes foram depositados no Herbário Leopold Krieger (Herbário CESJ 48372, UFJF). As plantas foram propagadas *in vitro*, em meio MS (Murashige e Skoog 1962) em sua solução salina original, complexo vitamínico de MS, na ausência de reguladores de crescimento e, 30 g L⁻¹ sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 6,5 g L⁻¹ de ágar Merck® (Merck Millipore Corp, Darmstadt, Alemanha). O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,01. O meio foi autoclavado a 120 °C, 108 kPa de pressão, durante 20 min, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCT II), no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil).

Efeito do fotoperíodo

Oito segmentos nodais (~ 2 cm de comprimento) foram inoculados em frascos de vidro (600 mL de capacidade), contendo 80 mL de meio de cultura com a formulação salina básica de MS, vitaminas de MS, 30 g L⁻¹ sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 6,5 g L⁻¹ de ágar Merck®. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,01. O meio foi autoclavado a 120 °C e 108 kPa de pressão, durante 20 min. As culturas foram mantidas em sala de crescimento mantida a 25 ± 2 °C em diferentes fotoperíodos (4, 8, 16 e 24 h de luz) e irradiância de 41 μmol m⁻² s⁻¹ fornecida por duas lâmpadas LED branca (SMD 100 - 18W, Vilux®, Vitória, ES, Brasil). Os frascos foram vedados com tampas rígidas de polipropileno (TRP) com dois orifícios (10 mm) cobertos com membranas de 0,45

μm (MilliSeal[®] AVS-045 Air Vent) [taxa de troca de CO_2 (TTCO_2): $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$] (Batista et al. 2017b).

Após 40 dias de cultivo, realizaram-se as análises dos metabólitos primários, crescimento, anatomia, fotossíntese, perfil dos óleos essenciais, e da expressão dos genes envolvidos na rota de biossíntese de sesquiterpenos e monoterpênicos e do relógio endógeno. Todas as coletas foram feitas em horário padronizado, às 17 h.

Análises de desenvolvimento

Foram analisadas as seguintes características de desenvolvimento: massa fresca (g), massa seca (g), comprimento total da parte aérea (cm), comprimento total da maior raiz (cm) e área foliar (cm^2). A determinação da área foliar foi feita com auxílio do programa ImageJ (Schneider et al. 2012).

Análise anatômica

Para a caracterização anatômica estrutural, amostras do segundo par de folhas expandidas, caules da região mediana do segundo internódio e raízes principais da região mediana foram fixadas em solução Karnovsky (Karnovsky 1965). Após a fixação, as amostras foram desidratadas em série etílica crescente (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90 e 95%) e incluídas em resina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). As secções transversais de $5 \mu\text{m}$ de espessura, foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA) e corados com azul de Toluidina (pH 3,2) (O'Brien e McCully, 1981). As lâminas foram montadas em resina sintética Permout[®] SP15-500 (Fisher Chemicals- Fisher Scientific). Para a captura de imagens, foi utilizado um microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-photo, acoplado à câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic.

Taxa fotossintética *in vitro*

As trocas gasosas e a quantificação da taxa fotossintética *in vitro* foram realizadas em modelo adaptado do proposto por Costa et al. (2014). Um IRGA (modelo S151; Qubit Systems, ON, Canada) foi utilizado para as medições de trocas gasosas e a coleta dos dados foi realizado através do software LoggerLite (LoggerLite, 1.8.1,

Vernier Software & Technology Caliper, Beaverton). O CO₂ de referência foi calculado através da entrada de ar em um frasco vazio, trazido por uma bomba do ambiente externo a uma taxa de fluxo de ar constante de 300 mL min⁻¹, dentro de uma câmara com iluminação (lâmpadas LED branca). As plantas foram mantidas na ausência de luz por um período de 8 h que antecederam a análise. Logo após a medição do CO₂ de referência, os frascos com as plantas foram acoplados ao sistema, sendo o CO₂ calculado até o ponto de estabilização. As trocas gasosas foram calculadas através da diferença entre o CO₂ de referência e o CO₂ das plantas expostas ao ar atmosférico. A temperatura e a umidade do ar no frasco foram mensuradas através do sensor Espec (Thermo Recorder RS-11, Takai Espec Corp.). A taxa fotossintética *in vitro* (A) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$A (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}) = \frac{\Delta\text{CO}_2}{\text{Mol. Flow}}$$

Onde,

$$\Delta\text{CO}_2(\text{ppm}) = \text{CO}_2 \text{ de referência} - \text{CO}_2 \text{ de análise}$$

$$\text{Mol Flow} = \frac{\text{Taxa de fluxo de ar (L min}^{-1}\text{)}}{\left(\frac{(\text{Constante dos gases perfeitos (22,4) X Temperatura (K)})}{600000} \right)} \frac{1}{(\text{Área foliar (cm}^2\text{)})}$$

Pigmentos fotossintéticos e quantificação de carboidratos, proteínas, aminoácidos e amido

Amostras da parte aérea foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido, maceradas e liofilizadas para análise. Para determinação de pigmentos fotossintéticos, aproximadamente 10 mg de tecidos liofilizados foram utilizados para extração com acetona conforme descrito por Welburn (1994). Na determinação dos carboidratos (amido, sacarose, glicose e frutose) 25 mg de tecidos liofilizados foram utilizados na extração com metanol e avaliados conforme descrito por Fernie et al. (2001). A quantificação de proteína e de aminoácidos totais foi conduzida como relatado em Cross et al. (2006).

Fluorescência da clorofila

Os parâmetros de ETR (Taxa de transporte de elétrons), NPQ (dissipação não-fotoquímica), Fv/Fm (Rendimento quântico efetivo do FSII) e qP (dissipação fotoquímica) foram quantificados em folhas de *Lippia alba* totalmente expandidas, submetidas a um ciclo escuro e claro e avaliadas pelo fluorômetro de clorofila (MINI-PAM, Walz, Alemanha). Os dados para fluorescência mínima (Fo), fluorescência máxima (Fm) e fluorescência variável (Fv) foram calculados conforme o proposto por Kooten e Snel (1990). Para os parâmetros qP, NPQ e ETR os cálculos foram baseados de acordo com Maxwell e Johnson (2000).

Microextração dos óleos essenciais

Para a microextração de óleos essenciais, aproximadamente 300 mg de folhas foram coletados e armazenados a -18 °C em tubo de ensaio com tampa rosqueável. Após o congelamento, 1,0 mL de hexano e 0,5 mL de metanol foram adicionados à cada amostra. Para acelerar o processo de extração, as amostras foram mantidas em banho de ultrassom (Thornton-INPEC) com frequência de 70 KHz, à temperatura ambiente, por 1 h. Em sequência, o sobrenadante foi filtrado através de uma mecha de algodão estéril. Amostras de 1 µL de solução límpida obtida, contendo os óleos extraídos, foram analisadas por cromatografia gasosa.

Análise qualitativa dos óleos essenciais

A análise qualitativa do óleo essencial procedeu-se com o cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (GCMS-QP2010 Plus; Shimadzu) e coluna Rtx-5MS[®] (Restek) de 30 m x 0,25 mm. Iniciou-se a temperatura do forno com 70 °C, mantida por 3 min, seguida por aumento de 6 °C min⁻¹, até 300 °C. O injetor foi operado no modo 'split' (1:10), à temperatura de 240 °C, e a interface e o detector de massas foram operados a 300 °C. Utilizou-se hélio como gás de arraste, com fluxo de 1,53 mL min⁻¹. Uma mistura padrão de hidrocarbonetos lineares (C₉H₂₀; C₁₀H₂₂; ... C₂₅H₅₂ e C₂₆H₅₄) foi injetada nas mesmas condições das amostras. A identificação dos constituintes foi realizada comparando-se os espectros de massa obtidos com os do banco de dados da NIST 9.0 (correlação de > 97%) e confirmado pelo seu índice de retenção (Índice de Kováts), calculado para cada constituinte, e comparado aos dados na literatura (Adams, 1997).

Extração de mRNA, síntese de cDNA e análise por RT-q PCR

O RNA total foi isolado de folhas com TRIZOL[®] (Invitrogen, Carlsbad, California, United States) e tratado com DNase I (Invitrogen[®]) seguindo as recomendações dos fabricantes. A quantificação foi feita com NanoDrop ND-2000 (NanoDropTechnologies). A partir de 800 ng de RNA total o cDNA foi sintetizado utilizando transcriptase reversa (Ludwig Biotec[®]). O volume total da reação foi de 10 μ L, sendo 1 μ L de cDNA, 3 μ L de água DEPC (dietilpirocarbonato), 2 μ L de primers (*forward* e *reverse*) 4 μ M e 4 μ L de SYBR-Green mix/Rox (Ludwig Biotec[®], Alvorada, Brasil). A reação de PCR em tempo real (RT- qPCR) foi realizada no equipamento CFX96 Touch[™] (BIO-RAD). Primers dos genes *nerolidol/linalol sintase (LaNES/LIS)*, *geraniol sintase (LaGES)*, *timing of cab expression1 (LaTOC1)*, *pseudo response regulator 5 (LaPRR5)*, *late elongated hypocotyl (LaLHY)* e o gene de referência *álcool desidrogenase (LaADH)* foram desenhados a partir da sequência do transcriptoma *de novo* de *Lippia alba* (Souza et al. 2016—dados não publicados).

Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, sendo a unidade experimental composta por um frasco de cultivo contendo oito plantas. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Genes versão Windows/2004.2.1 (Cruz 2013). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F e as médias comparadas pelos testes de Scott & Knott ($P \leq 0,05$). Para as análises de RT-qPCR os níveis de expressão foram calculados pelo método $\Delta\Delta C_t$ proposto por Livak e Schmittgen (2001) com três repetições biológicas e pelo menos três repetições técnicas. As médias foram comparadas pelo teste de Dunnett ($P \leq 0,05$). A análise de correlação de Pearson foi realizada para os dados de expressão dos genes *LaLHY*, *LaPRR5* e *LaTOC1*.

RESULTADOS

O fotoperíodo interferiu no crescimento de plantas de *Lippia alba in vitro*

Os tratamentos de 16 e 24 h apresentaram, respectivamente, maiores valores no acúmulo de massa vegetal da parte aérea (Fig. 2A, B) e comprimentos da parte aérea (Figura 2E) e das raízes (Figura 2F) em relação aos tratamentos de 4 e 8 h. Resultados semelhantes foram encontrados para as massas fresca e seca das raízes (Figura 2C, D).

Quanto maior foi a duração do período de exposição da luz, maior foi a área foliar (Figura 2E).

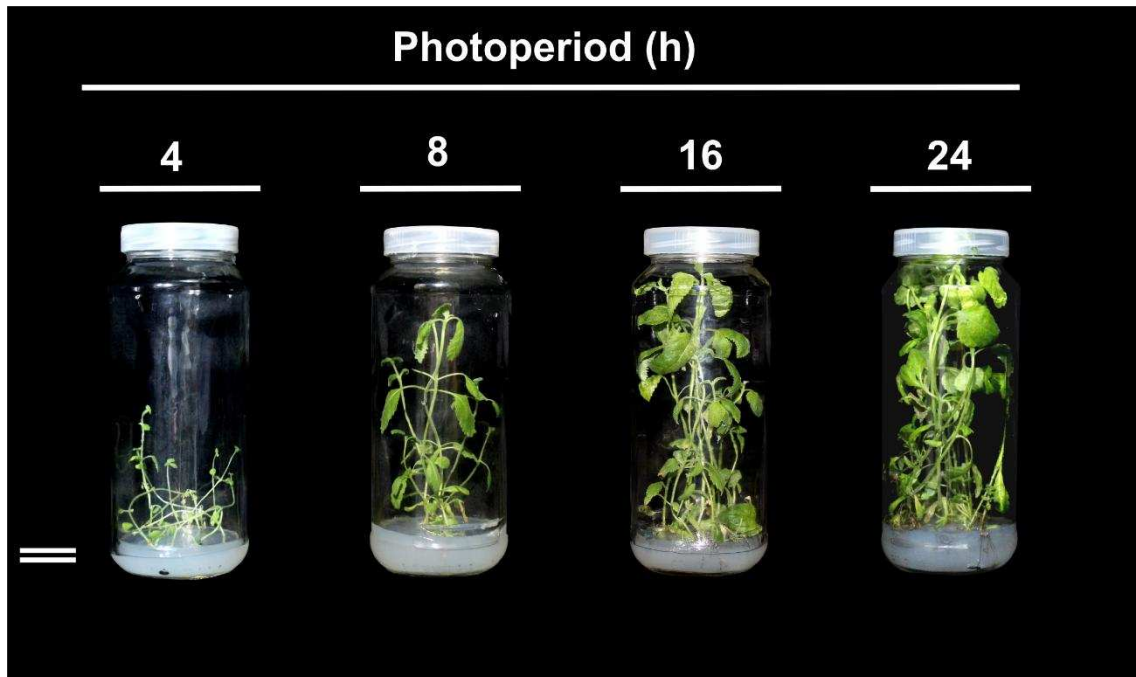


Figura 1. Plantas de *Lippia alba* cultivadas *in vitro* sob diferentes fotoperíodos (4, 8, 16, e 24h), após 40 dias de cultivo. Barra equivale a 2 cm.

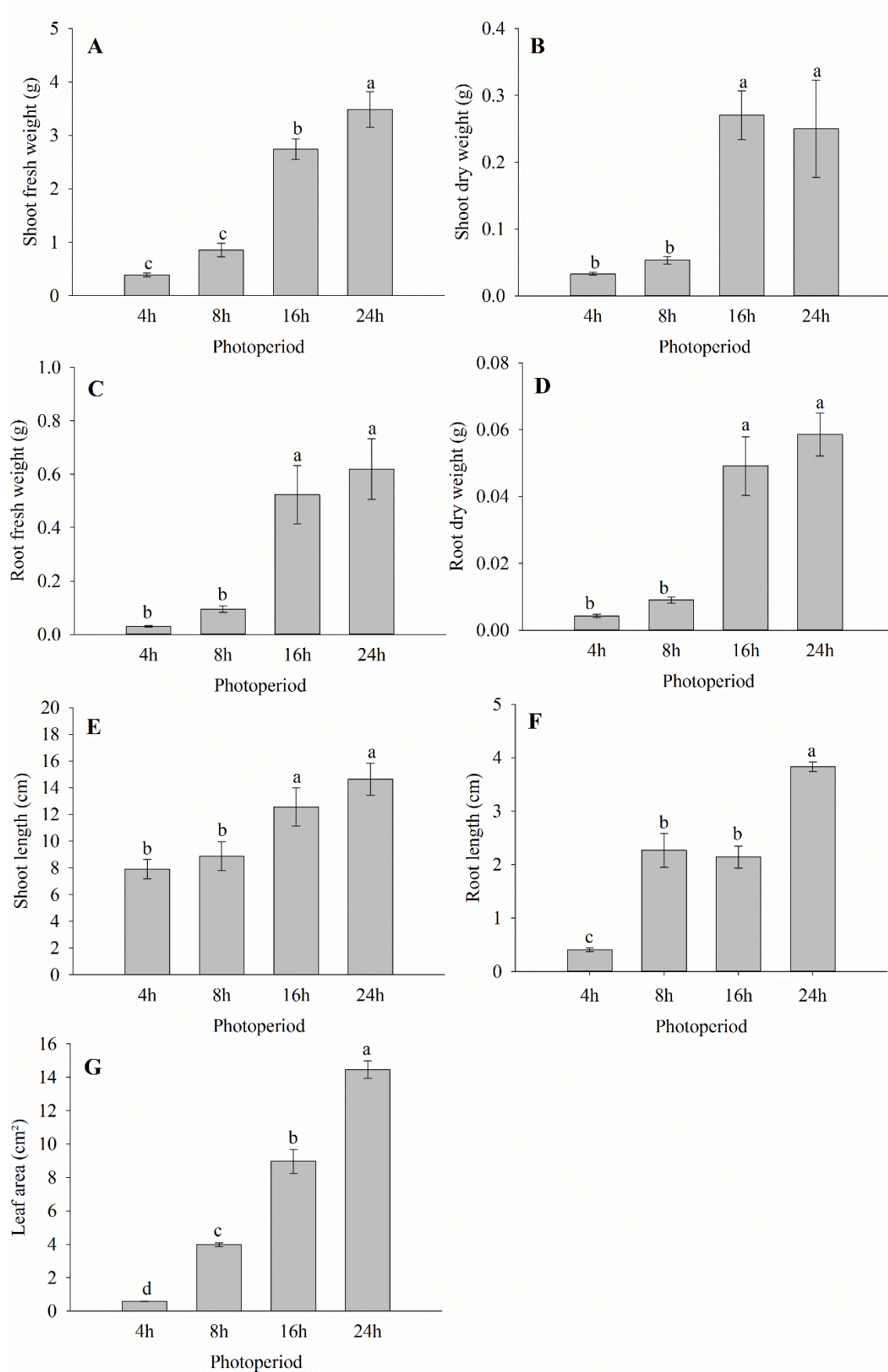


Figura 2. Variáveis de crescimento de *Lippia alba* cultivada 45 dias *in vitro* sob diferentes fotoperíodos 4, 8, 16 e 24 h. Médias indicadas pelas mesmas letras não diferem pelo teste

de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Dados apresentados como média ($n=4$). Barras verticais representam o erro padrão.

A morfoanatomia de órgãos vegetativos em *Lippia alba* cultivada *in vitro* é influenciada pelo fotoperíodo

O cultivo *in vitro* de *L. alba* em diferentes fotoperíodos promoveu variações na anatomia de caules, folhas e raízes (Figura 3). Em relação ao caule, é possível observar uma maior organização celular conforme o aumento do fotoperíodo. As plantas crescidas sob regimes diários de luz de 16 e 24 h tiveram maior diferenciação dos tecidos vasculares com feixes mais organizados e de maior calibre (Figura 3-A, D, G e J).

A região da nervura central das plantas cultivadas sob os fotoperíodos de 16 e 24 h apresentou maior organização celular do mesofilo e dos feixes vasculares em relação às sob 4 e 8 h.

A organização celular das raízes e a espessura cresceram proporcionalmente com o aumento do fotoperíodo, sendo que as plantas submetidas ao fotoperíodo de 24 h tiveram células mais espaçadas no córtex e feixe vascular mais organizado e com maior calibre em relação aos demais tratamentos (Figura 3-C, F, I e L).

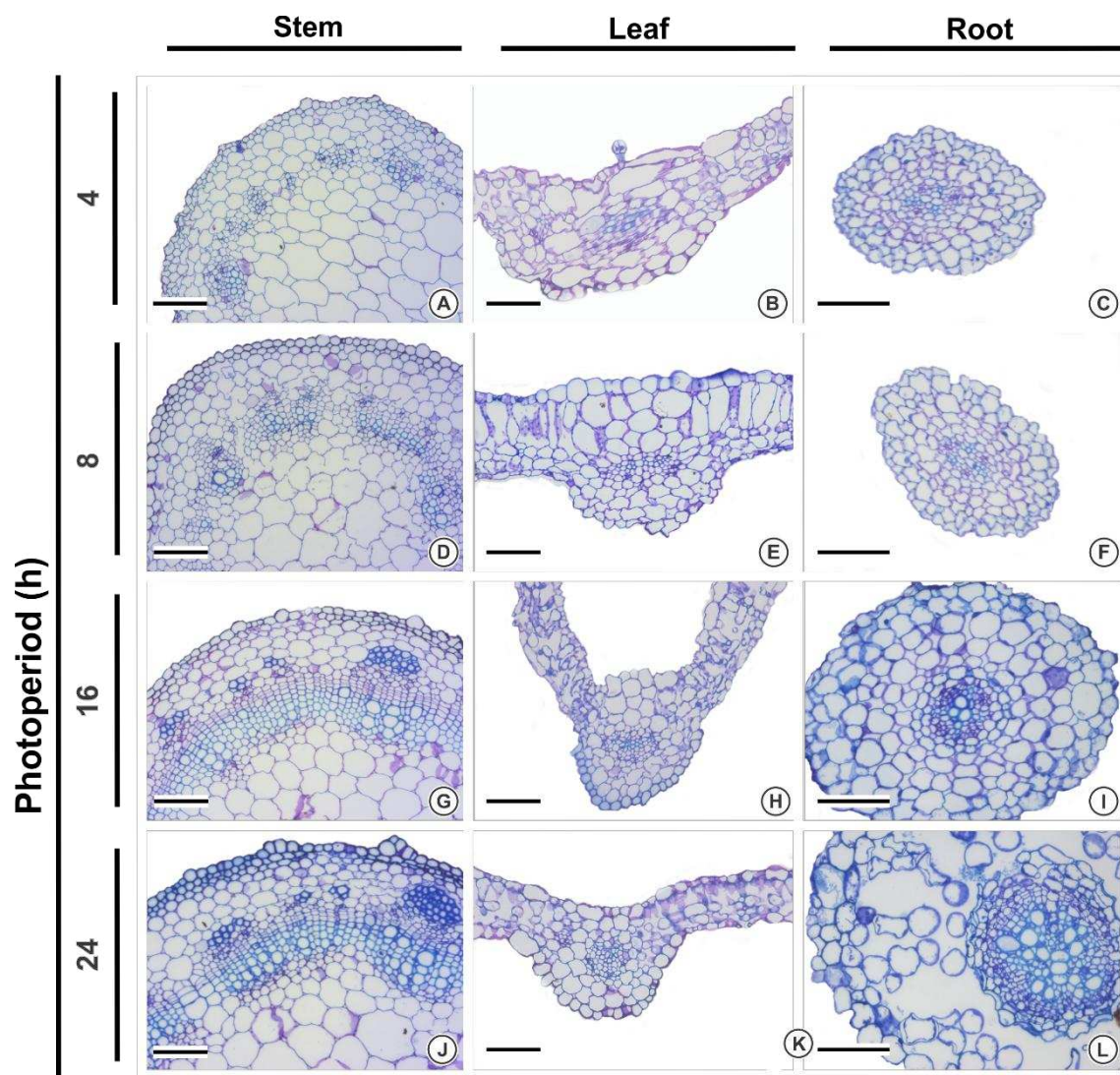


Figura 3. Secções transversais de caules (A, D, G e J), nervura central de lâminas foliares (B, E, H e K) e raízes (C, F, I e L) de *Lippia alba* após 45 dias de cultivo *in vitro*, sob fotoperíodos de 4, 8, 16 e 24 h, e coradas com azul de toluidina. Barras = 20 μm .

O fotoperíodo influenciou o metabolismo primário em *Lippia alba* cultivada *in vitro*

Os níveis de sacarose foram reduzidos conforme o aumento do fotoperíodo (Figura 4C). Em contraste, os metabólitos com papéis osmorregulatórios, como glicose e frutose, aumentaram no tratamento de 24 h (Figura 4A-B).

O conteúdo proteico aumentou com o aumento do fotoperíodo (Figura 4D). Entretanto, não houve diferenças no acúmulo de amido entre os tratamentos (Figura 4F).

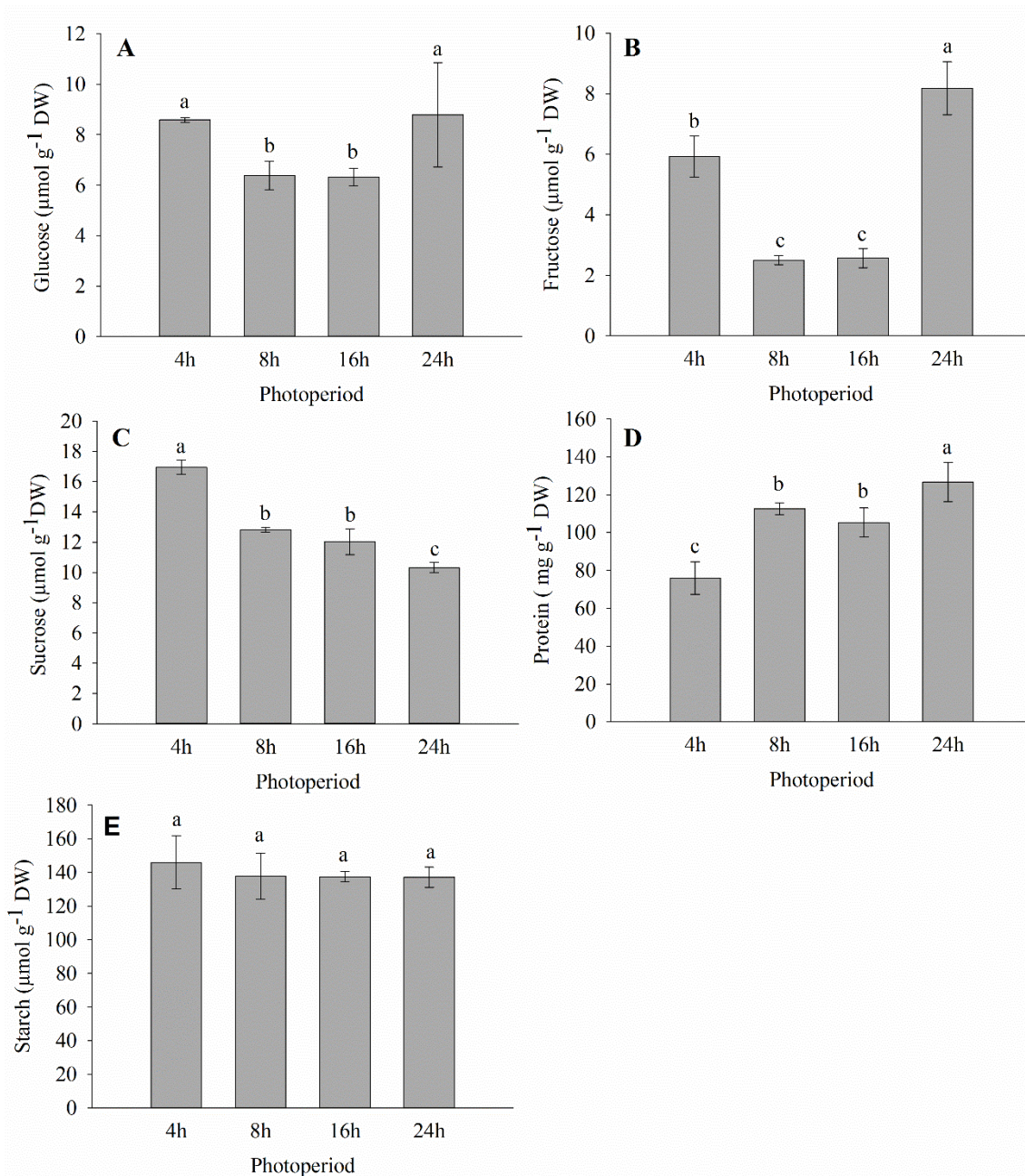


Figura 4. Teores de açúcares, proteína e amido em folhas de *Lippia alba* após 45 dias do cultivo *in vitro* sob diferentes fotoperíodos: 4, 8, 16 e 24 h. (A) Glicose; (B) Frutose; (C) Sacarose; (D) Proteína e (E) Amido. Letras iguais não diferem pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Dados apresentados como média ($n=3$). Barras verticais representam o erro padrão.

O perfil dos óleos essenciais em plantas de *Lippia alba* cultivadas *in vitro* foi modificado pelo fotoperíodo

O fotoperíodo apresentou alterações no perfil da composição dos óleos essenciais em *Lippia alba*. O tratamento com fotoperíodo de 4 h foi limitante para a

detecção dos componentes do óleo essencial, devido à baixa quantidade do material vegetal nas amostras. No entanto, as plantas submetidas à condição de luz ininterrupta (fotoperíodo de 24 h) exibiram aumento significativo no teor de linalol, em relação aos fotoperíodos de 8 e 16 h. Os teores de eucaliptol e germacreno não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 5).

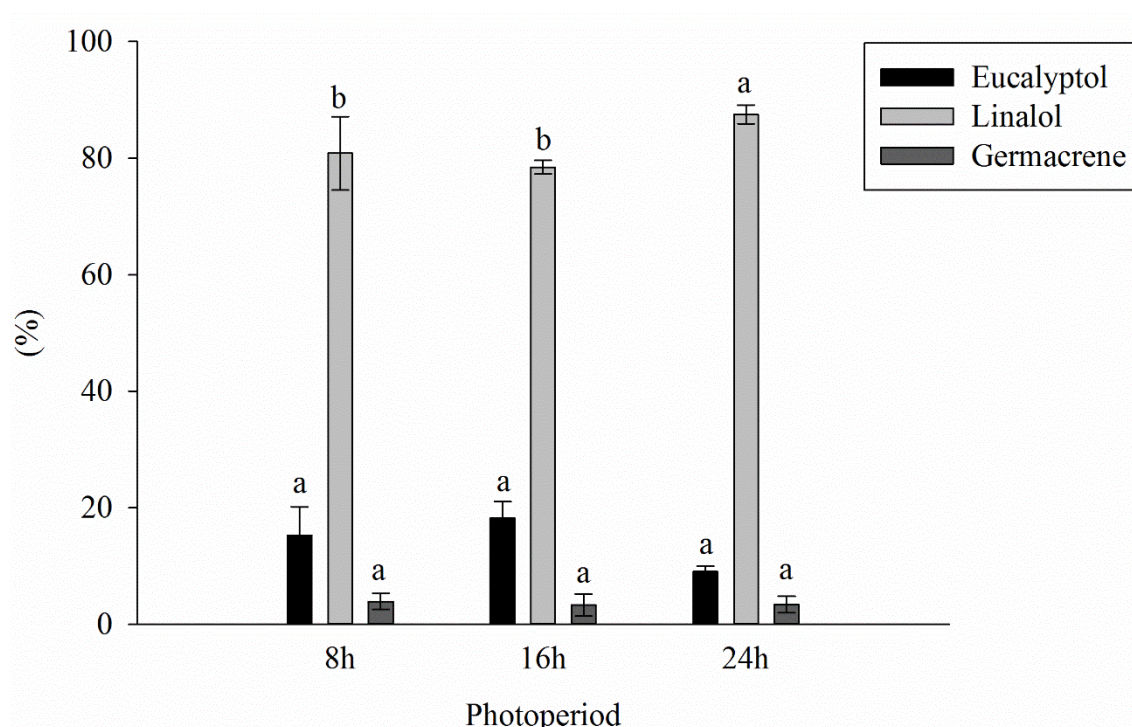


Figura 5. Efeito do fotoperíodo no perfil da composição dos óleos essenciais em *Lippia alba* após 45 dias de cultivo *in vitro*. Médias comparadas pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Dados apresentados como média ($n=3$). Barras verticais representam o erro padrão.

Fotoperíodo mais curto reduziu a capacidade fotossintética e alterou a fluorescência da clorofila *a* em plantas de *L. alba* cultivadas *in vitro*.

A fotossíntese *in vitro* de *L. alba* foi reduzida nas plantas cultivadas no menor fotoperíodo, uma vez que estas exibiram uma diminuição significativa das taxas fotossintéticas comparadas com as cultivadas nos fotoperíodos de 8, 16 e 24 h (Figura 6).

Em relação às reações de fluorescência, o fotoperíodo foi capaz de influenciar a dissipação não-fotoquímica (NPQ) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) na cadeia transportadora de elétrons de plantas de *L. alba*. As plantas cultivadas com fotoperíodo

de 4 h foram capazes de desencadear uma indução de NPQ três vezes superior em comparação a plantas cultivadas com fotoperíodo 24 h. Quanto ao rendimento quântico efetivo do FSII (Fv/Fm) e a dissipação fotoquímica (qP), ambos tratamentos não exibiram diferenças significativas (Figura 6).

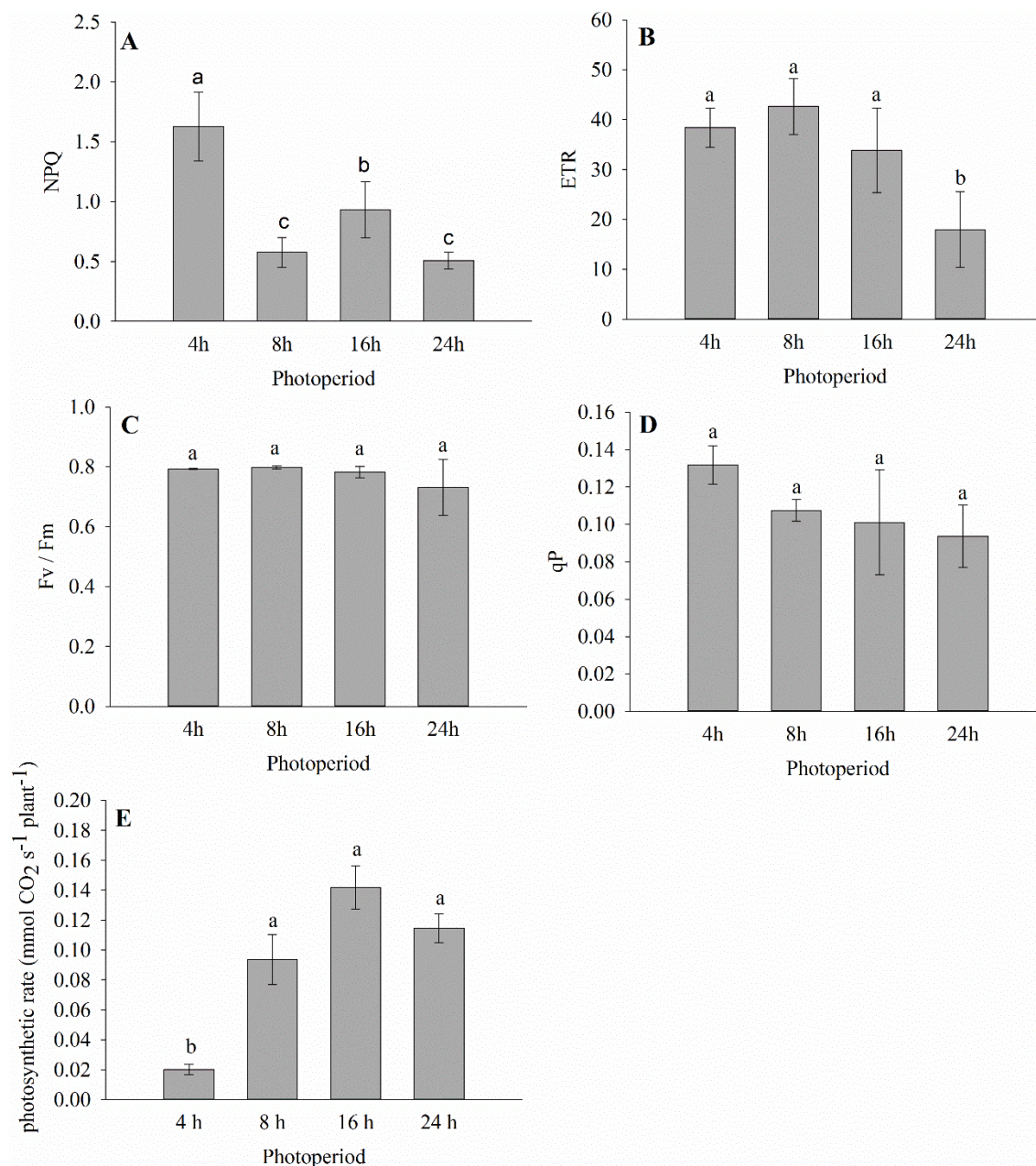


Figura 6. Variáveis fotossintéticas de *Lippia alba* após 45 dias de cultivo *in vitro* sob os fotoperíodos de 4, 8, 16 e 24 h. NPQ (A), ETR (B), Fv/Fm (C), qP (D) e taxa fotossintética (E). Médias comparadas pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Dados apresentados como média ($n=4$). Barras verticais representam o erro-padrão médio. Abreviações – NPQ: dissipação não-fotoquímica; ETR:Taxa de

transporte de elétrons; F_v/F_m : rendimento quântico efetivo do FSII (F_v/F_m); qP: dissipação fotoquímica.

O fotoperíodo alterou os teores dos pigmentos fotossintéticos em *Lippia alba*

Para os pigmentos fotossintéticos, os maiores teores de clorofila total e carotenoides foram observados nos tratamentos de 8, 16 e 24 h (Figura 7D-E). Entretanto, o teor de Chl *a* foi maior no tratamento com fotoperíodo de 24 h quando comparado aos demais (Figura 7A). O maior teor de Chl *b* foi observado no fotoperíodo de 8 h, seguido dos tratamentos de 16 e 24 h, os quais não diferenciaram entre si, e 4 h que apresentou o menor teor (Figura 7B). A razão Chl *a/b* foi maior para o fotoperíodo de 4 h, seguida dos tratamentos de 16 e 24 h, enquanto que o menor valor foi observado no fotoperíodo de 8 h (Figura 7C).

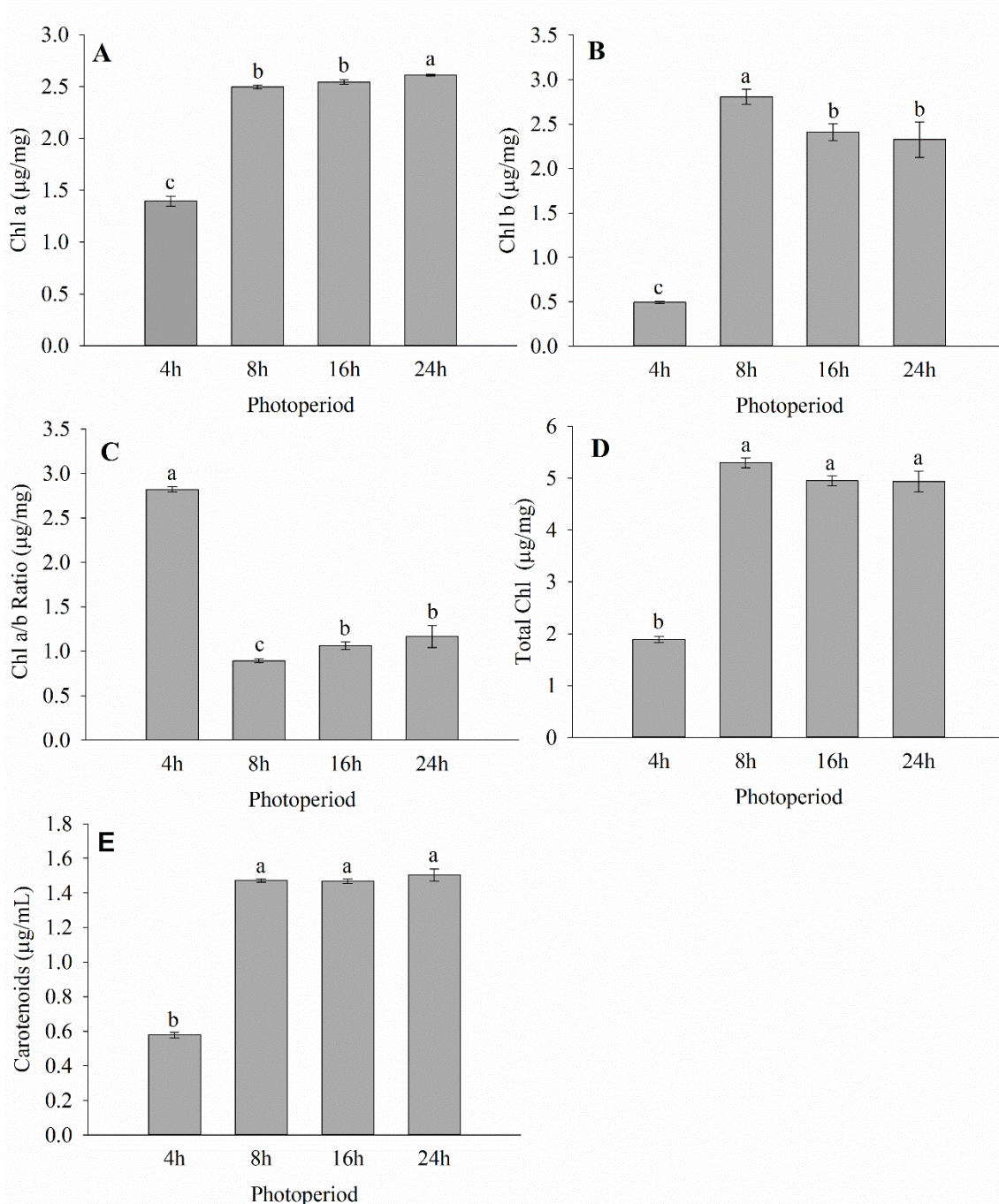


Figura 7. Teor de clorofilas e carotenóides em *Lippia alba* após 45 dias de cultivo *in vitro* sob os fotoperíodos de 4, 8, 16 e 24 h. Médias comparadas pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Dados apresentados como média ($n=6$). Barras verticais representam o erro médio. Abreviações – Chl *a*: clorofila *a*; Chl *b*: clorofila *b*.

O fotoperíodo reduziu a expressão de geranial sintase, mas não alterou os níveis de expressão de nerolidol/linalol sintase e genes do relógio circadiano em *Lippia alba*

LaGES exibiu diminuição significativa na expressão comparada ao controle e aos demais tratamentos. A expressão relativa do *LaNES/LIS* não mostrou significância entre os tratamentos (Figura 8-A, B).

Em relação aos genes do relógio circadiano, as expressões relativas de *LaLHY*, *LaPRR5* e *LaTOC1* não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 8-C, D e E). Os genes *LHY* e *PRR5* apresentaram correlação positiva e significativa em seus níveis de expressão (Figura 8-F).

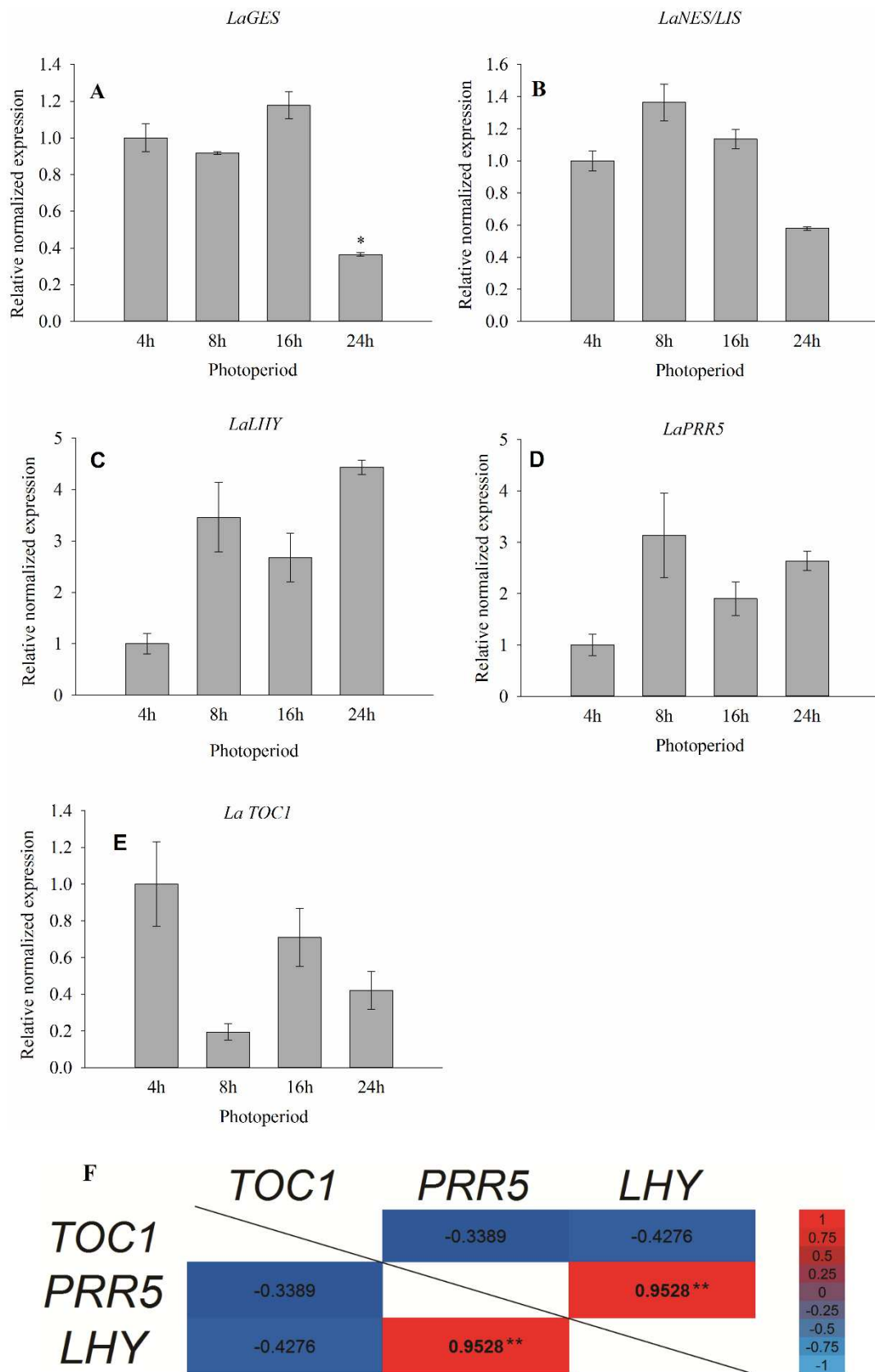


Figura 8. Níveis de expressão dos genes em *Lippia alba* após 45 dias de cultivo *in vitro* sob quatro condições de fotoperíodo: 4, 8, 16 e 24 h e análise de correlação de Pearson.

Genes: *Geraniol sintase (LaGES)*; *Neralidol/Linalol sintase (LaNES/ LIS)*; *Timing of cab expression1 (LaTOC1)*; *Late elongated hypocotyl (LHY)*; *Pseudo response regulator 5 (PRR5)*. Expressão relativa ao gene *álcool desidrogenase (LaADH)*. Dados apresentados como média ($n = 3$) e comparadas através do teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

O crescimento e o desenvolvimento de plantas são influenciados por diversos fatores abióticos, assim como a biossíntese dos óleos essenciais (Ragagninet al. 2014, Batista et al. 2016, Batista et al. 2017a, Lazzarini et al. 2018). Vários trabalhos abordam o quanto fotoperíodo é vital em diferentes processos fisiológicos em plantas (Bordage et al. 2016, Maurya e Bhalerao 2017, Barros et al. 2017, Wang et al. 2018, Song et al. 2018, Mahmud et al. 2018). No entanto, este estudo é o primeiro a investigar o efeito do fotoperíodo no perfil dos óleos essenciais, na expressão dos genes relacionados com a rota de biossíntese dos componentes dos óleos e do relógio circadiano, no crescimento, anatomia, metabolitos primários e na fotossíntese em *Lippia alba*.

Em relação ao metabolismo primário, a exposição aos fotoperíodos mais longos (16 e 24 h) resultou no aumento de massa seca, tanto parte aérea quanto radicular, além de aumentar o comprimento do caule e da raiz. Os dados confirmam que a maior exposição à luz pode ter influenciado positivamente no crescimento das raízes de *L. alba*, como foi observado por Mahmud et al. (2018) ao avaliarem o efeito do fotoperíodo no crescimento e desenvolvimento de raízes de videiras. Baerenfaller et al. (2015) também encontraram maiores médias de áreas foliares em plantas desenvolvidas sob fotoperíodos longos (16 h).

Em contraste, a exposição a fotoperíodos curtos acarretou menor desenvolvimento da área foliar, o que provavelmente permitiu menor desempenho fotossintético, menor concentração de pigmentos fotossintetizantes e fotoprotetores (carotenoides) no tratamento de 4 h. Fréchet et al. (2016) também observaram um declínio na assimilação líquida de CO₂ fotossintético em *Pinus strobus* sob condições de dia curto, sugerindo a importância do fotoperíodo na regulação da fotossíntese.

As variações nas concentrações dos pigmentos fotossintéticos mostraram-se dependentes do tempo de exposição de luz diária, uma vez que o fotoperíodo de 4 h reduziu os conteúdos de clorofilas *a*, *b* e total e aumentou a razão clorofila *a/b*. Resultados semelhantes foram obtidos por Vogg et al. (1998) em *Pinus sylvestris* L.

cujos conteúdos de clorofilas *a*, *b* e total encontraram-se relativamente mais baixos sob dias curtos (9 h) em relação às plantas cultivadas sob dias longos. Além disso, foi observado que o fotoperíodo curto (4 h) incrementou a dissipação não-fotoquímica (NPQ) em relação as plantas cultivadas com fotoperíodo de 24 h. Esse resultado sugere que a entrada de energia fotossintética pode ter excedido sua utilização e estrategicamente a planta aclimata-se aumentando a fração de energia absorvida que é dissipada com o calor (Bilger e Björkman 1990, Maxwell e Johnson 2000). Assim, é provável que haja uma plasticidade fisiológica à baixa exposição da luz, uma vez que rendimento quântico efetivo do FSII (F_v/F_m) e a dissipação fotoquímica (qP) não exibiram diferenças significativas em relação aos demais tratamentos. A taxa de transporte de elétrons (ETR) foi menor no fotoperíodo ininterrupto em relação aos demais fotoperíodos, no entanto este resultado não interferiu negativamente nos processos fisiológicos da planta analisados neste estudo. Shibaeva e Markovskaya (2013) também encontraram menor ETR em fotoperíodo de 24 h em pepino (*Cucumis sativus* L.), em que ressaltam a importância do fotoperíodo na produção agrícola. Desse modo, apesar da diminuição na fotossíntese, área foliar, pigmentos fotossintetizantes e carotenoides, os resultados indicam que *L. alba* é uma espécie com grande capacidade de adaptação a diferentes fotoperíodos.

No fotoperíodo de 4 h, houve redução do teor de proteínas, indicando que o fotoperíodo pode estar regulando a síntese proteica de *L. alba in vitro*. Fréchet et al. (2016) relataram que a redução proteica em fotoperíodos reduzidos pode ocorrer devido a limitação fotossintética. Essa diferença nos níveis de proteína em diferentes fotoperíodos pode auxiliar no crescimento mais acelerado em fotoperíodos longos (Baerenfaller et al. 2015). Os teores dos açúcares glicose e sacarose foram maiores e reduzidos nos fotoperíodos de 4 e 24 h, respectivamente. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Mengin et al. (2017), onde a regulação de sacarose em fotoperíodos curtos levam a uma restrição de crescimento e exportação de carbono durante o dia. Os diferentes fotoperíodos não alteraram os teores de amido em *L. alba in vitro*. Por outro lado, vários estudos observaram aumento no acúmulo de amido quando a duração do fotoperíodo é encurtada (Hädrich et al. 2012, Mengin et al. 2017). Dessa forma, a duração do fotoperíodo em *L. alba in vitro* tem grande influência no metabolismo primário, cujos teores de açúcares e proteínas são importantes no controle do crescimento e desenvolvimento.

O cultivo *in vitro* de *L. alba* em diferentes fotoperíodos afetou a morfogênese, mostrando que fotoperíodos de maiores durações (16 e 24 h) contribuíram para melhor estruturação do mesofilo, caule e raízes e diferenciar tecidos vasculares com feixes mais organizados e de maior calibre. Esses resultados são condizentes com os encontrados por Castro et al. (2005) que reportaram que o tamanho e o arranjo dos feixes vasculares foram menores em fotoperíodos de dias curtos (8 h).

Os fotoperíodos mais curtos não influenciaram a variação no perfil dos óleos essenciais quanto à exposição máxima de luz ininterrupta (24 h), mostrando que o fotoperíodo tem efeito significativo no perfil de óleos essenciais de *L. alba*. Esta variação, com fotoperíodos de dias longos e alta intensidade de luz, também foi relatada antes, com a ativação de genes relacionados à biossíntese de antocianinas promovendo seu acúmulo em folhas de *Malus* spp. (Lu et al. 2015), e também flavonoides, antocianinas, catequinas e flavonóis em *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (Carvalho et al. 2010).

O teor de linalol foi aumentado sob o fotoperíodo de 24 h de luz comparativamente aos períodos de 8, 16 e 24 h. Esse aumento não foi acompanhado pela expressão de *LaNES/LIS*, no entanto os níveis de expressão de *LaGES* foram reduzidos. Possivelmente, o aumento da síntese de linalol esteja relacionado à diminuição da expressão de *LaGES* que por sua vez causou a redução da síntese do geraniol, também classificado como monoterpene. Desse modo, o metabolismo vegetal pode estar direcionando o precursor da rota geraniol pirofosfato (GPP) para a síntese de linalol, causando aumento significativo de seus níveis. Além disso, Viccini et al. (2014) relataram que os principais componentes dos óleos essenciais em *L.alba* estão relacionados com o nível de ploidia sendo que diplóides, triplóides e tetraploides de todos os acessos envolvidos no trabalho são capazes de produzir linalol e citral. No entanto, triploides são pobres em efetuar biotransformação adicional ao citral, sendo predominante na produção de linalol. Desse modo, a redução da expressão de *LaGES* pode estar relacionada a esta incapacidade de biotransformação, visto que o acesso utilizado neste estudo foi um triploide. Ademais, é provável que o fotoperíodo com 24 h tenha causado algum dano oxidativo nos tecidos, que acarretou nessa variação dos níveis de linalol. Vários trabalhos relatam que monoterpenos são eficazes na proteção de plantas contra estresses (térmicos ou oxidativos), nos quais seus níveis são aumentados nessas situações, eliminando espécies reativas de oxigênio e protegendo os sistemas fotossintéticos (Chen et al. 2009, Zuo et al. 2017).

A expressão relativa dos genes do relógio circadiano (*LaLHY*, *LaPRR5* e *LaTOC1*) não mostraram diferenças significativas sob os diferentes fotoperíodos. Apesar de estudos mostrarem que a expressão do *LHY* é reprimida por *PRR5* e *TOC1*, em *L. alba* diferentes fotoperíodos não alteraram a expressão de genes de relógio (Gendron et al. 2012, Huang et al. 2012, Nakamichi et al. 2010). Houve, no entanto, uma co-expressão entre *LaLHY* e *LaPRR5*.

Os resultados aqui encontrados indicam que o fotoperíodo é capaz de modular os metabolismos primário e secundário em plantas de *Lippia alba in vitro*. O fotoperíodo ininterrupto (24 h) proporcionou maior crescimento, organização anatômica do mesofilo, caule, raízes e feixes, pigmentos fotossintéticos, maior taxa fotossintética e maior síntese de proteínas totais. Esses resultados sugerem uma plasticidade fisiológica dessa espécie nos diferentes fotoperíodos com melhor desempenho em dias longos, o que pode estar relacionado com sua demarcada ocorrência em regiões tropicais. Além disso, a biossíntese de linalol, componente majoritário do quimiotipo de *L. alba* utilizado nesse estudo, foi alterado, com a redução da expressão de *LaGES*. Esses resultados permitirão uma melhor compreensão de como o fotoperíodo atua na regulação do metabolismo primário e secundário, o que é de grande importância, visto que é uma espécie valorosa na indústria farmacológica.

REFERÊNCIAS

Adams RP (1997) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 6: 671-672.

Ahmad N, Rab A, Ahmad N (2016) Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). *Journal of Photochemical Photobiology B* 154:51-56

Almeida MC, Pina ES, Hernandez C, Zingaretti SM, Taleb-Contini SH, Salimena F, Slavov SN, Haddad SK, França SC, PereiraAMS, Bertoni BW (2018) Genetic diversity and chemical variability of *Lippia* spp. (Verbenaceae). *BMC Research Notes* 11:725.

Amin B, Hosseinzadeh H (2016) Black cumin (*Nigella sativa*) and its active constituent, thymoquinone: an overview on the analgesic and anti-inflammatory effects. *Planta Medica* 82:8-16.

Andrade MA, Cardoso MG, Batista LR, Mallet ACT, Machado SMF (2012) Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Revista Ciência Agronômica* 43:399-408.

Atarés L, Bonilla J, Chiralt A (2010) Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering* 100:678-687.

Baerenfaller K, Massonnet C, Hennig L, Russenberger D, Sulpice R, Walsh S, Stitt M, Granier C, Gruissem W (2015) A long photoperiod relaxes energy management in *Arabidopsis* leaf six. *Current Plant Biology* 2:34-45.

Barbosa QP, da Câmara CA, Ramos CS, Nascimento DC, Lima-Filho JV, Guimarães EF (2012) Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: a new source of safrole. *Química Nova* 35:1806-1808.

Batista DS, Castro KM, Silva AR, Teixeira ML, Sales TA, Soares LI, Cardoso MG, Santos MO, Viccini LF, Otoni WC (2016) Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 52:276-282.

Batista DS, Castro KM, Koehler AD, Porto BN, Silva AR, Souza VC, Teixeira ML, Cardoso MG, Santos MO, Viccini LF, Otoni WC (2017a) Elevated CO₂ improves growth, modifies anatomy, and modulates essential oil qualitative production and gene expression in *Lippia alba* (Verbenaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 128:357-368.

Batista DS, Dias LLC, Rêgo MMD, Saldanha CW, Otoni WC (2017b) Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. *Ciência Rural* 47:1-6.

Barros PM, Cherian S, Costa M, Sapeta H, Saibo NJM, Oliveira MM (2017) The identification of almond *GIGANTEA* gene and its expression under cold stress, variable photoperiod, and seasonal dormancy. *Biologia Plantarum* 61:631-640.

Benelli G, Pavela R, Giordani C, Casettari L, Curzi G, Cappellacci L, Petrelli R, Maggi F (2018) Acute and sub-lethal toxicity of eight essential oils of commercial interest against the filariasis mosquito *Culex quinquefasciatus* and the housefly *Musca domestica*. *Industrial Crops and Products* 112:668-680.

Bilger W, Bjorkman O (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25:173-185.

Böhme K, Barros-Velázquez J, Calo-Mata P, Aubourg SP (2014) Antibacterial, antiviral and antifungal activity of essential oils: Mechanisms and applications. *Antimicrobial Compounds*. 51-81.

Bordage S, Sullivan S, Laird J, Millar AJ, Nimmo HG (2016) Organ specificity in the plant circadian system is explained by different light inputs to the shoot and root clocks. *New Phytologist* 212:136-149.

Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94:223-253.

Campos JMS, Sousa SM, Silva PS, Pinheiro LC, Sampaio F, Viccini LF (2010) Chromosome numbers and DNA C values in the genus *Lippia* (Verbenaceae). *Plant Systematics and Evolution* 291:133-140.

Carvalho IS, Cavaco T, Carvalho LM, Duque P (2010) Effect of photoperiod on flavonoid pathway activity in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) leaves. *Food Chemistry* 118:384-390.

Chemat F, Maryline A-V, Xavier F (2013) Microwave-assisted extraction of essential oils and aromas. *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds*. Springer: New York, pp 53-68.

Chen JW, Bai KD, Cao KF (2009) Inhibition of monoterpene biosynthesis accelerates oxidative stress and leads to enhancement of antioxidant defenses in leaves of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Acta Physiologiae Plantarum* 31:95.

Costa AC, Rosa M, Megguer CA, Silva FG, Pereira FG, Otoni WC (2014) A reliable methodology for assessing the *in vitro* photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marrubioides* and *Hancornia speciosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 117:443-454.

Cross JM, Von Korff M, Altmann T, Bartzetko L, Sulpice R, Gibon Y, Palacios N, Stitt M (2006) Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology* 142:1574-1588.

Cruz CD (2013) GENES a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum* 3: 271-276

Devlin PF, Kay SA (2000) Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *The Plant Cell* 12:2499-2509.

Dewick PM (2002) *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*. 2nd ed. Baffins Lane, Chichester: England: John Wiley & Sons.

Dodd AN, Salathia N, Hall A, Kévei E, Tóth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ, Webb AAR (2005) Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* 309:630-3.

Farré EM, Harmer SL, Harmon FG, Yanovsky MJ, Kay SA (2005) Overlapping and distinct roles of PRR7 and PRR9 in the *Arabidopsis* circadian clock. *Current Biology* 15:47-54.

Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212:250-263.

Fréchette E, Chang CYY, Ensminger I (2016) Photoperiod and temperature constraints on the relationship between the photochemical reflectance index and the light use efficiency of photosynthesis in *Pinus strobus*. *Tree Physiology* 36:311-324.

Golembeski GS, Imaizumi T (2015) Photoperiodic regulation of florigen function in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists* 13.

Graf A, Schlereth A, Stitt M, Smith AM (2010) Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 107:9458-9463

Gupta SD, Jatothu B (2013) Fundamentals and applications of light emitting diodes (LEDs) in in vitro plant growth and morphogenesis. Plant Biotechnology Reports 7:211-220.

Häkkinen ST, Ritala A, Rischer H, Oksman-Caldentey KM (2013) Medicinal plants engineering of secondary metabolites in cell cultures. In: Christou P, Savin R, Costa-Pierce BA, Misztal I, Whitelaw CBA (eds.) Sustainable Food Production. New York, Springer, pp 1182-1200.

Hädrich N, Hendriks JH, Kötting O, Arrivault S, Feil R, Zeeman SC, Gibon Y, Schulze WX, Stitt M, Lunn JE (2012) Mutagenesis of cysteine 81 prevents dimerization of the APS1 subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase and alters diurnal starch turnover in Arabidopsis thaliana leaves. The Plant Journal, 70:231-242.

Harmer SL (2009) The circadian system in higher plants. Annual Review of Plant Biology 60:357-377.

Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA (2000) Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. Science 290:2110-2113.

Hartmann T (2007) From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry 68:2831-2846.

Haydon MJ, Hearn TJ, Bell LJ, Hannah MA, Webb AA (2013) Metabolic regulation of circadian clocks. In: Seminars in Cell & Developmental Biology 24:414-421.

Hennebelle T, Sahpaz S, Joseph H, Bailleul F (2008) Ethnopharmacology of *Lippia alba*. Journal of Ethnopharmacology 116:211-222.

Hsu PY, Harmer SL (2014) Wheels within wheels: the plant circadian system. Trends in Plant Science 19:240-249.

Huang W, Pérez-García P, Pokhilko A, Millar AJ, Antoshechkin I, Riechmann JL, Mas P (2012) Mapping the core of the Arabidopsis circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science* 336:75-79.

Hyldgaard M, Tina M, Rikke LM (2012) Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 3:12.

Imaizumi T, Kay SA (2006) Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends in Plant Science* 11:550-558.

Ito S, Kawamura H, Niwa Y, Nakamichi N, Yamashino T, Mizuno T (2008). A genetic study of the Arabidopsis circadian clock with reference to the TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (*TOC1*) gene. *Plant and Cell Physiology* 50:290-303.

James AB, Syed NH, Bordage S, Marshall J, Nimmo GA, Jenkins GI, Herzyk P, Brown JW, Nimmo HG (2012) Alternative splicing mediates responses of the Arabidopsis circadian clock to temperature changes. *The Plant Cell* 24:961-981.

Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 27:137.

Kliebenstein DJ (2013) Making new molecules-evolution of structures for novel metabolites in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 16:112-117.

Kooten O, Snel JFH (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research* 25:147-150.

Kroymann J (2011) Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 14:246-251.

LazzariniLES, Bertolucci SKV, Pacheco FV, Santos J, Silva ST, Carvalho AA, Pinto JEBP (2018) Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis*Schauer plant growth and volatile compounds *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 135:367-379.

Livak KJ, Schmittgen TD(2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402-408.

Loudon AS (2012) Circadian biology: a 2.5 billion year old clock. *Current Biology* 22:R570-R571.

Loivamäki M, Louis S, Cinege G, Zimmer I, Fischbach RJ, Schnitzler JP (2007) Circadian rhythms of isoprene biosynthesis in grey poplar leaves. *Plant Physiology* 143:540-551.

Lorenzi H, Matos FJA (2008) *Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 512p.

Lu SX, Knowles SM, Andronis C, Ong MS, Tobin EM (2009) CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL function synergistically in the circadian clock of arabidopsis. *Plant Physiology* 150:834-843.

Mahmud KP, Holzapfel BP, Guisard Y, Smith JP, Nielsen S, Rogiers SY (2018) Circadian regulation of grapevine root and shoot growth and their modulation by photoperiod and temperature. *Journal of Plant Physiology* 222:86-93.

Maurya JP, Bhalerao RP (2017) Photoperiod-and temperature-mediated control of growth cessation and dormancy in trees: a molecular perspective. *Annals of Botany* 120:351-360.

Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51:659-668.

MenginV, Pyl ET, Moraes TA, Sulpice R, Krohn N, Encke B, Stitt M (2017) Photosynthate partitioning to starch in *Arabidopsis thaliana* is insensitive to light intensity but sensitive to photoperiod due to a restriction on growth in the light in short photoperiods. *Plant, Cell & Environment* 40:2608-2627.

Moore BD, Andrew RL, Küheim C, Foley WJ (2014) Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytologist* 201:733-750.

Morais TP, Luz JMQ, Silva SM, Resende RF, Silva AS (2012) Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 14:110-121.

Morais LAS (2009) Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira* 27:50-63.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.

Nakamichi N, Kiba T, Henriques R, Mizuno T, Chua NH, Sakakibara H (2010) Pseudo-response regulators 9, 7, and 5 are transcriptional repressors in the Arabidopsis circadian clock. *Plant Cell* 22:594-605.

Neilson EH, Goodger JQ, Woodrow IE, Møller BL (2013) Plant chemical defense: at what cost? *Trends in Plant Science* 18(5):250-258.

Neffati M, Marzouk B (2008) Changes in essential oil and fatty acid composition in coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves under saline conditions. *Industrial Crops and Products* 28:137-142.

Nohales MA, Kay SA (2016) Molecular mechanisms at the core of the plant circadian oscillator. *Nature Structural and Molecular Biology* 23:1061.

Nusinow DA, Helfer A, Hamilton EE, King JJ, Imaizumi T, Schultz TF, Kay SA (2011) The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* 475:398.

O'Brien TP, Mc Cully ME (1981) *The study of plant structure: principles and selected methods*. Melbourne, Termarcaphi Pty. Ltd

Otoni CG, Espitia PJ, Avena-Bustillos RJ, McHugh TH (2016) Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. *Food Research International* 83:60-73.

Parihar P, Singh R, Singh S, Tripathi DK, Chauhan DK, Singh VP, Prasad SM (2016) Photoreceptors mapping from past history till date. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 162:223-231.

Park DH, Somers DE, Kim YS, Choy YH, Lim HK, Soh MS, Kim HJ, Kay SA, Nam HG (1999) Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the Arabidopsis *GIGANTEA* gene. *Science* 285:1579-1582.

- Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sanches Mata D, Villar A (2001) *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 76:201-214.
- Pavela R, Govindarajan M (2017) The essential oil from *Zanthoxylum monophyllum* a potential mosquito larvicide with low toxicity to the non-target fish *Gambusia affinis*. *Journal of Pest Science* 90:369-378.
- Pereira AA, Cardoso MG, Abreu LR, Morais AR, Guimarães LGL, Salgado APSP (2008) Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Ciência Agrotécnica* 32:887-893.
- Pérez Zamora CM, Torres CA, Nuñez MB (2018). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae species growing in South America. *Molecules* 23:544.
- Pola CC, Medeiros EA, Pereira OL, Souza VG, Otoni CG, Camilloto GP, Soares NF (2016) Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. *Food Packaging and Shelf Life* 9:69-78.
- Proestos C, Lytoudi K, Mavromelanidou OK, Zoumpoulakis P, Sinanoglou VJ (2014) Antioxidant capacity of selected plant extracts and their essential oils. *Antioxidants* 2:11-22.
- Peng Y, Li Y (2014) Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hydrocolloids* 36:287-293.
- Ragagnin RCG, Albuquerque CC, Oliveira FFM, Santos RG, Gurgel EP, Diniz JC Viana FA (2014) Effect of salt stress on the growth of *Lippia gracilis* Schauer and on the quality of its essential oil. *Acta Botanica Brasilica* 28:346-351.
- Rai MK, Kalia RK, Singh R, Gangola MP, Dhawan AK (2011) Developing stress tolerant plants through in vitro selection—an overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany* 71:89-98.

Raut JS, Karuppayil SM (2014) A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 62: 250-264.

Razavizadeh R, Adabavazeh F (2017) Effects of sorbitol on essential oil of *Carum copticum* L. under in vitro culture. *Romanian Biotechnological Letters* 22:12281.

Reis AC, Sousa SM, Vale AA, Pierre PMO, Franco AL, Campos JMS, Vieira RF, Viccini LF (2014) *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae): a new tropical autopolyploid complex? *American Journal Botany* 101:1002-1012.

Salomé PA, McClung CR (2005) PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for temperature responsiveness of the Arabidopsis circadian clock. *The Plant Cell* 17:791-803.

Saljoughian S, Shahin R, Alaa El-Din AB, Ralf G, Alireza O, Nooshin N, Amin MK (2018) The effects of food essential oils on cardiovascular diseases: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58:1688-1705.

Sancho-Knapik D, Sanz MÁ, Peguero-Pina JJ, Niinemets Ü, Gil-Pelegrín E (2017) Changes of secondary metabolites in *Pinus sylvestris* L. needles under increasing soil water deficit. *Annals of Forest Science* 74:24.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671-675.

Searle I, Coupland G (2004) Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *The EMBO Journal* 23:1217-1222.

Serrano-Bueno G, Romero-Campero FJ, Lucas-Reina E, Romero JM, Valverde F (2017). Evolution of photoperiod sensing in plants and algae. *Current Opinion in Plant Biology* 37:10-17.

Shibaeva TG, Markovskaya EF (2013) Growth and development of cucumber *Cucumis sativus* L. in the prereproductive period under long photoperiods. *Russian journal of developmental biology* 44:278-85.

Shin J, Sánchez-Villarreal A, Davis AM, Du SX, Berendzen KW, Koncz C, Ding Z, Li C, Davis SJ (2017) The metabolic sensor AKIN10 modulates the Arabidopsis circadian clock in a light-dependent manner. *Plant, Cell & Environment* 40:997-1008.

Song YH, Shim JS, Kinmonth-Schultz HA, Imaizumi T (2015) Photoperiodic lowering: time measurement mechanisms in leaves. *Annual Review of Plant Biology* 66: 441-464.

Song YH, Kubota A, Kwon MS, Covington MF, Lee N, Taagen ER, Laboy Cintrón D, Hwang DY, Akiyama R, Hodge SK, Huang H, Nguyen NH, Nusinow DA, Millar AJ, Shimizu KK, Imaizumi T (2018) Molecular basis of flowering under natural long-day conditions in *Arabidopsis*. *Nature Plants* 4:824-835.

Staiger D, Green R (2011) RNA-based regulation in the plant circadian clock. *Trends in Plant Science* 16:517-523.

Szopa A, Ekiert H (2016) The importance of applied light quality on the production of lignans and phenolic acids in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. cultures in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 127:115-121.

Szczepanski S, Lipski A (2014) Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Control* 36:224-229.

Taarit MB, Msaada K, Hosni K, Marzouk B (2010) Changes in fatty acid and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under NaCl stress. *Food Chemistry* 119:951-956.

Triozi PM, Ramos-Sánchez JM, Hernández-Verdeja T, Moreno-Cortés A, Allona I, Perales M (2018) Photoperiodic regulation of shoot apical growth in poplar. *Frontiers in Plant Science* 9:1030.

Turek C, Stintzing FC (2013) Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12:40-53.

Vanhove AC, Vermaelen W, Panis B, Swennen R, Carpentier S (2012) Screening the banana biodiversity for drought tolerance: can an in vitro growth model and proteomics be used as a tool to discover tolerant varieties and understand homeostasis. *Frontiers in Plant Science* 3:176.

Viccini LF, Pierre PMO, Praça MM, Souza-Costa DC, Costa Romanel E, Sousa SM, Peixoto PHP, Salimena FRG (2006) Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). *Plant Systematics and Evolution* 256:171-178.

Viccini LF, Silveira, RS, Vale, AA, Campos JMS, Reis, AC, Santos, MO, Campos, VR, Carpanez, AG, Grazul, RM (2014). *Industrial Crops and Products* 59: 14–19.

Vogg G, Heim R, Hansen J, Schäfer C, Beck E (1998) Frost hardening and photosynthetic performance of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. I. Seasonal changes in the photosynthetic apparatus and its function. *Planta* 204:193-200.

Wei Y, Qian-liang M, Bing L, Khalid R, Cheng-Jian Z, Ting H, Lu-ping Q (2016) Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology* 36:215-232.

Welburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144:307-313.

Wagas KK, ErumD, Tanveer A, HammadI, Bushra M (2016) Evaluation of *Ajuga bracteosa* for antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, antidepressant and anticoagulant activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 16:375.

Wang L, Han F, Zheng HQ (2018). Photoperiod-controlling guttation and growth of rice seedlings under microgravity on board Chinese spacelab TG-2. *Microgravity Science and Technology* 1-9.

Weng J, Philippe R, Noel J (2012) The rise of chemodiversity in plants. *Science* 336:1667-1670.

Zuo Z, Wang B, Ying B, Zhou L, Zhang R (2017) Monoterpene emissions contribute to thermotolerance in *Cinnamomum camphora*. *Trees* 31:1759-1771.

CAPÍTULO II

Estresse salino modula crescimento, a morfologia e o perfil do óleo essencial em *Lippia alba* L. (Verbenaceae) cultivada *in vitro*

RESUMO

A salinidade do solo é um dos fatores abióticos que mais impacta a produtividade de plantas agrícolas em todo o mundo. A salinidade como fator abiótico foi relatada também em estudos influenciando a composição dos óleos essenciais em espécies de plantas medicinais. *Lippia alba* possui grande importância nos cenários econômico e social em virtude ao óleo essencial rico em compostos bioativos, os quais tornam essa espécie uma importante planta medicinal utilizada na medicina popular brasileira. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do estresse salino na anatomia, no crescimento, no perfil de óleos essenciais e na expressão de genes relacionados à síntese dos óleos essenciais em *L. alba* cultivada *in vitro*. Para avaliar a influência do estresse salino seguimentos nodais foram cultivados *in vitro* com meio de cultivo MS com adição de cloreto de sódio (NaCl) em quatro concentrações: 0, 30, 60 e 90 mM. Após 40 dias, foram realizadas as análises de crescimento, composição do óleo essencial, e a expressão de genes envolvidos na biossíntese do óleo essencial. O estresse salino afeta negativamente o metabolismo primário de *L. alba*, em que o crescimento, desenvolvimento e atividades fisiológicas foram comprometidas. O metabolismo secundário foi modulado, tendo aumento nos teores de linalol e redução dos teores de eucaliptol em plantas sob estresse salino mais severo (60 mM). Elevadas concentrações de NaCl podem comprometer a fisiologia das plantas no cultivo *in vitro*, entretanto, esta é uma espécie que apresenta plasticidade fisiológica sob estresse salino moderado sendo capaz de crescer e desenvolver e não comprometer a via dos monoterpenos e sesquiterpenos.

Palavras-chave: Cloreto de sódio · eucaliptol · expressão gênica · germacreno · linalol.

ABSTRACT

Soil salinity is one of the most abiotic factors affecting the productivity of agricultural plants worldwide. Salinity as an abiotic factor was also reported in studies influencing the composition of essential oils in medicinal plant species. *Lippia alba* has great importance in the economic and social scenarios due to the essential oil rich in bioactive compounds, which make this species an important medicinal plant used in Brazilian popular medicine. The objective of this work was to evaluate the effect of saline stress on anatomy, growth, essential oils profile and expression of genes related to the synthesis of essential oils in *L. alba* cultured in vitro. To evaluate the influence of saline stress, nodal sequences were cultured in vitro with MS culture medium with addition of sodium chloride (NaCl) in four concentrations: 0, 30, 60 and 90 mM. After 40 days, growth analyzes, essential oil composition, and expression of genes involved in essential oil biosynthesis were performed. Saline stress negatively affects the primary metabolism of *L. alba*, in which growth, development and physiological activities were compromised. Secondary metabolism was modulated, with increase in linalool levels and reduction of eucalyptol contents in plants under more severe salt stress (60 mM). High concentrations of NaCl may compromise the physiology of plants in in vitro culture, however, this is a species that presents physiological plasticity under moderate salt stress being able to grow and develop and not compromise the pathway of monoterpenes and sesquiterpenes.

Key words: Sodium chloride • eucalyptol • gene expression • germacrenol • linalool.

INTRODUÇÃO

A salinidade do solo é um dos fatores abióticos que mais impacta a produtividade de plantas agrícolas em todo o mundo (Rahil et al. 2013, Brito et al. 2014). Mais de 100 países são afetados pelo excesso de sal nos solos, cuja área chega próxima à 1 bilhão de hectares (FAO e ITPS 2015). Diversas são as causas decorrentes do excesso de sal no solo, as quais podem ser de origem natural ou antrópica. A maior parte do excesso de sal nos solos é procedente de causas naturais como erosão do solo, chuvas, sal do oceano e intemperismo das rochas (Munns 2005, Munns e Tester 2008). Dentre as causas provocadas por atividades antrópicas estão o desmatamento e irrigação com água de baixa qualidade (Pitman e Läuchli, 2002).

Entre os sais solúveis, o NaCl é o que apresenta maior solubilidade tornando-se mais difundido no solo (Almeida et al. 2017). Os sais dissolvidos na solução nutritiva do solo podem reduzir a disponibilidade de água livre por efeito osmótico que impede a absorção de água pelas raízes, reduzindo o potencial hídrico da planta, afetando o equilíbrio iônico e conseqüentemente o crescimento (Syvertsen et al. 2014). Além disso, o equilíbrio iônico intra e intercelular é fortemente afetado pelo estresse salino ao promover toxicidade iônica devido ao excesso de íons de sódio e/ou cloreto limitando a absorção de macronutrientes como potássio e cálcio (Chakraborty et al. 2016, Gharsallah et al. 2016, Almeida et al. 2017).

Ao longo da evolução, muitas espécies de plantas desenvolveram diversos mecanismos para adaptação ao estresse salino, seja ele temporário ou até o final do ciclo de vida (Yokoi et al. 2002, Parida e Das 2005). Alguns mecanismos como dormência, síntese de enzimas eliminadoras de radicais livres (peroxidase, catalase, peróxido dismutase e peroxidase ascórbica), ajustes celulares osmóticos com transportadores de H^+ , K^+ e Na^+ e síntese de solutos orgânicos (prolinas) como regulador osmótico e remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram citados (Yokoi et al., 2002, Gharsallah et al. 2016, Mansour e Ali 2017, Almeida et al. 2017). Além disso, compostos orgânicos como carboidratos, proteínas e aminoácidos são sintetizados e acumulados na células vegetais para garantir a homeostase celular (Abraham et al. 2003, Zhifang e Loescher 2003).

Plantas medicinais são ricas em princípios ativos que podem ser amplamente utilizados nas indústrias farmacológica, alimentícia e agroquímica (Böhme et al. 2014, Wagas et al. 2016). Dentre os princípios ativos, os óleos essenciais são citados como

substâncias benéficas com efeitos analgésico, anti-inflamatório, anti-ulcerogênicas, anticonvulsivante, anti-helmínticas, antifúngico e propriedades miorrelaxantes (Aguiar et al. 2008, Hennebelle et al. 2008, Carmona et al. 2013, Oliveira et al. 2014, Raut e Karuppayil 2014, Amin e Hosseinzadeh 2016). Ademais, os óleos essenciais são empregados na conservação de alimentos (Pola et al. 2016, Otoni et al. 2016) e no controle de pragas (Pavela e Govindarajan 2017, Benelli et al. 2018).

Os óleos essenciais são sintetizados, armazenados e secretados por tricomas glandulares (secretores). Os tricomas são pequenas estruturas anatômicas de origem epidérmica localizados em diferentes órgãos das plantas como folhas e caules. Eles são classificados em tricomas glandulares e não-glandulares ou tectores (Schilmiller et al. 2008).

A via de biossíntese dos componentes dos óleos essenciais é dividida em duas vias distintas: via do mevalonato (MEV) e via do metileritritol-fosfato (MEP). A via do MEV ocorre no citosol, onde são sintetizados sesquiterpenos através dos precursores piruvato e acetilcoenzima-A. A via do MEP encontra-se nos plastídios, cujo os precursores dos monoterpenos são piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (Chemat et al. 2013, Pérez et al. 2018).

O gênero *Lippia* abrange mais de 100 espécies distribuídas pela América Latina e África, sendo no Brasil muitas espécies encontradas na Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais e na Chapada Diamantina, na Bahia (Viccini et al. 2006, O'Leary et al. 2012, Almeida et al. 2018). *Lippia alba* (Verbenaceae), é uma espécie que possui grande importância nos cenários econômico e social em virtude do óleo essencial rico em compostos bioativos, os quais torna esta espécie uma importante planta medicinal utilizada na medicina popular brasileira (Pascual et al. 2001, Lorenzi e Matos 2008).

Os metabólitos secundários são frequentemente modulados por vários fatores abióticos (Akula et al. 2011). Fatores abióticos como temperatura, concentrações elevadas de CO₂, qualidade e intensidade de luz já foram apontados por alterar o perfil dos óleos essenciais. (Morais 2009, Ragagnin al. 2014, Batista et al. 2016, Batista et al. 2017a, Lazzarini et al. 2018). A salinidade como fator abiótico também foi relatada em estudos influenciando a composição dos óleos essenciais em espécies de plantas medicinais (Neffati e Marzouk 2008, Taarit et al. 2010, Yadav 2017).

Este trabalho tem como ponto central a importância da *Lippia alba* como uma espécie medicinal e suas respostas do metabolismo primário e secundário ao estresse salino. Dada a importância dos óleos essenciais para a indústria, e que fatores abióticos

podem promover alterações na produção de óleos essenciais é relevante que pesquisas busquem um maior entendimento nesta abordagem, visto que não há estudos sobre a influência do estresse salino no metabolismo e na produção de óleos essenciais nessa espécie. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do estresse salino na anatomia, no crescimento, no perfil de óleos essenciais e na expressão de genes relacionados à síntese dos óleos essenciais em *L. alba* cultivada *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foi utilizado o acesso de *Lippia alba* (BGEN-04) do Banco de Germoplasma do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil), sendo os propágulos provenientes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen, Brasília, DF, Brasil). O acesso foi identificado pela Dra. Fátima Salimena (Departamento de Botânica, UFJF). Os espécimes foram depositados no Herbário Leopold Krieger (Herbário CESJ 48372, UFJF). Os espécimes foram depositados no Herbário Leopold Krieger (Herbário CESJ 48372, UFJF). As plantas foram propagadas *in vitro*, em meio MS (Murashige e Skoog 1962) em sua solução salina original, complexo vitamínico de MS, na ausência de reguladores de crescimento e, 30 g L⁻¹ sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 6,5 g L⁻¹ de ágar Merck® (Merck Millipore Corp, Darmstadt, Alemanha). O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,01. O meio foi autoclavado a 120 °C, 108 kPa de pressão, durante 20 min, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCT II), no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil).

Efeito do estresse salino

Oito segmentos nodais (~ 2 cm de comprimento) foram inoculados em frascos de vidro (600 mL de capacidade), contendo 80 mL de meio de cultura com a formulação salina básica de MS, vitaminas de MS, 30 g L⁻¹ sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 6,5 g L⁻¹ de ágar Merck®. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,01. O meio foi autoclavado a 120 °C e 108 kPa de pressão, durante 20 min. Para avaliar a influência do estresse salino, foi adicionado ao meio de cultivo cloreto de sódio (NaCl) em quatro concentrações: 0, 30, 60 e 90 mM. As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 16h de luz e irradiância de 41 μmol m⁻² s⁻¹

fornecida por duas lâmpadas LED branca (SMD 100 - 18W, Vilux[®], Vitória, ES, Brasil). Os frascos foram vedados com tampas rígidas de polipropileno (TRP) com dois orifícios (10 mm) cobertos com membranas de 0,45 µm (MilliSeal[®] AVS-045 Air Vent) [taxa de troca de CO₂ (TTCO₂): 25 µL L⁻¹ s⁻¹] (Batista et al. 2017b).

Após 40 dias de cultivo, as análises dos metabólitos primários, crescimento, anatomia, perfil dos óleos essenciais, e expressão dos genes envolvidos na rota de biossíntese de sesquiterpenos e monoterpenos foram realizadas. Todas as coletas foram feitas em horário padronizado, às 17 h.

Análises de desenvolvimento

Foram analisadas as seguintes características de desenvolvimento: massa fresca (g), massa seca (g), comprimento total da parte aérea (cm), comprimento total da maior raiz (cm), (%) e área foliar (cm²). A determinação da área foliar foi feita com auxílio do programa ImageJ (Schneider et al. 2012).

Análises anatômicas

Para a caracterização anatômica estrutural, amostras do segundo par de folhas expandidas, caules da região mediana do segundo internódio e raízes principais da região mediana foram fixadas em solução Karnovsky (Karnovsky 1965). Após a fixação, as amostras foram desidratadas em série etílica crescente (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90 e 95%) e incluídas em resina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). As secções transversais de 5 µm de espessura, foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA) e corados com azul de Toluidina (pH 3,2) (O'Brien e McCully 1981). As lâminas foram montadas em resina sintética Permout[®] SP15-500 (Fisher Chemicals- Fisher Scientific). Para a captura de imagens, foi utilizado um microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-photo, acoplado à câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic.

Determinação de pigmentos fotossintéticos e quantificação de carboidratos, proteínas, aminoácidos e amido

Amostras da parte aérea foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente, maceradas e liofilizadas para análise. Para determinação de pigmentos fotossintéticos, aproximadamente 10 mg de tecidos liofilizados foram utilizados para extração com acetona conforme descrito por Welburn (1994). Na determinação dos carboidratos (amido, sacarose, glicose e frutose) 25 mg de tecidos liofilizados foram utilizados na extração com metanol e avaliados conforme descrito por Fernie et al. (2001). A quantificação de proteína e de aminoácidos totais foi conduzida como relatado em Cross et al. (2006).

Microextração dos óleos essenciais

Para a microextração de óleos essenciais, aproximadamente 300 mg de folhas foram coletadas e armazenadas a -18 °C em tubo de ensaio com tampa rosqueável. Após o congelamento, 1,0 mL de hexano e 0,5 mL de metanol foram adicionados a cada amostra. Para acelerar o processo de extração, as amostras foram mantidas em banho de ultrassom (Thornton-INPEC) com frequência de 70 KHz, à temperatura ambiente, por 1 h. Em sequência, o sobrenadante foi filtrado através de uma mecha de algodão estéril. Amostras de 1 µL de solução límpida obtida, contendo os óleos extraídos, foram analisadas por cromatografia gasosa.

Análise qualitativa dos óleos essenciais

A análise qualitativa do óleo essencial procedeu-se com o cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (GCMS-QP2010 Plus; Shimadzu) e coluna Rtx-5MS[®] (Restek) de 30 m x 0,25 mm. Iniciou-se a temperatura do forno com 70 °C, mantida por 3 min, seguida por aumento de 6 °C min⁻¹, até 300 °C. O injetor foi operado no modo 'split' (1:10), à temperatura de 240 °C, e a interface e o detector de massas operaram a 300 °C. Foi utilizado hélio como gás de arraste, com fluxo de 1,53 mL min⁻¹. Uma mistura padrão de hidrocarbonetos lineares (C₉H₂₀; C₁₀H₂₂: ... C₂₅H₅₂ e C₂₆H₅₄) foi injetada nas mesmas condições das amostras. A identificação dos constituintes foi realizada comparando-se os espectros de massa obtidos com os do banco de dados da NIST 9.0 (correlação de > 97%) e confirmado pelo seu índice de

retenção (Índice de Kováts), calculado para cada constituinte, e comparado aos dados na literatura (Adams 1997).

Extração de mRNA, síntese de cDNA e análise por RT-q PCR

O RNA total foi isolado de folhas de *L. alba* com TRIZOL[®] (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) e tratado com DNase I (Invitrogen[®]) seguindo as recomendações dos fabricantes. A quantificação foi feita com NanoDrop ND-2000 (NanoDrop Technologies). A partir de 800 ng de RNA total o cDNA foi sintetizado utilizando transcriptase reversa (Ludwig Biotec[®]). O volume total da reação foi de 10 µL, sendo 1 µL de cDNA, 3 µL de água DEPC (dietilpirocarbonato), 2 µL de primers (*forward* e *reverse*) 4 µM e 4 µL de SYBR-Green mix/Rox (Ludwig Biotec[®], Alvorada, Brasil). A reação de PCR em tempo real (RT- qPCR) foi realizada no equipamento CFX96 Touch[™] (BIO-RAD). Primers dos genes *nerolidol/linalol sintase (LaNES/LIS)*, *geraniol sintase (LaGES)*, *timing of cab expression1 (LaTOC1)*, *pseudo response regulator 5 (LaPRR5)*, *late elongated hypocotyl (LaLHY)* e o gene de referência *álcool desidrogenase (LaADH)* foram desenhados a partir da sequência do transcriptoma *de novo* de *Lippia alba* (Souza et al. 2016 – dados não publicados).

Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, sendo a unidade experimental composta por um frasco de cultivo contendo oito plantas. As análises estatísticas de todos os experimentos foram realizadas por meio do software Genes versão Windows/2004.2.1 (Cruz 2013). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F e as médias comparadas pelos testes de Scott & Knott ($P \leq 0,05$).

Para as análises de RT-qPCR os níveis de expressão foram calculados pelo método $\Delta\Delta C_t$ proposto por (Livak e Schmittgen 2001) com três repetições biológicas e pelo menos três repetições técnicas. As médias foram comparadas pelo teste de Dunnett ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS

O estresse salino interferiu no crescimento, de plantas de *Lippia alba in vitro*

O controle e o tratamento com 30 mM de NaCl apresentaram, respectivamente, maiores valores no acúmulo de massas fresca e seca da parte aérea (Fig. 2A, B) e comprimentos da parte aérea (Figura 2F) em relação ao tratamento com maior concentração de NaCl (60 mM). As raízes (Figura 2C, D e E) não apresentaram diferenças significativas para massa fresca/seca e comprimento. Para área foliar quanto maior foi a concentração de NaCl, menor foi a área foliar total (Figura 2G). O teor de clorofilas totais, não houve diferença entre os tratamentos (Figura 2H). As plantas que foram cultivadas com 90 mM de NaCl no meio não sobreviveram.

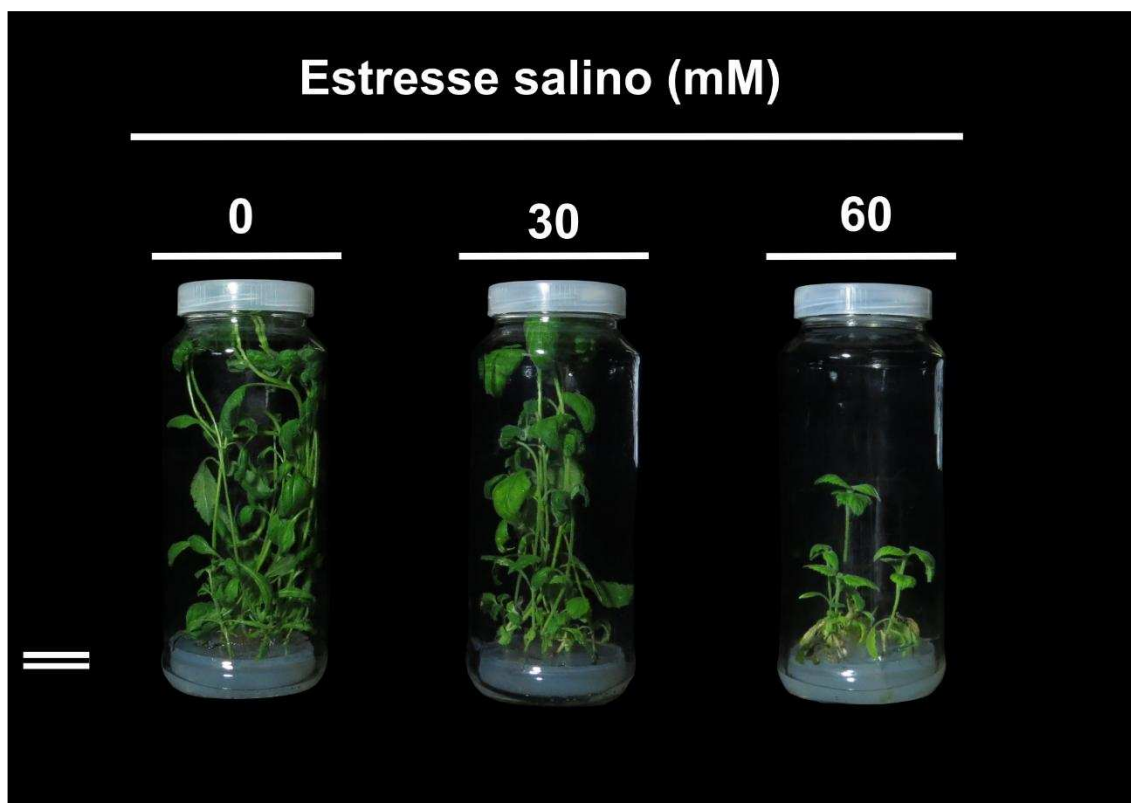


Figura 1. Plantas de *Lippia alba* cultivadas 40 dias *in vitro* sob diferentes concentrações de NaCl (0, 30 e 60 mM). Barra equivale a 2 cm.

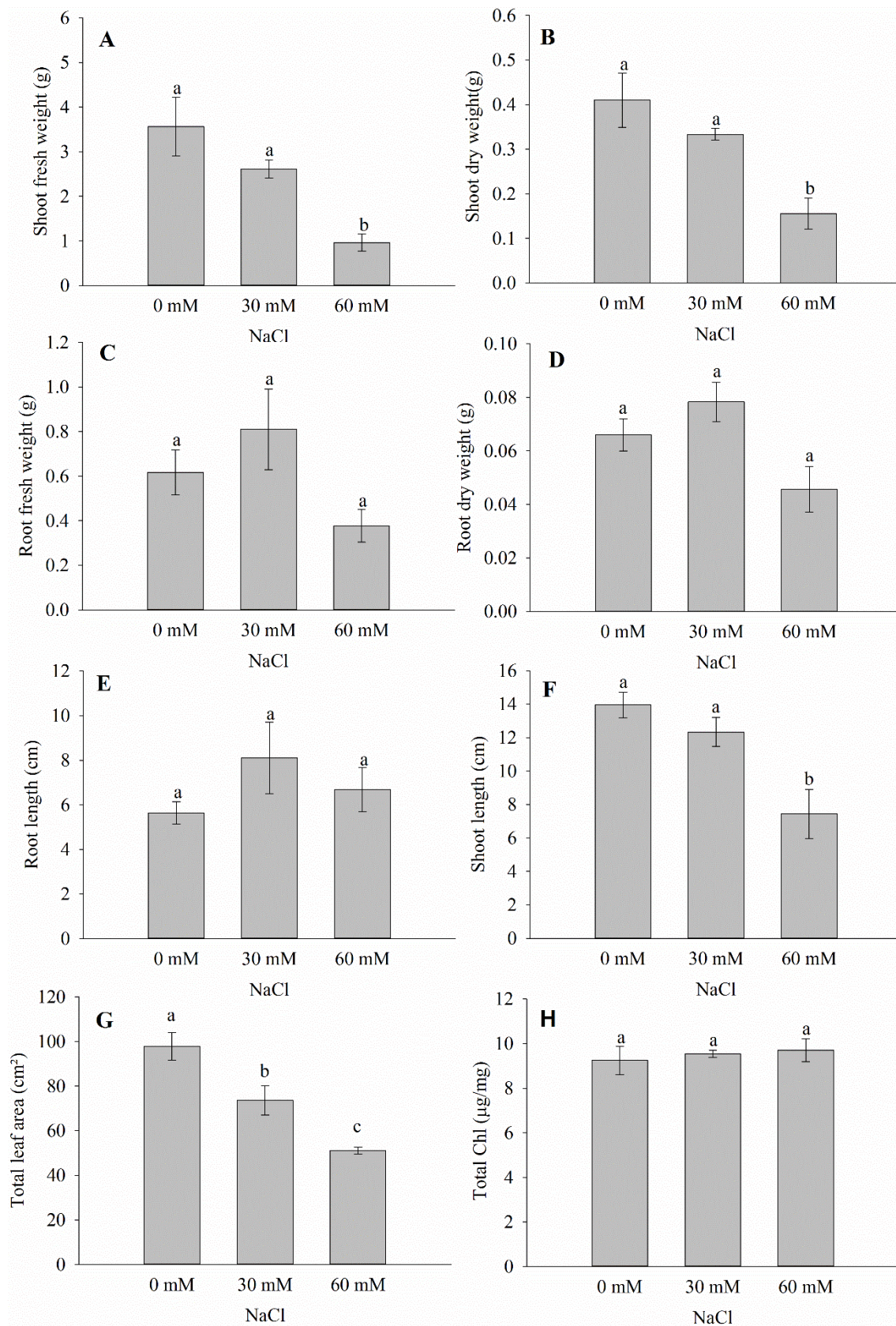


Figura 2. Variáveis de crescimento de plantas de *Lippia alba* cultivadas 40 dias *in vitro* em diferentes concentrações de NaCl (0, 30 e 60 mM). Médias indicadas pelas mesmas

letras não diferem pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Dados apresentados como média ($n=3$). Barras verticais representam o erro padrão.

O estresse salino influenciou na morfoanatomia de *Lippia alba* cultivada *in vitro*

O cultivo *in vitro* de *L. alba* sob estresse salino promoveu variações na anatomia de caules e folhas, sendo nas folhas a maior parte delas (Figura 3). Em relação aos caules, é possível observar redução do número de feixes vasculares conforme o aumento da salinidade (Figura 3-A, D e G).

A região da nervura central das plantas cultivadas sob o estresse salino mais severo (60 mM) evidenciou menor organização celular do mesofilo e dos feixes vasculares em relação aos demais tratamentos.

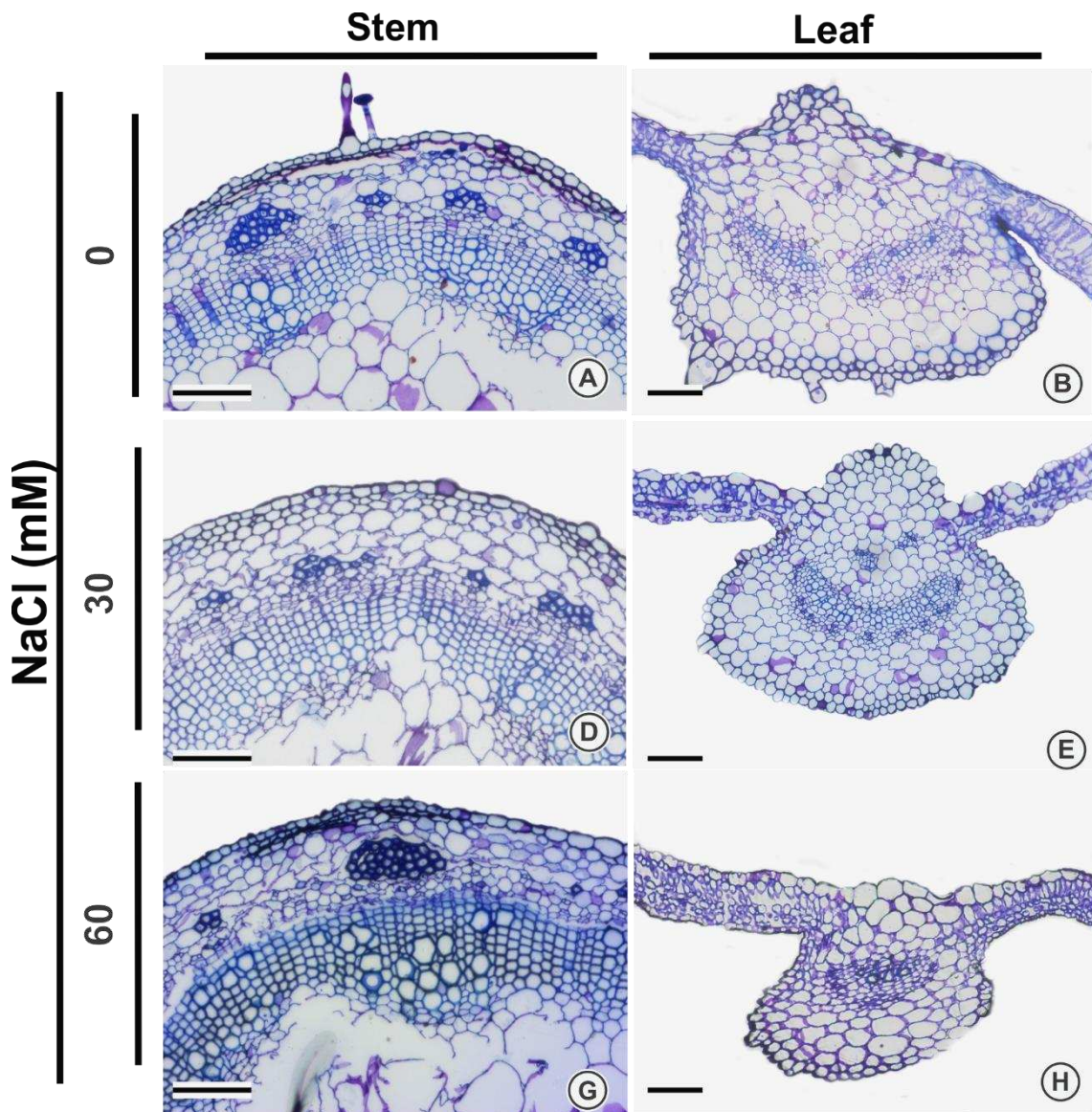


Figura 3. Seções transversais de caules (A, D e G) e nervura central de lâminas foliares (B, E e H) de *Lippia alba* após 40 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de NaCl (0, 30 e 60 mM), e coradas com azul de toluidina. Barras = 10 µm.

O estresse salino reduziu os teores de sacarose e aumentou a síntese proteica em *Lippia alba* cultivada *in vitro*

Os açúcares glicose e frutose não apresentaram diferenças significativas entre as concentrações de NaCl. Entretanto, os teores de sacarose foram reduzidos nos tratamentos com 30 e 60 mM de NaCl. Os teores de proteína total foram maiores no tratamento com 30 mM de NaCl e menores no controle. Para os aminoácidos não se observou diferenças significativa entre os tratamentos.

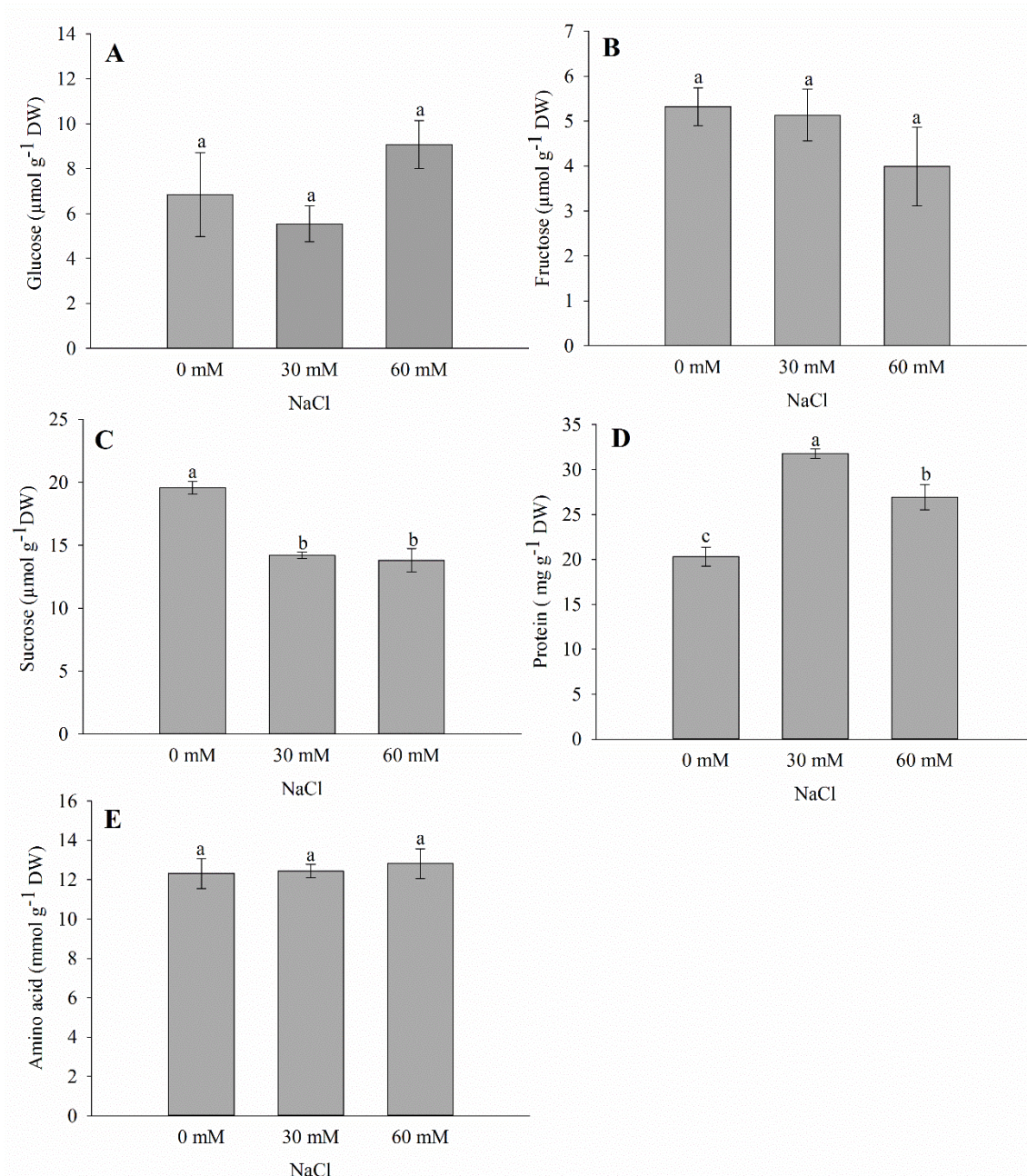


Figura 4. Teores de açúcares, proteína e amido em folhas de *Lippia alba* após 40 dias do cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de NaCl (0, 30, 60 mM). (A) Glicose; (B) Frutose; (C) Sacarose; (D) Proteína e (E) Amido. Letras iguais não diferem pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Dados apresentados como média ($n=4$). Barras verticais representam o erro padrão.

O perfil dos óleos essenciais em plantas de *Lippia alba* cultivadas *in vitro* foi modificado pelo estresse salino

O estresse salino apresentou alterações no perfil da composição dos óleos essenciais em *Lippia alba*. As plantas submetidas à maior concentração de NaCl (60 mM) exibiram aumento significativo no teor de linalol (90,43%), em relação a 0 mM (88,28%) e 30 mM de NaCl (87,37%). Antagonicamente, o teor de eucaliptol foi reduzido na máxima concentração de NaCl. Para o composto germacreno não se observou diferença significativa entre os tratamentos (Figura 5).

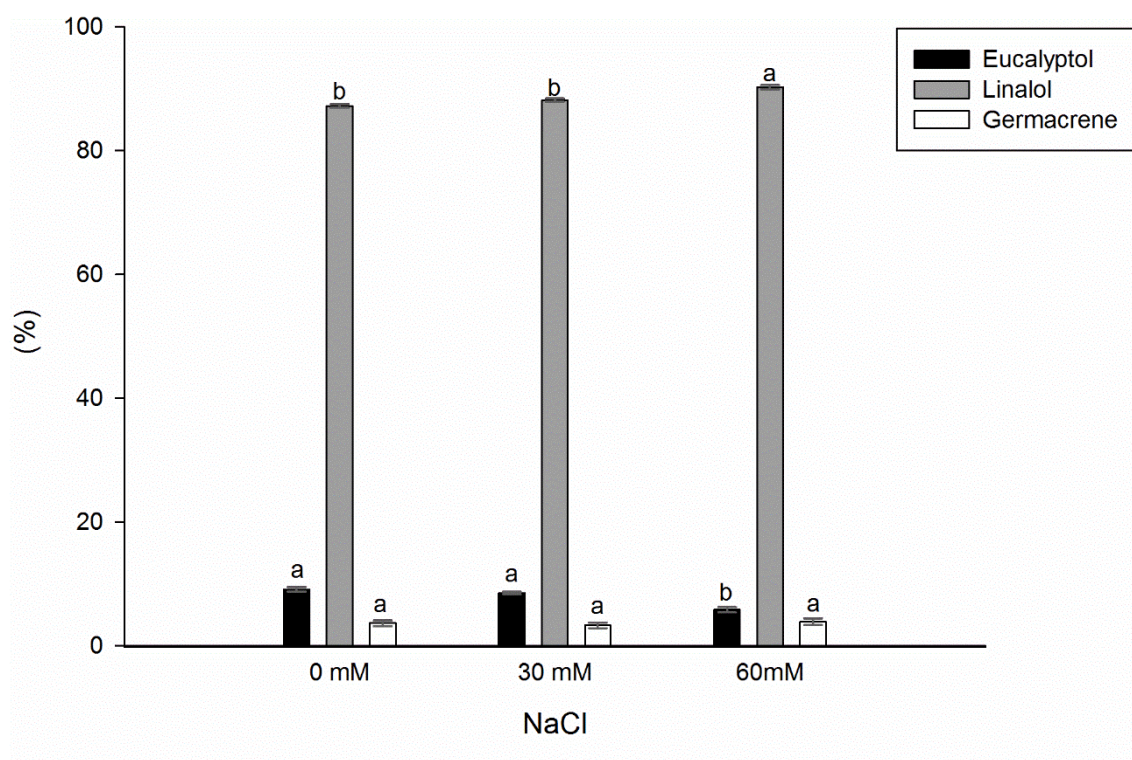


Figura 5. Efeito de concentrações de NaCl (0, 30 e 60 mM) no perfil da composição dos óleos essenciais em *Lippia alba* após 40 dias de cultivo *in vitro*. Médias comparadas pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Dados apresentados como média ($n=4$). Barras verticais representam o erro padrão.

O estresse salino não alterou os níveis de expressão de nerolidol/linalol sintase em *Lippia alba*

Foi avaliada a expressão de genes envolvidos na via de biossíntese de sesquiterpenos e monoterpênicos (Figura 6). A expressão relativa *LaNES/LIS* e *LaGES* não mostraram diferenças significativas entre os diferentes níveis de estresse salino.

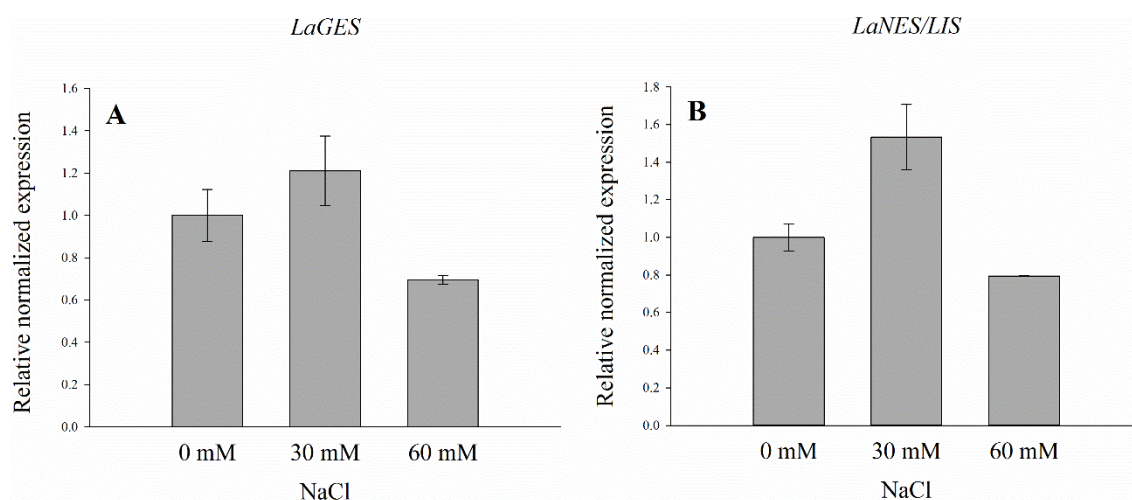


Figura 6. Reação de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) de *Lippia alba* após 40 dias de cultivo *in vitro* sob três concentrações de NaCl: 0, 30 e 60 mM. Genes: *Geranial sintase (LaGES)*; *Neralidol/Linalol sintase (LaNES/ LIS)*. Expressão relativa ao gene *álcool desidrogenase (LaADH)*. Dados apresentados como média (n = 3) e comparadas através do teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

Existem muitos trabalhos na literatura que buscam investigar o efeito de estresse salino no rendimento/composição de óleos essenciais em plantas, entretanto esse trabalho é um dos pioneiros a investigar o efeito de estresse salino na composição do óleo essencial em cultivo *in vitro*. A hipótese de que o estresse salino, dependendo da sua severidade, altera o perfil da composição dos óleos essenciais de *Lippia alba* no cultivo *in vitro* foi confirmada.

A menor concentração de NaCl (30 mM) não afetou os carboidratos como glicose e frutose, aminoácidos, clorofilas, biomassa e o perfil da composição dos óleos essenciais. Entretanto, o estresse salino mais severo (60 mM NaCl) influenciou de forma negativa o crescimento da planta, área foliar, massas fresca e seca, detectando-se

menor concentração de sacarose, o que possivelmente reduz a disponibilidade de assimilados na planta e impacta a biomassa. Ademais, o crescimento reduzido pode ter sido afetado por efeitos iônicos e/ou osmóticos (Balal et al. 2012, Rodriguez-Gamir et al. 2012, Brito et al. 2014, Almeida et al. 2017). Em relação às raízes, o estresse salino moderado não afetou o crescimento e a massa (fresca e seca) no cultivo *in vitro* de *Lippia alba*. Entretanto, em condições *ex vitro*, diversos estudos mencionam a ocorrência da redução do sistema radicular em condições de salinidade. Acredita-se que o menor desenvolvimento das raízes leva a menor absorção de íons como Na^+ e Cl^- que em níveis elevados poderiam causar toxicidade das plantas, prejudicando o crescimento e o desenvolvimento de todo o sistema (González et al. 2012, Brito et al. 2014, Garcia-Sanchez et al. 2014, Syvertsen et al. 2014).

O cultivo *in vitro* de *L. alba* sob o estresse salino afetou negativamente a formação dos tecidos, como a organização do mesofilo, caule e raízes, assim como os feixes vasculares nestes órgãos. Vários trabalhos reportam alterações morfológicas em plantas submetidas ao estresse salino, em que estas são capazes de desenvolver recursos anatômicos com o intuito de resistir e/ou adaptar a tais condições (Romero-Aranda et al. 1998, Navarro et al. 2007, Fernández-García et al. 2014, Acosta-Motos et al. 2017). Dessa forma, *L. alba* não foi capaz de promover mecanismos de adaptação em respostas morfoanatômicas o que sugere ser uma espécie susceptível ao estresse salino.

O teor de proteínas totais foi aumentado em plantas submetidas ao estresse salino em relação as plantas controle. Esta pode ser uma estratégia para manter o potencial osmótico e o equilíbrio iônico com substâncias que sejam compatíveis com o metabolismo celular sem prejudicar outros processos fisiológicos e bioquímicos (Zhifang e Loescher 2003). Além disso, o acúmulo de proteínas pode favorecer a integridade de membranas, proporcionando sobrevivência celular (Dawood e El-Awadi, 2015). Estes resultados de aumento do conteúdo proteico sob estresse salino, também foram encontrados em *Zea mays* L. por Ashraf et al. (2017) e em *Vicia faba* L. por Qados (2011). Por outro lado, houve redução de sacarose quando submetidas ao estresse salino. Vários trabalhos apontam a sacarose como um osmólito regulador para contrabalancear estresses ambientais, assim como outras moléculas orgânicas como prolina, mioinositol, manitol, citrato, lactato, acetato, succinato e oxalato (Liu e Shi 2010, Khalid e Cai 2011, Wang et al. 2011, Slama et al. 2015, Hmidi et al. 2018, Wani et al. 2019).

O estresse salino mais severo (60 mM NaCl), provocou alterações no perfil da composição dos óleos essenciais em relação aos demais tratamentos (0 e 30 mM), promovendo aumento no teor de linalol e redução em eucaliptol. Entretanto esse aumento não foi acompanhado pela expressão de *LaNES/LIS* e *LaGES*. Esta variação, com estresse salino, foi relatada anteriormente, em *Artemisia annua* L. em que o principal componente do óleo essencial, cânfora, foi aumentado em todos os tratamentos com NaCl (50, 100 e 200 mM) em relação as plantas controle (Yadav et al. 2017). Além disso, os autores encontraram aumento significativo no total de monoterpenoides e sesquiterpenoides em condições de estresse salino em todas as fases de desenvolvimento da planta. Resultados semelhantes também foram encontrados por Taarit et al. (2010), quando a exposição a 25-75 mM de NaCl aumentou o rendimento do óleo essencial em *Salvia officinalis*. Neffati e Marzouk (2008), observaram que níveis elevados de salinidade (75 mM) podem reduzir as concentrações dos compostos químicos como (E)-2-decenal e decanal e dodecanal em *Coriandrum sativum* L. Por outro lado, quando submetidos a baixas concentrações (25 mM) de NaCl observou-se aumento destes compostos. Dessa forma, plantas submetidas ao estresse salino podem apresentar variações no perfil da composição dos óleos essenciais.

As plantas utilizam diferentes mecanismos de adaptação sob diferentes condições de estresse abiótico. Vários trabalhos relatam que monoterpenos são eficazes na proteção de plantas contra estresses. Essa ideia parece ser condizente com os resultados encontrados neste trabalho, devido ao aumento de linalol na maior concentração de NaCl (60 mM) (Zuo et al. 2017, Chen et al. 2008). Alguns trabalhos mostram que isoprenoides voláteis têm ação como moléculas sinalizadoras induzidas pelo estresse e podem reagir com espécies reativas de oxigênio para eliminá-las (Santos et al. 2006, Vickers et al. 2009).

A expressão relativa de genes envolvidos na biossíntese do óleo essencial em *L. alba* não foi significativa. No entanto, George et al. (2017) identificaram genes que codificam componentes do óleo essencial de *C. zizanioides* como isoformas de beta-bisaboleno sintase sendo diferencialmente expressos sob estresse salino, em que essa alteração nos padrões de expressão pode contribuir para modular a composição do óleo essencial.

Em conclusão, vemos que o estresse salino prejudicou o desenvolvimento e o metabolismo primário de plantas de *Lippia alba in vitro*, visto que o crescimento,

desenvolvimento e atividades fisiológicas foram comprometidos sob essa condição. O metabolismo secundário também foi afetado, tendo os teores de linalol e eucaliptol sido alterados em plantas sob estresse salino. Esses resultados sugerem uma plasticidade fisiológica dessa espécie sob o estresse salino moderado, visto que concentrações elevadas de NaCl como 90 mM foi capaz de inviabilizar as plantas no cultivo *in vitro*. Por outro lado, também mostram o potencial de plantas de *L. alba* como uma planta medicinal com potencial adaptação a solos afetados pelo estresse salino moderado, sendo capaz de crescer e sintetizar compostos secundários como os óleos essenciais, nestas condições. Ademais, esta plasticidade fisiológica pode estar relacionada com o ambiente em que este acesso foi coletado, na Cadeia do Espinhaço, local onde predominam solos litólicos e com grandes afloramentos rocha.

REFERÊNCIAS

Abraham E, Rigo G, Szekely G, Nagy R, Koncz C, Szabados L (2003) Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*. 51:363-372.

Acosta-Motos J, Ortuño M, Bernal-Vicente A, Diaz-Vivancos P, Sanchez-Blanco M, Hernandez J (2017). Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms. *Agronomy* 7:18.

Adams RP (1997) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 6: 671-672.

Aguiar JS, Costa MCCD, Nascimento SC, Sena KXFR (2008) Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18:436-440.

Ahmad N, Rab A, Ahmad N (2016) Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). *Journal of Photochemical Photobiology B* 154:51-56.

Akula R, Ravishankar GA (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6:1720-1731.

Almeida DM, Oliveira MM, Saibo NJM (2017) Regulation of Na⁺ and K⁺ homeostasis in plants: towards improved salt stress tolerance in crop plants. *Genetics and Molecular Biology* 40:326-345.

Almeida MC, Pina ES, Hernandez C, Zingaretti SM, Taleb-Contini SH, Salimena F, Slavov SN, Haddad SK, França SC, Pereira AMS, Bertoni BW (2018) Genetic diversity and chemical variability of *Lippia* spp. (Verbenaceae). *BMC Research Notes* 11:725.

Amin B, Hosseinzadeh H (2016) Black cumin (*Nigella sativa*) and its active constituent, thymoquinone: an overview on the analgesic and anti-inflammatory effects. *Planta Medica* 82:8-16.

Ashraf MA, Akbar A, Parveen A, Rasheed R, Hussain I, Iqbal M (2018) Phenological application of selenium differentially improves growth, oxidative defense and ion

homeostasis in maize under salinity stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 123:268-280.

Atarés L, Bonilla J, Chiralt A (2010) Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering* 100:678-687.

Balal R, Khan MM, Shahid MA, Mattson NS, Abbas T, Ashfaq M, Garciasanchez F, Ghazanfer U, Gimeno V, Iqbal Z (2012) Comparative studies on the physiobiochemical, enzymatic, and ionic modifications in salt-tolerant and salt-sensitive citrus rootstocks under NaCl stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 137:86-95.

Batista DS, Castro KM, Silva AR, Teixeira ML, Sales TA, Soares LI, Cardoso MG, Santos MO, Viccini LF, Otoni WC (2016) Light quality affects in vitro growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 52:276-282.

Batista DS, Castro KM, Koehler AD, Porto BN, Silva AR, Souza VC, Teixeira ML, Cardoso MG, Santos MO, Viccini LF, Otoni WC (2017a) Elevated CO₂ improves growth, modifies anatomy, and modulates essential oil qualitative production and gene expression in *Lippia alba* (Verbenaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 128:357-368.

Benelli G, Pavela R, Giordani C, Casettari L, Curzi G, Cappellacci L, Petrelli R, Maggi F (2018) Acute and sub-lethal toxicity of eight essential oils of commercial interest against the filariasis mosquito *Culex quinquefasciatus* and the housefly *Musca domestica*. *Industrial Crops and Products* 112:668-680.

Böhme K, Barros-Velázquez J, Calo-Mata P, Aubourg SP (2014) Antibacterial, antiviral and antifungal activity of essential oils: Mechanisms and applications. *Antimicrobial compounds*. pp 51-81.

Brito MEB, Brito KSA, Fernandes PD, Gheyi HR, Suassuna JF, Soares Filho WS, Melo AS, Xavier DA (2014) Growth of ungrafted and grafted citrus rootstocks under saline water irrigation. *African Journal of Agricultural Research* 9:3600-3609.

Carmona F, Angelucci MA, Salesb DS, Chiarattib TM, Honoratoa FB, Bianchi RV, Pereira MAS (2013) *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown hydroethanolic extract of the leaves is effective in the treatment of migraine in women. *Phytomedicine* 20:947-950.

Chakraborty K, Bhaduri D, Meena HN, Kalariya K (2016) External potassium (K⁺) application improves salinity tolerance by promoting Na⁺-exclusion, K⁺-accumulation and osmotic adjustment in contrasting peanut cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry* 103: 143-153.

Chemat F, Maryline A-V, Xavier F (2013) Microwave-assisted extraction of essential oils and aromas. *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds* Springer: New York. 53-68.

Cross JM, Von Korff M, Altmann T, Bartzetko L, Sulpice R, Gibon Y, Palacios N, Stitt M (2006) Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology* 142:1574-1588.

Cruz CD (2013) GENES a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum* 3: 271-276

Dawood MG, El-Awadi ME (2015) Alleviation of salinity stress on *Vicia faba* L. plants via seed priming with melatonin. *Acta Biológica Colombiana* 20:223-235.

FAO and ITPS (2015) Status of the World's Soil Resources (SWSR) – Main Report. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils. 252.

Fernández-García N, Olmos E, Bardisi E, García-De la Garma J, López-Berenguer C, Rubio-Asensio JS (2014) Intrinsic water use efficiency controls the adaptation to high salinity in a semi-arid adapted plant, henna (*Lawsonia inermis* L.) *Journal of Plant Physiology* 171:64-75.

Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212:2 250-263.

Gharsallah C, Fakhfakh H, Grubb D, Gorsane F (2016). Effect of salt stress on ion concentration, proline content, antioxidant enzyme activities and gene expression in tomato cultivars. *AoB Plants*8:plw055

González P, Syvertsen JP, Etxeberria E (2012) Sodium distribution in salt-stressed citrus rootstock seedlings. *HortScience* 47:1504-1511.

George S, Manoharan D, Li J, Britton M, Parida A (2017) Drought and salt stress in *Chrysopogon zizanioides* leads to common and specific transcriptomic responses and may affect essential oil composition and benzyloquinoline alkaloids metabolism. *Current Plant Biology* 11: 12-22.

Hmidi D, Abdelly C, Ashraf M, Messedi D (2018) Effect of salinity on osmotic adjustment, proline accumulation and possible role of ornithine- δ -aminotransferase in proline biosynthesis in *Cakile maritima*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*24: 1017-1033.

Hennebelle T, Sahpaz S, Joseph H, Bailleul F (2008) Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology* 116:211-222.

Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 27:137.

Khalid KA e Cai W (2011) The effects of mannitol and salinity stresses on growth and biochemical accumulations in lemon balm. *Acta Ecologica Sinica* 31:112-120.

LiuJ e Shi DC (2010) Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, inorganic ion and organic acid accumulations of sunflower in responses to salt and salt-alkaline mixed stress. *Photosynthetica* 48:127-134.

Lorenzi H, Matos FJA (2008) Plantas Mediciniais no Brasil - Nativas e Exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 512p.

Mansour MMF, Ali EF, (2017) Evaluation of proline functions in saline conditions. *Phytochemistry* 140:52-68.

Morais TP, Luz JMQ, Silva SM, Resende RF, Silva AS (2012) Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. *Revista Brasileira Plantas Mediciniais* 14:110-121.

Morais LAS (2009) Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira* 27:50-63.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.

Navarro A, Bañón S, Olmos E, Sánchez-Blanco MJ (2007) Effects of sodium chloride on water potential components, hydraulic conductivity, gas exchange and leaf ultrastructure of *Arbutus unedo* plants. *Plant Science* 172:473-480.

Neffati M, Marzouk B (2008) Changes in essential oil and fatty acid composition in coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves under saline conditions. *Industrial Crops and Products* 28:137-142.

O'Brien TP, Mc Cully ME (1981) The study of plant structure: principles and selected methods. Melbourne, Termarcarphi Pty. Ltd

O'Leary N, Denham SS, Salimena F, Múlgura ME (2012) Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. *Botanical Journal of the Linnean Society* 170:197-219.

Oliveira GT, Ferreira JM, Rosa LH, Siqueira EP, Johann S, Lima LA (2014) *In vitro* antifungal activities of leaf extracts of *Lippia alba* (Verbenaceae) against clinically important yeast species. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 47:247-250.

Otoni CG, Espitia PJ, Avena-Bustillos RJ, McHugh TH (2016) Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. *Food Research International* 83:60-73.

Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60:324-349.

Pavela R, Govindarajan M (2017) The essential oil from *Zanthoxylum monophyllum* a potential mosquito larvicide with low toxicity to the non-target fish *Gambusia affinis*. *Journal of Pest Science* 90:369-378.

Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sanches Mata D, Villar A (2001) *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 76:201-214.

Pereira AA, Cardoso MG, Abreu LR, Morais AR, Guimarães LGL, Salgado APSP (2008) Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Ciência Agrotécnica* 32:887-893.

Pérez Zamora CM, Torres CA, Nuñez MB (2018). Antimicrobial Activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae Species Growing in South America. *Molecules* 23:544.

Pitman MG, Läuchli A (2002) Global impact of salinity and agricultural ecosystems. *Salinity: Environment-plants-moleculespp* 3-20

Pola CC, Medeiros EA, Pereira OL, Souza VG, Otoni CG, Camilloto GP, Soares NF (2016) Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. *Food Packaging and Shelf Life* 9:69-78.

Qados AMA (2011) Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 10:7-15.

Rahil M, Hajjeh H, Qanadillo A (2013) Effect of saline water application through different irrigation intervals on tomato yield and soil properties. *Open Journal of Soil Science* 3:143.

Ragagnin RCG, Albuquerque CC, Oliveira FFM, Santos RG, Gurgel EP, Diniz JC Viana FA (2014) Effect of salt stress on the growth of *Lippia gracilis* Schauer and on the quality of its essential oil. *Acta Botanica Brasilica* 28:346-351.

Raut JS, Karuppayil SM (2014) A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 62 250-264.

Rodríguez-Gamir J, Ancillo G, Legaz F, Primo-Millo E, Forner-Giner MA (2012) Influence of salinity on PIP gene expression in citrus roots and its relationship with root

hydraulic conductance, transpiration and chloride exclusion from leaves. *Environmental and Experimental Botany* 78:163-166.

Romero-Aranda R, Moya JL, Tadeo FR, Legaz F, Primo-Millo E, Talon M (1998) Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus: Beneficial and detrimental effects of cations. *Plant Cell & Environment* 21: 1243-1253

Santos LS, Dalmázio I, Eberlin MN, Claeys M, Augusti R (2006) Mimicking the atmospheric OH-radical-mediated photooxidation of isoprene: formation of cloud-condensation nuclei polyols monitored by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20: 2104-2108.

Slama I, Abdelly C, Bouchereau A, Flowers T, Savoure A (2015) Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Annals of Botany* 115:433-447.

Schillmiller AL, Last RL, Pichersky E (2008) Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *The Plant Journal* 54:702-711.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9:7 671-675.

Syvertsen JP, Garcia-Sanchez F (2014). Multiple abiotic stresses occurring with salinity stress in citrus. *Environmental and Experimental Botany* 103:128-137.

Taarit MB, Msaada K, Hosni K, Marzouk B (2010) Changes in fatty acid and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under NaCl stress. *Food Chemistry* 119:951-956.

Vickers CE, Gershenzon J, Lerdau MT, Loreto F (2009) A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nature Chemical Biology* 5:283

Viccini LF, Pierre PMO, Praça MM, Souza-Costa DC, Costa Romanel E, Sousa SM, Peixoto PHP, Salimena FRG (2006) Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). *Plant Systematics and Evolution* 256:171-178.

Wagas KK, ErumD, Tanveer A, HammadI, Bushra M (2016) Evaluation of *Ajuga bracteosa* for antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, antidepressant and anticoagulant activities. BMC Complementary and Alternative Medicine 16:375.

Wang X, Geng S, Ri YJ, Cao D, Liu J, Shi D, Yang C (2011) Physiological responses and adaptive strategies of tomato plants to salt and alkali stresses. Scientia Horticulturae 130:248-255.

Wani AS, Ahmad A, Hayat S, Tahir I (2019) Epibrassinolide and proline alleviate the photosynthetic and yield inhibition under salt stress by acting on antioxidant system in mustard. Plant Physiology and Biochemistry 135:385-394.

Welburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of Plant Physiology 144:307-313.

Yadav RK, Sangwan RS, Srivastava AK, Sangwan NS (2017) Prolonged exposure to salt stress affects specialized metabolites-artemisinin and essential oil accumulation in *Artemisia annua* L.: metabolic acclimation in preferential favour of enhanced terpenoid accumulation accompanying vegetative to reproductive phase transition. Protoplasma 254:505-522.

Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, Ruiz MT, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (2002) Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. The Plant Journal 30:529-539.

Zhifang G, Loescher WH (2003) Expression of a celery mannose 6-phosphate reductase in *Arabidopsis thaliana* enhances salt tolerance and induces biosynthesis of both mannitol and a glucosyl-mannitol dimer. Plant Cell & Environment. 26:275-283.

CAPÍTULO III

O déficit hídrico modula o crescimento, a morfologia e o perfil do óleo essencial em *Lippia alba* L. (Verbenaceae) cultivada *in vitro*

RESUMO

A erva-cidreira [*Lippia alba* (Miller) N.E. Brown] possui importância econômica devido à produção de óleos essenciais, os quais apresentam ação terapêutica na melhoria da qualidade do sono, alívio do estresse, controle de doenças respiratórias, gastrointestinais, anti-inflamatórias e como sedativo natural. Podem também ser utilizados no controle biológico contra diversos patógenos e na conservação de alimentos. O déficit hídrico é um fator abiótico limitante para o crescimento, morfologia, realização de processos fisiológicos e bioquímicos das plantas. Além disso, as plantas podem ter vias de seu metabolismo secundário, como a produção de óleos essenciais, alteradas pela baixa disponibilidade hídrica. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do déficit hídrico no crescimento, fotossíntese, perfil de óleos essenciais e expressão de genes relacionados à biossíntese de óleos essenciais em *Lippia alba* cultivada *in vitro*. Para avaliar a influência do estresse hídrico seguimentos nodais foram cultivados *in vitro* com meio de cultivo MS com adição de polietilenoglicol (PEG) em quatro concentrações: 0, 1, 2 e 3% (m/v). Após 45 dias, foram analisados a taxa fotossintética, análises de avaliação de crescimento, composição do óleo essencial, e a expressão de genes envolvidos na biossíntese do óleo essencial. A *Lippia alba* mostrou-se uma espécie capaz de adaptar em solos com baixa disponibilidade hídrica. O metabolismo primário é afetado com redução do crescimento, área foliar e taxa fotossintética. A limitação hídrica aumentou no conteúdo de aminoácidos e proteínas totais. O metabolismo secundário foi modulado, com aumento nos teores de linalol e redução nos teores de germacreno em plantas sob déficit hídrico. Esses resultados fornecem uma melhor compreensão de como o déficit hídrico modula a síntese de metabolitos primários e secundários em *L. alba*, que demonstra ser uma espécie medicinal com potencial de adaptação a solos com baixa disponibilidade hídrica, sendo capaz de crescer e sintetizar compostos secundários como os óleos essenciais nessas condições.

Palavras-chave: Polietilenoglicol • estresse abiótico • expressão gênica • germacreno • linalol.

ABSTRACT

Lippia alba (Miller) N.E. Brown has a great economic importance due to the production of essential oils, which produce medicinal activities such as improve sleep quality, stress relief, control of respiratory and gastrointestinal diseases, anti-inflammatory and natural sedative. They can also be used in biological control against various pathogens and in food preservation. The water deficit is a limiting abiotic factor for plant growth, morphology, physiological and biochemical processes. In addition, plants may have secondary metabolism features, such as essential oil production, altered by low water availability. The objective of this work was to evaluate the effect of water deficit on growth, photosynthesis, essential oil profile and the expression of genes related to the biosynthesis of these compounds in *L. alba* cultivated *in vitro*. In order to evaluate the influence of water stress nodal segments were cultured *in vitro* with MS culture medium with addition of polyethylene glycol (PEG) in four concentrations: 0, 1, 2 and 3% (m/v). After 45 days, photosynthetic rate, growth evaluation analysis, essential oil composition, and expression of genes involved in essential oil biosynthesis were analyzed. *L. alba* has been shown to be able to adapt to soils with low water availability. The primary metabolism is affected with reduced growth, leaf area and photosynthetic rate. Water limitation increased in the content of amino acids and total proteins. Secondary metabolism was modulated, with increase in linalool levels and reduction in germacrene levels in plants under water deficit. These findings provide a better understanding of how the water deficit modulates the synthesis of primary and secondary metabolites in *L. alba*, showing that it is a medicinal species with potential to adapt in soils with low water availability, being able to grow and synthesize secondary compounds such as the essential oils.

Key words: Polyethylene glycol• abiotic stress• gene expression• germacrene•linalool.

INTRODUÇÃO

Em virtude da sua natureza séssil, as plantas estão constantemente sujeitas a diversos fatores abióticos no ambiente, necessitando reconhecer e criar mecanismos que possam garantir o seu crescimento e desenvolvimento (Barkla et al. 2013).

O déficit hídrico é um fator abiótico limitante para o crescimento, morfologia e para a realização de processos fisiológicos e bioquímicos das plantas (Bosabalidis e Kofidis 2002, Cairns et al. 2012, Wu et al. 2008, Ghotbi-Ravandi et al. 2014, Maatallah et al. 2016, Allahverdiyev et al. 2016, Kumar et al. 2017). O crescimento em particular é comprometido, visto que a baixa disponibilidade hídrica reduz a divisão e o alongamento celular causados pela perda de turgescência (Lawlor e Cornic 2002, Ge et al. 2012, Jaleel et al. 2008). Além disso, há formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) como radicais superóxido, oxigênio simples, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio, que podem afetar o metabolismo celular prejudicando a síntese de proteínas, ácidos nucleicos, enzimas e lipídeos (Mittler et al. 2004, Ozhur et al. 2009, Xie et al. 2016). A atividade fotossintética é também limitada pela escassez hídrica. Plantas sob o déficit hídrico utilizam como estratégia o fechamento estomático, restringindo a perda de água por transpiração, reduzindo a difusão de CO₂ nos espaços intercelulares para o cloroplasto e afetando a fotossíntese (Flexas et al 2004, Chaves et al. 2009, Li et al. 2017).

Respostas celulares e fisiológicas adaptativas à limitação hídrica são utilizadas pelas plantas como estratégia para amenizar os danos celulares e permitir uma adaptação a esta condição. Dentre elas, a biossíntese e acúmulo de solutos orgânicos como prolina, que desempenha papel importante no ajuste osmótico (Hasegawa et al, 2000, Merwad et al. 2018) e síntese de enzimas eliminadoras de radicais livres como peroxidase, catalase, peróxido dismutase e peroxidase ascórbica (Sofa et al. 2015). Além destas, é observado também regulação hormonal através dos fito-hormônios como o ácido abscísico (ABA), citocininas, ácido giberélico, auxinas e etileno (Sharp 2002, Wilkinson et al. 2010, Du et al. 2010, Peleng et al. 2011, Xuemei et al. 2011, Wilkinson et al. 2012).

O metabolismo secundário das plantas também é modulado pelo déficit hídrico, especialmente em plantas aromáticas e medicinais. Muitos trabalhos mostram que a limitação da disponibilidade de água em plantas altera a qualidade e a quantidade dos

óleos essenciais (Petropoulos et al. 2008, Mandoulakani et al. 2017, Morshedloo et al. 2017, Yadav et al. 2014).

A via de biossíntese dos componentes dos óleos essenciais é dividida em duas vias distintas: via do mevalonato (MEV) e via do metileritritol-fosfato (MEP). A via do MEV ocorre no citosol, onde são sintetizados sesquiterpenos através dos precursores piruvato e acetilcoenzima-A. A via do MEP encontra-se nos plastídios, cujo os precursores dos monoterpenos são o piruvato e o gliceraldeído-3-fosfato (Chemat et al. 2013, Pérez et al. 2018).

Encontrado em vários ambientes, o gênero *Lippia* é distribuído principalmente na América Latina, no continente Africano e no Brasil em Minas Gerais, na Cadeia do Espinhaço e Bahia, na Chapada Diamantina (Viccini et al. 2006, O'Leary et al. 2012, Almeida et al. 2018). *Lippia alba* (Verbenaceae), é uma espécie que possui grande importância nos cenários econômico e social em virtude ao óleo essencial rico em compostos bioativos que conferem inúmeros benefícios para a saúde e atuam na prevenção e no combate a diversas doenças, entre elas, doenças cardiovasculares, bronquite, tosse, asma, distúrbios estomacais e intestinais (Pascual et al. 2001, Lorenzi e Matos 2008, Raut e Karuppaiyil 2014, Amin e Hosseinzadeh 2016, Saljoughian et al. 2018). No setor alimentício, pode ser utilizada na conservação de alimentos (Szczepanski e Lipski 2014, Peng e Li 2014, Otoni et al. 2016, Pola et al. 2016) e na indústria agroquímica tem ação no controle de pragas (Pavela e Govindarajan 2017, Benelli et al. 2018). Desse modo, a espécie torna-se importante, desde à medicina popular brasileira até indústrias farmacológicas e agroquímicas.

Visto que os óleos essenciais têm papel importante frente a diversos cenários econômicos e sociais faz-se necessário entender como diferentes ambientes podem alterar a sua produção, assim como suas rotas de biossíntese. Embora *L. alba* seja uma importante espécie medicinal, pesquisas que relacionem fatores abióticos como o déficit hídrico, na modulação do metabolismo primário e secundário, em especial os óleos essenciais, são escassos. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do déficit hídrico no crescimento, fotossíntese, no perfil de óleos essenciais e na expressão de genes relacionados à síntese de óleos essenciais em *L. alba* cultivada *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foi utilizado o acesso de *Lippia alba* (BGEN-04) do Banco de Germoplasma do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil), sendo os propágulos provenientes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen, Brasília, DF, Brasil). O acesso foi identificado pela Dra. Fátima Salimena (Departamento de Botânica, UFJF). Os espécimes foram depositados no Herbário Leopold Krieger (Herbário CESJ 48372, UFJF). As plantas foram propagadas *in vitro*, em meio MS (Murashige e Skoog 1962) em sua solução salina original, complexo vitamínico de MS, na ausência de reguladores de crescimento e, 30 g L⁻¹ sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 6,5 g L⁻¹ de ágar Merck® (Merck Millipore Corp, Darmstadt, Alemanha). O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,01$. O meio foi autoclavado a 120 °C, 108 kPa de pressão, durante 20 min, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCT II), no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil).

Efeito do déficit hídrico

Oito segmentos nodais (~ 2 cm de comprimento) foram inoculados em frascos de vidro (600 mL de capacidade), contendo 80 mL de meio de cultura com a formulação salina básica de MS, vitaminas de MS, 30 g L⁻¹ sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 6,5 g L⁻¹ de ágar Merck®. O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,01$. O meio foi autoclavado a 120 °C e 108 kPa de pressão, durante 20 min. Para avaliar a influência do déficit hídrico, foi adicionado ao meio de cultivo polietilenoglicol (PEG) em três concentrações: 0, 1, 2 e 3% (m/v). As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 16h de luz e irradiância de 41 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por duas lâmpadas LED branca (SMD 100 - 18W, Vilux®, Vitória, ES, Brasil). Os frascos foram vedados com tampas rígidas de polipropileno (TRP) com dois orifícios (10 mm) cobertos com membranas de 0,45 μm (MilliSeal® AVS-045 Air Vent) que permitem uma taxa de troca de CO₂ de 25 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ (Batista et al. 2017b).

Após 40 dias de cultivo, foram realizadas análises dos metabolitos primários, crescimento, anatomia, perfil dos óleos essenciais, e expressão dos genes envolvidos na rota de biossíntese de sesquiterpenos e monoterpenos. Todas as coletas foram feitas em horário padronizado, às 17h.

Análises de desenvolvimento

Foram analisadas as seguintes características de desenvolvimento: massa fresca (g), massa seca (g), comprimento total da parte aérea (cm), comprimento total da maiorraiz (cm), (%) e área foliar (cm²). A determinação da área foliar foi feita com auxílio do programa ImageJ (Schneider et al. 2012).

Determinação de pigmentos fotossintéticos e quantificação de carboidratos, proteínas e aminoácidos

Amostras da parte aérea foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente, maceradas e liofilizadas para análise. Para determinação de pigmentos fotossintéticos, aproximadamente 10 mg de tecidos liofilizados foram utilizados para extração com acetona conforme descrito por Welburn (1994). Na determinação dos carboidratos (sacarose, glicose e frutose) 25 mg de tecidos liofilizados foram utilizados na extração com metanol e avaliados conforme descrito por Fernie et al. (2001). A quantificação de proteína e de aminoácidos totais foi conduzida como relatado em Cross et al. (2006).

Microextração dos óleos essenciais

Para a microextração de óleos essenciais, aproximadamente 300 mg de folhas foram coletadas e armazenadas a -18 °C em tubo de ensaio com tampa rosqueável. Após o congelamento, 1,0 mL de hexano e 0,5 mL de metanol foram adicionados a cada amostra. Para acelerar o processo de extração, as amostras foram mantidas em banho de ultrassom (Thornton-INPEC) com frequência de 70 KHz à temperatura ambiente por 1 h. Em sequência, o sobrenadante foi filtrado através de 100 mg de sulfato de sódio anidro e uma mecha de algodão estéril em uma pipeta Pasteur de vidro. 1 µL de solução límpida obtida contendo os óleos extraídos foi analisado por cromatografia gasosa.

Análise qualitativa dos óleos essenciais

A análise qualitativa do óleo essencial foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (GCMS-QP2010 Plus; Shimadzu) e coluna Rtx-5MS[®] (Restek) de 30 m x 0,25 mm. Iniciou-se a temperatura do forno com 70 °C, mantida por 3 min, seguida por aumento de 6 °C min⁻¹, até 300 °C. O injetor foi operado no modo 'split' (1:10), à temperatura de 240 °C, e a interface e o detector de

massas operaram a 300 °C. Utilizou-se hélio como gás de arraste, com fluxo de 1,53 mL min⁻¹. Uma mistura padrão de hidrocarbonetos lineares (C₉H₂₀; C₁₀H₂₂: ... C₂₅H₅₂ e C₂₆H₅₄) foi injetada nas mesmas condições das amostras. A identificação dos constituintes foi realizada comparando-se os espectros de massa obtidos com os do banco de dados da NIST 9.0 (correlação de > 97%) e confirmado pelo seu índice de retenção (Índice de Kováts), calculado para cada constituinte, e comparado aos dados na literatura (Adams 1997).

Extração de mRNA, síntese de cDNA e análise por RT-q PCR

O RNA total foi isolado com TRIZOL[®](Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) e tratado com DNase I (Invitrogen[®]) seguindo as recomendações dos fabricantes. A quantificação foi feita com NanoDrop ND-2000 (NanoDrop Technologies). A partir de 800 ng de RNA total o cDNA foi sintetizado utilizando transcriptase reversa (Ludwig Biotec[®]). O volume total da reação foi de 10 µL, sendo 1 µL de cDNA, 3 µL de água DEPC (dietilpirocarbonato), 2 µL de primers (*forward* e *reverse*) 4 µM e 4 µL de SYBR-Green mix/Rox (Ludwig Biotec[®], Alvorada, Brasil). A reação de PCR em tempo real (RT- qPCR) foi realizada no equipamento CFX96 Touch[™] (BIO-RAD), usando qPCR-SYBR-Green mix/Rox (Ludwig Biotec[®], Alvorada, RS, Brasil). As reações foram realizadas em triplicatabiológica e duplicata técnica, em um volume de reação de 10 µL (4 µL de SYBR-Green, 1 µL (4 µM) de cada primer, 2 µL de água tratada com dietilpirocarbonato e 1 µL (40 ng) de cDNA. Os ciclos de reação foram: 2 min a 50 °C e 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 95°C por 16 se 60°C por 60 s, e a curva de dissociação de 60 a 95 °C a 0,1 °C s⁻¹. O método comparativo (2^{-ΔΔCt}) (Livak e Schmittgen 2001) foi aplicado para calcular as diferenças de expressão do gene alvo. Os primers dos genes *nerolidol/linalol sintase (LaNES/LIS)*, *geraniol sintase (LaGES)* e o gene de referência *álcool desidrogenase (LaADH)* foram desenhados a partir da sequência do transcriptoma *de novo* de *Lippia alba* (Souza et al. 2016 – dados não publicados).

Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, sendo a unidade experimental composta por um frasco de cultivo contendo oito plantas. As análises estatísticas de todos os experimentos foram realizadas por meio do software Genes

versão Windows/2004.2.1 (Cruz 2013). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F e as médias comparadas pelos testes de Scott & Knott ($P \leq 0,05$). Para as análises de RT-qPCR as médias dos níveis de expressão foram comparadas pelo teste de Dunnett ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS

O déficit hídrico interferiu no crescimento de plantas de *Lippia alba in vitro*

O déficit hídrico afetou o crescimento e o desenvolvimento de *Lippia alba in vitro* (Figura 1). O controle apresentou maior valor no acúmulo de massa fresca e seca da parte aérea em relação aos demais tratamentos (Figura 2 e B). Os valores de área foliar foram maiores no controle e no tratamento menos severo de déficit hídrico (1% PEG (m/v)) em relação aos tratamentos 2 e 3% PEG (m/v) (Figura 2G). No entanto, parâmetros de crescimento como massa fresca/seca e comprimento das raízes (Figura 2C, D e F), comprimento do caule (Figura 2E), e teor de clorofilas totais (Figura 2H) não apresentaram diferenças significativas.

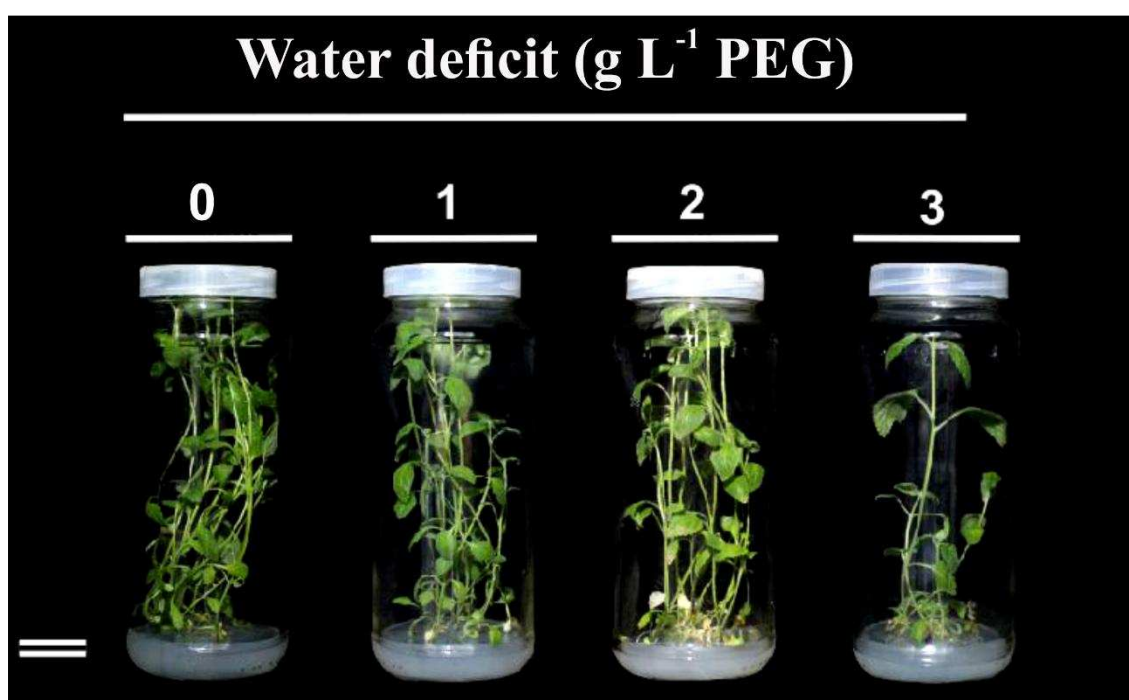


Figura 1. Parâmetros de crescimento de *Lippia alba* avaliados após 40 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes concentrações de PEG 0, 1, 2 e 3% (m/v). Barra equivale a 2 cm.

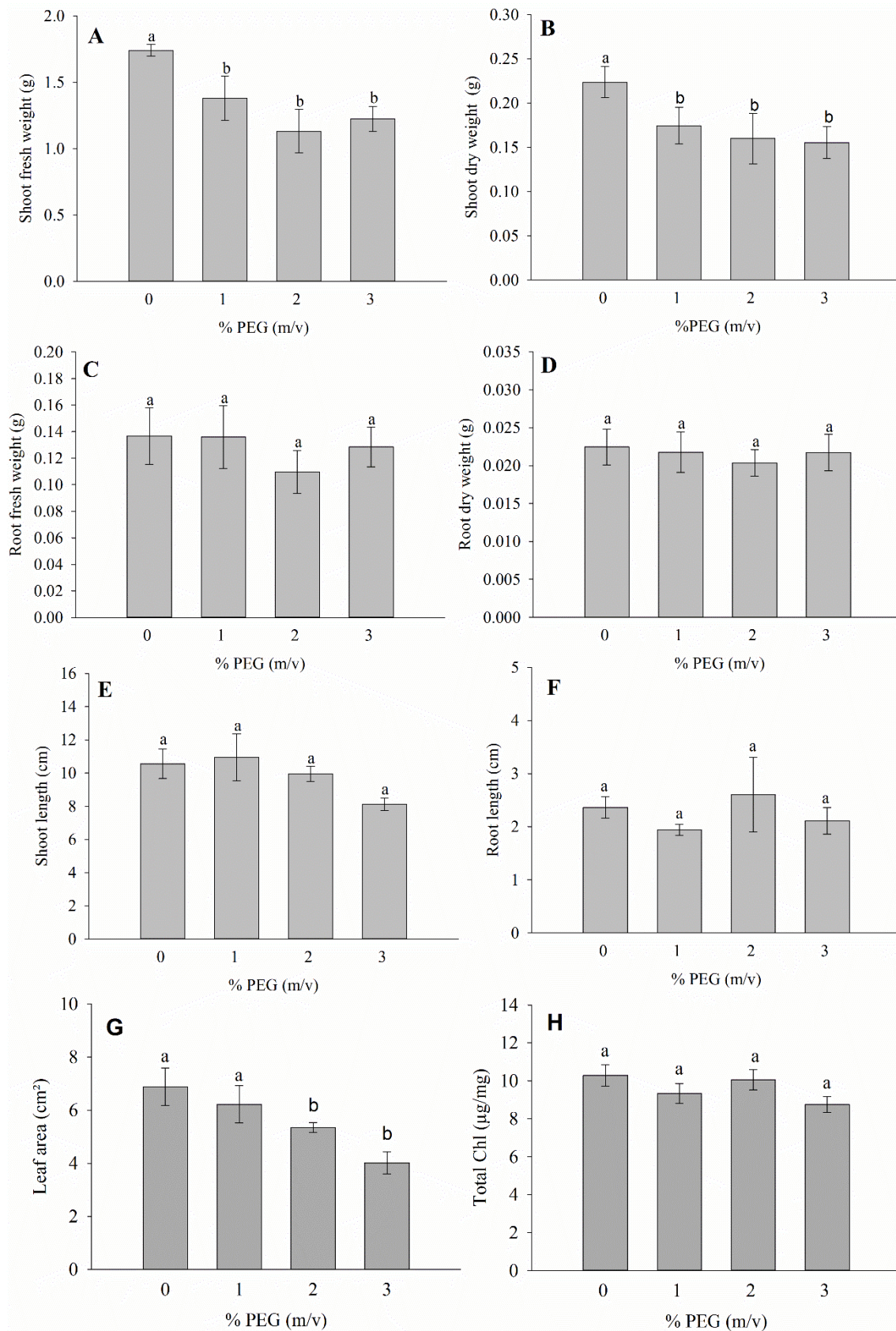


Figura 2. Variáveis de crescimento de plantas de *Lippia alba* cultivadas 40 dias *in vitro* sob diferentes concentrações de PEG 0, 1, 2 e 3% (m/v). Médias indicadas pelas

mesmas letras não diferem pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Dados apresentados como média ($n=4$).

O Déficit hídrico promove aumento de proteínas totais e aminoácidos, mas não alterou os níveis de açúcares em *Lippia alba* cultivada *in vitro*

Os níveis de glicose, frutose e sacarose não obtiveram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 3A, B e C). Em contraste, proteínas totais foram aumentadas nos tratamentos mais severos de déficit hídrico (2 e 3% PEG (m/v) (Figura 3D).

Os níveis de aminoácidos foram maiores em 2% de PEG (m/v) comparado com os demais tratamentos.

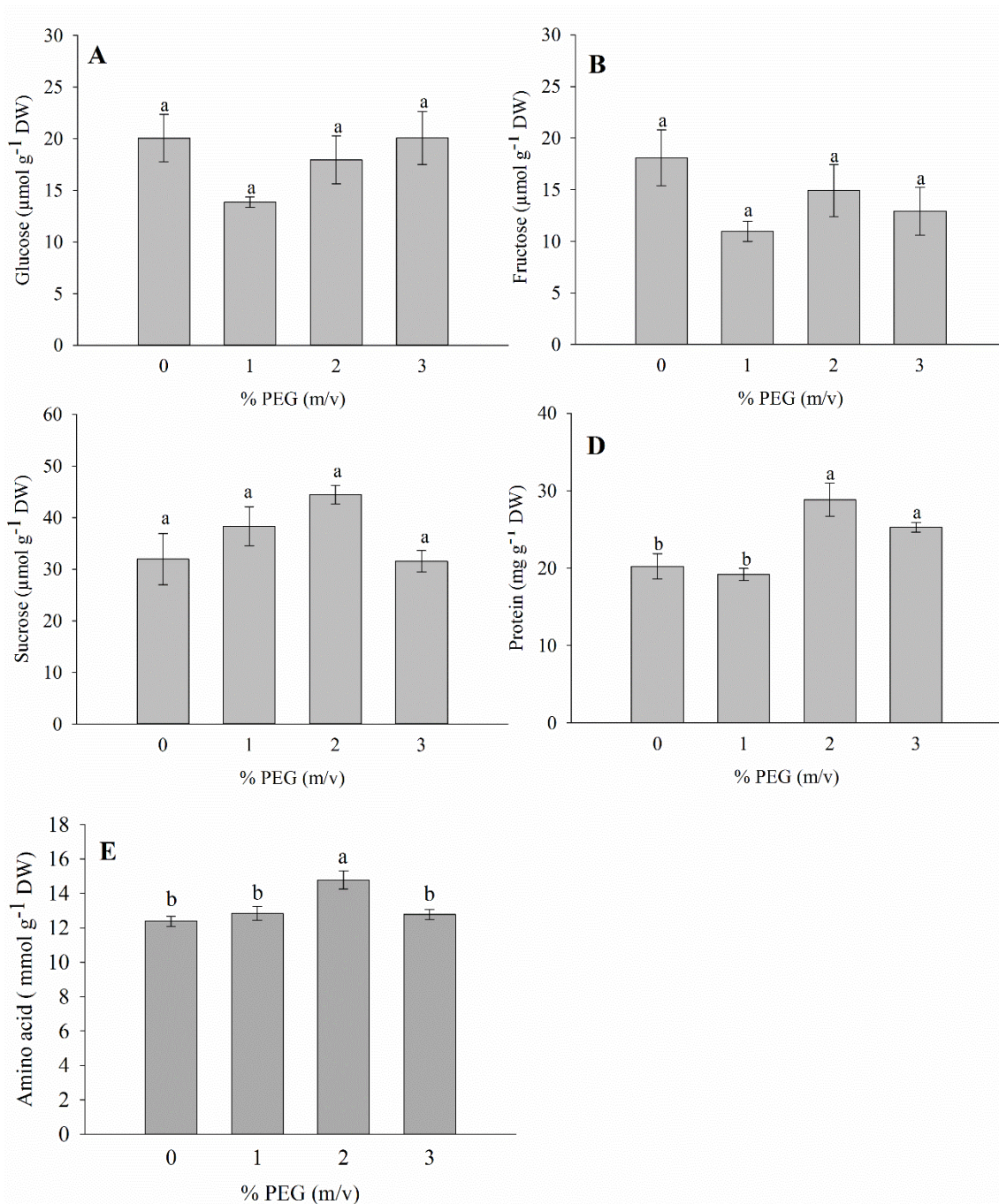


Figura 3. Teores de açúcares, proteína e aminoácidos em folhas de *Lippia alba* após 40 dias do cultivo *in vitro* sob diferentes concentrações de PEG 0, 1, 2 e 3% (m/v). (A) Glicose; (B) Frutose; (C) Sacarose; (D) Proteína e (E) Aminoácidos. Letras iguais não diferem pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Dados apresentados como média ($n=4$).

O déficit hídrico mais severo reduziu a fotossíntese de *Lippia alba in vitro*

A fotossíntese *in vitro* de *L. alba* foi reduzida nas plantas cultivadas sob o déficit hídrico mais severo, uma vez que estas exibiram uma diminuição significativa das taxas fotossintéticas comparadas com os demais tratamentos (Figura 4).

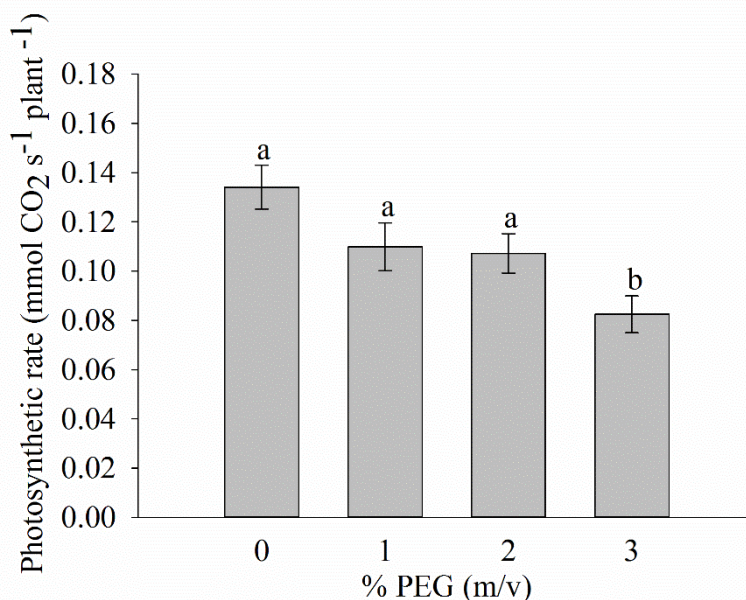


Figura 4. Taxa fotossintética de *Lippia alba* após 40 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes concentrações de PEG 0, 1, 2 e 3% (m/v). Médias comparadas pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Dados apresentados como média ($n=4$). Barras representam o erro médio.

O teor de linalol foi aumentado em plantas de *Lippia alba* cultivadas *in vitro* sob déficit hídrico

O déficit hídrico promoveu alterações no perfil da composição dos óleos essenciais em *Lippia alba*. As plantas submetidas às condições de déficit hídrico com PEG 1, 2 e 3% (m/v) exibiram aumento significativo no teor de linalol, em relação as plantas controle. Em contraste, o teor de germacreno se mostrou maior no controle (0 % PEG (m/v)) em relação aos tratamentos com déficit hídrico. O eucaliptol não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 5).

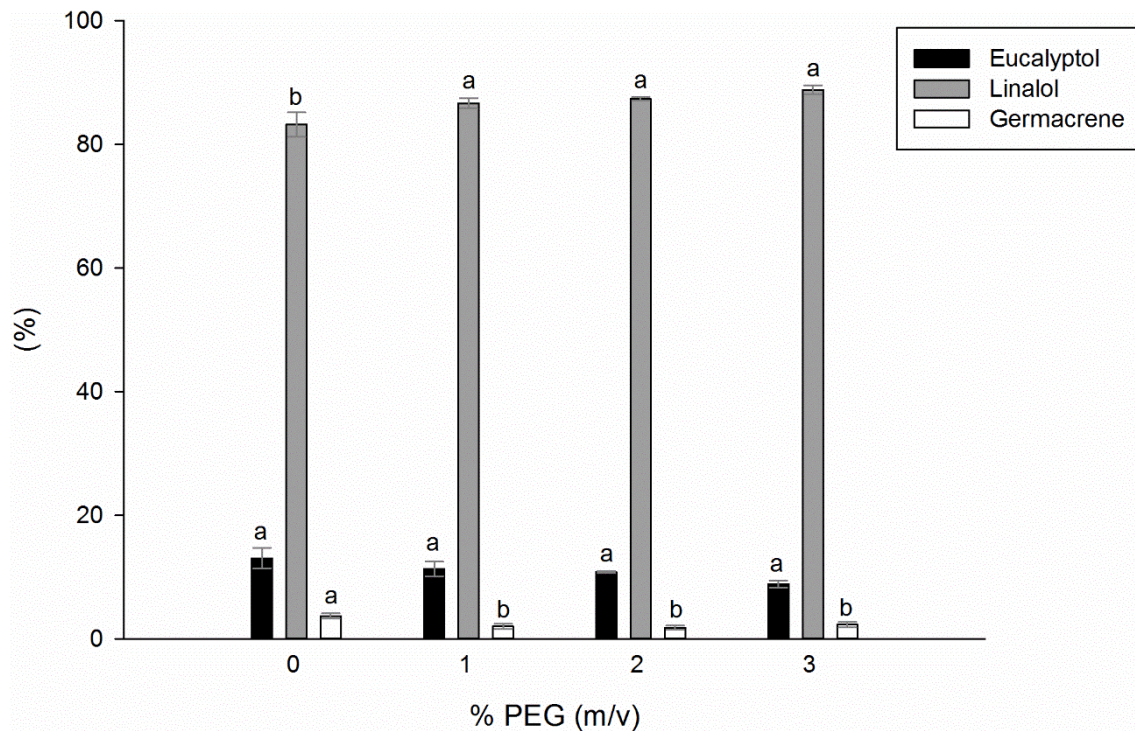


Figura 5. Efeito do déficit hídrico no perfil da composição dos óleos essenciais em *Lippia alba* após 40 dias de cultivo *in vitro*. Médias comparadas pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Dados apresentados como média ($n=4$). Barras verticais representam o erro padrão.

O déficit hídrico não alterou os níveis de expressão de *nerolidol/linalol sintase* e *geraniol sintase* em *Lippia alba*

Foi avaliada a expressão de genes envolvidos na via de biossíntese de sesquiterpenos e monoterpenos (Figura 6). A expressão relativa de *LaNES/LIS* e *LaGES* não mostrou diferenças significativas entre os diferentes níveis de déficit hídrico.

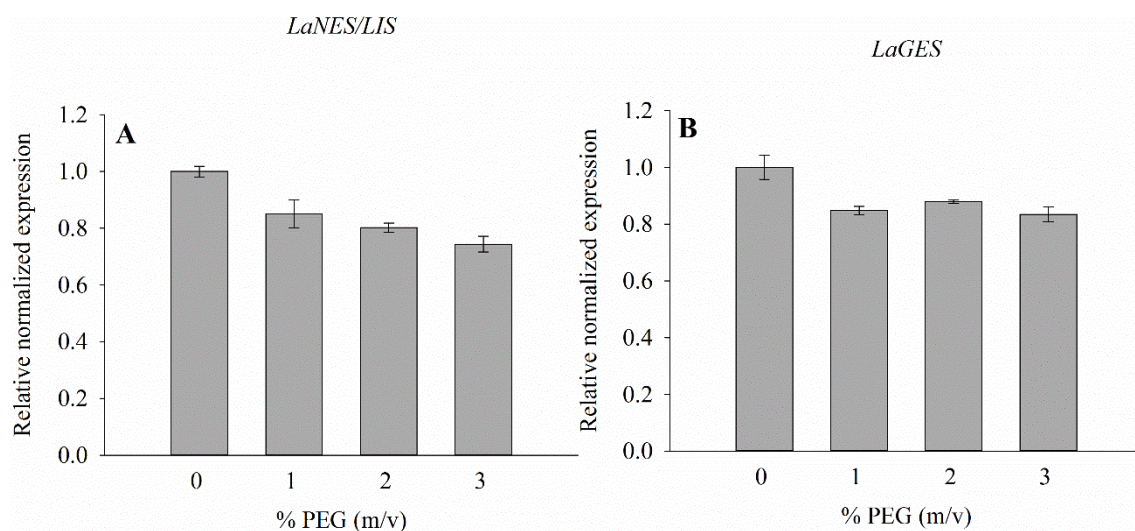


Figura 6. Reação de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) para *Lippia alba* após 40 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes concentrações de PEG 0, 1, 2 e 3% (m/v). Genes: *Geranial sintase (LaGES)*; *Neralidol/Linalol sintase (LaNES/ LIS)*. Expressão relativa ao gene *álcool desidrogenase (LaADH)*. Dados apresentados como média ($n=3$) e comparadas através do teste de Dunnett a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o erro padrão.

DISCUSSÃO

Fatores abióticos estão constantemente modulando o metabolismo primário e secundário das plantas. Dentre os metabólitos secundários, os óleos essenciais podem alterar o rendimento/composição em virtude desses fatores (Bahreininejad et al. 2014, Batista et al. 2016, Batista et al. 2017a, Mahmoud et al. 2018). Na literatura, são abundantes os trabalhos que relacionam o déficit hídrico com o perfil de óleos essenciais (Mandoulakani et al. 2017, Morshedloo et al. 2017, Yadav et al. 2014). No entanto, este estudo é o primeiro a investigar o efeito do déficit hídrico no perfil dos óleos essenciais, na expressão dos genes relacionados com a rota de biossíntese dos componentes dos óleos, no crescimento, metabólitos primários e na fotossíntese em *Lippia alba*.

Este trabalho mostra o efeito do déficit hídrico nas respostas do metabolismo primário e secundário em *L. alba in vitro*. Em relação ao metabolismo primário, os défices hídricos moderado e severo (2 e 3% PEG (m/v)) respectivamente, resultaram na diminuição de massa fresca/seca da parte aérea, além de reduzirem a área foliar. Os dados confirmam que o déficit hídrico influencia negativamente no crescimento da parte aérea de *L. alba* como foi observado por Ghotbi-Ravandi et al. (2014) ao avaliarem o efeito do déficit hídrico na matéria seca genótipos de *Hordeum vulgare* L. e por

Maatallah et al. (2016) em *Laurus nobilis* L. em que a taxa de crescimento relativo, área foliar e teor de clorofila reduziram sob estresse hídrico. Allahverdiyev (2016) também encontrou redução da área foliar em cultivares de trigo sob déficit hídrico. Em geral, a redução da biomassa em plantas ocasionada pelo déficit hídrico está relacionada com a supressão da expansão celular, uma vez que, a redução da pressão de turgor pela redução do conteúdo de água celular promove diminuição do crescimento (Jaleel et al. 2008). Além disso, uma das estratégias da planta para amenizar a baixa disponibilidade hídrica é a redução da expansão foliar, que resulta numa menor área foliar e fechamento estomático, o que reduz a transpiração e pode limitar a fotossíntese (Ge et al. 2012).

Em *L. alba in vitro*, o déficit hídrico com 3% de PEG (m/v) promoveu redução da taxa fotossintética. Essa redução da fotossíntese, pode ter ocorrido por uma limitação da difusão de CO₂ nos espaços intercelulares para o cloroplasto, que pode limitar a fixação de CO₂ (Flexas et al 2004, Chaves et al. 2009). A restrição hídrica culmina muitas vezes no fechamento estomático, sendo uma estratégia eficaz contra a perda de água (Cornic 2000, Loreto et al. 2003, Molnar et al. 2005, Chaves et al. 2009). Li et al. (2017) observaram redução da taxa fotossintética em batata no estágio de plântula sob déficit hídrico mais severo, sugerindo que esta redução foi em função da limitação estomática e de danos do fotossistema II e do sistema enzimático antioxidante. Ghotbi-Ravandi et al. (2014) também encontraram redução da diminuição na taxa de assimilação de CO₂ e da condutância estomática em genótipos de cevada sob estresse hídrico severo. Esses resultados evidenciam o quanto a limitação da disponibilidade hídrica para plantas é impactante na eficiência fotossintética, crescimento e desenvolvimento.

O déficit hídrico não afetou os carboidratos glicose, frutose e sacarose. No entanto, no tratamento com 2% PEG (m/v) houve aumento no conteúdo de aminoácidos totais em relação aos demais tratamentos. Em condições de seca, muitos metabólitos são acumulados para atuar como osmólitos reguladores. Este é um dos mecanismos que as plantas desenvolvem para contrabalancear estresses ambientais, como a seca (Seki et al. 2007). Metabólitos como os açúcares (oligossacarídeos da família da rafinose, sacarose, trealose e sorbitol), aminácidos (prolina), açúcares-álcool (manitol), e aminas (glicina betaína e poliaminas) são considerados solutos compatíveis aos quais podem ser concentrados no citoplasma celular para promover o equilíbrio hídrico entre o vacúolo e citoplasma (Per et al. 2017, Naeem et al. 2018, Merwad et al. 2018).

O teor de proteínas totais foi aumentado em plantas submetidas aos défices hídricos moderado e severo 2 e 3% PEG (m/v), em relação as plantas controle (0% PEG (m/v)) e com 1% PEG (m/v). Xie et al. (2016) através da análise iTRAQ (*tags* isobáricas para quantificação relativa e absoluta) identificou que o déficit hídrico aumentou e diminuiu o teor de 260 e 206 proteínas, respectivamente, em relação ao controle, sendo que a maior parte destas está envolvida na fotossíntese, metabolismo, estresse e defesa, mostrando que o estresse hídrico em plantas pode modular a síntese proteica e influenciar a fisiologia, promovendo diferentes respostas ao estresse.

Os tratamentos em que o déficit hídrico foi induzido por PEG 1, 2 e 3% (m/v) influenciaram a variação no perfil dos óleos essenciais, no qual o teor de linalol foi aumentado em relação às plantas controle. Antagonicamente, o teor do componente germacreno do óleo essencial foi maior nas plantas controle em comparação com aquelas submetidas ao déficit hídrico. Esses dados mostram que a limitação hídrica tem efeito significativo no perfil de óleos essenciais de *L. alba*. Esta variação, sob estresse hídrico severo, também foi relatada antes, com o aumento do teor de metilchavicol, metileugenol, β -mirceno e α -bergamoteno em *Ocimum basilicum* L (Mandoulakani et al. 2017). O aumento ou redução dos componentes específicos do óleo essencial também pode ser induzido sob déficit hídrico como encontrado por Morshedloo et al. (2017) em subespécies de *Origanum vulgare* L. com aumento do conteúdo do óleo essencial e por Yadav et al. (2014) com redução da densidade de tricomas glandulares em folhas de *Artemisia annua* L., com consequente diminuição do teor de óleo essencial.

A expressão relativa de genes envolvidos na biossíntese do óleo essencial em *L. alba* não foi significativa. Ao contrário do encontrado por Mandoulakani et al. (2017), que identificaram genes de biossíntese do óleo essencial em *Ocimum basilicum* L. sendo diferencialmente expressos sob o estresse hídrico mais severo (50% da capacidade de campo). Eles observaram aumento da expressão de O-metil transferase e eugenol O-metil transferase em cerca de 6,0 e 46,0 vezes, respectivamente. Essas alterações no padrão de expressão desses genes estão significativamente correlacionadas com o conteúdo dos componentes metilchavicol e metileugenol do óleo essencial da espécie. Além desses genes, houve redução da expressão de 4-coumarato coA ligase e cinamato 4-hidroxilase.

Em conclusão, vemos que o déficit hídrico é capaz de modular o metabolismo primário de plantas de *Lippia alba*, visto que o crescimento, desenvolvimento e

atividades fisiológicas foram comprometidos sob essa condição. O metabolismo secundário também foi levemente alterado, tendo os teores de linalol e germacreno alterados em plantas sob déficit hídrico. Dessa forma, *L. alba* se mostra como uma espécie medicinal capaz de adaptar em solos com baixa disponibilidade hídrica, sendo capaz de crescer e sintetizar compostos secundários como os óleos essenciais. Ademais, são necessários estudos com outros acessos e espécies de *L. alba* para avaliar a via de biossíntese de sesqui e monoterpenos no metabolismo secundário.

REFERÊNCIAS

Allahverdiyev TI (2016) Impact of soil water deficit on some physiological parameters of durum and bread wheat genotypes. *Agriculture and Forestry*62:131-144.

Almeida MC, Pina ES, Hernandez C, Zingaretti SM, Taleb-Contini SH, Salimena F, Slavov SN, Haddad SK, França SC, PereiraAMS, Bertoni BW (2018) Genetic diversity and chemical variability of *Lippia* spp. (Verbenaceae). *BMC Research Notes* 11:725.

Amin B, Hosseinzadeh H (2016) Black cumin (*Nigella sativa*) and its active constituent, thymoquinone: an overview on the analgesic and anti-inflammatory effects. *Planta Medica* 82:8-16.

Bahreininejad B, Razmjoo J, Mirza M (2014) Effect of water stress on productivity and essential oil content and composition of *Thymus carmanicus*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 17:717-725.

Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O (2013) Progress and challenges for abiotic stress proteomics of crop plants. *Proteomics* 13:1801-15.

Batista DS, Castro KM, Koehler AD, Porto BN, Silva AR, Souza VC, Teixeira ML, Cardoso MG, Santos MO, Viccini LF, Otoni WC (2017a) Elevated CO₂ improves growth, modifies anatomy, and modulates essential oil qualitative production and gene expression in *Lippia alba* (Verbenaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 128:357-368.

Benelli G, Pavela R, Giordani C, Casettari L, Curzi G, Cappellacci L, Petrelli R, Maggi F (2018) Acute and sub-lethal toxicity of eight essential oils of commercial interest against the filariasis mosquito *Culex quinquefasciatus* and the housefly *Musca domestica*. *Industrial Crops and Products* 112:668-680.

Bosabalidis AM, Kofidis G (2002) Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. *Plant Science* 163:375-379.

Cairns JE, Sanchez C, Vargas M, Ordoñez R, Araus JL (2012) Dissecting maize productivity: Ideotypes associated with grain yield under drought stress and well-watered conditions. *Journal of Integrative Plant Biology* 54:1007-1020.

Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103:551-560.

Cornic G (2000) Drought stress inhibits photosynthesis by decreased stomatal aperture not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science* 5:187-188.

Cruz CD (2013) GENES a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum* 3: 271-276

Du H, Wang N, Cui F, Li X, Xiao J, Xiong L (2010) Characterization of a β -carotene hydroxylase gene DSM2 conferring drought and oxidative stress resistance by increasing xanthophylls and ABA synthesis in rice. *Plant Physiology* 140:109-110.

Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G, Sharkey TD (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant biology* 6:269-279.

Ge T, Sui F, Bai L, Tong C, Sun N (2012) Effects of water stress on growth, biomass partitioning, and water-use efficiency in summer maize (*Zea mays* L.) throughout the growth cycle. *Acta Physiologiae Plantarum* 34:1043-1053.

Ghotbi-Ravandi, A. A., Shahbazi, M., Shariati, M., & Mulo, P. (2014). Effects of mild and severe drought stress on photosynthetic efficiency in tolerant and susceptible barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science* 200(6): 403-415.

Jaleel CA, Manivannan P, Lakshmanan GMA, Gomathinayagam M, Panneerselvam R (2008) Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 61:298-303.

Kumar A, Nayak AK, Pani DR, Das BS (2017) Physiological and morphological responses of four different rice cultivars to soil water potential based deficit irrigation management strategies. *Field Crops Research* 205:78-94.

Lawlor DW, Cornic G (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell & Environment* 25:275-294.

Li J, Cang Z, Jiao F, Bai X, Zhang D, Zhai R (2017) Influence of drought stress on photosynthetic characteristics and protective enzymes of potato at seedling stage. *Journal of The Saudi Society of Agricultural Sciences* 16:82-88.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25:402-408.

Loreto F, Centritto M, Chartzoulakis K (2003) Photosynthetic limitations in olive cultivars with different sensitivity to salt stress. *Plant, Cell & Environment* 26:595-601.

Lorenzi H, Matos FJA (2008) *Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 512p.

Maatallah S, Nasri N, Hajlaoui H, Albouchi A, Elaissi A (2016) Evaluation changing of essential oil of laurel (*Laurus nobilis* L.) under water deficit stress conditions. *Industrial Crops and Products* 91:170-178.

Mahmoud AA, Gendy ASH, Said-Al Ahl HAH, Grulova D, Astatkie T, Abdelrazik TM (2018) Impacts of harvest time and water stress on the growth and essential oil components of horehound (*Marrubium vulgare*). *Scientia Horticulturae* 232:139-144.

Mandoulakani BA, Eyvazpour E, Ghadimzadeh M (2017) The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids and essential oil components in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Phytochemistry* 139:1-7.

Merwad ARM, Desoky ESM, Rady MM (2018) Response of water deficit-stressed *Vigna unguiculata* performances to silicon, proline or methionine foliar application. *Scientia Horticulturae* 228:132-144.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9:490-498.

Molnar I, Dulai S, Csernak A, Pronay J, Molnar-Lang M (2005) Photosynthetic responses to drought stress in different *Aegilops* species. *Acta Biologica Szegediensis* 49:141-142.

Morshedloo MR, Craker LE, Salami A, Nazeri V, Sang H, Maggi F (2017) Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono-and sesquiterpene synthesis in two oregano (*Origanum vulgare* L.) subspecies. *Plant Physiology and Biochemistry* 111:119-128.

Naeem M, Naeem MS, Ahmad R, Ihsan MZ, Ashraf MY, Hussain Y, Fahad S (2018) Foliar calcium spray confers drought stress tolerance in maize via modulation of plant growth, water relations, proline content and hydrogen peroxide activity. *Archives of Agronomy and Soil Science* 64:116-131.

O'Leary N, Denham SS, Salimena F, Múlgura ME (2012) Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. *Botanical Journal of the Linnean Society* 170:197-219.

Otoni CG, Espitia PJ, Avena-Bustillos RJ, McHugh TH (2016) Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. *Food Research International* 83:60-73.

Ozkur O, Ozdemir F, Bor M, Turkan I (2009) Physicochemical and antioxidant responses of the perennial xerophyte *Capparis ovata* Desf. to drought. *Environmental and Experimental Botany* 66:487-492.

Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez Mata D, Villar A (2001) *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 76:201-214

Pavela R, Govindarajan M (2017) The essential oil from *Zanthoxylum monophyllum* a potential mosquito larvicide with low toxicity to the non-target fish *Gambusia affinis*. *Journal of Pest Science* 90:369-378.

Peleg Z, Reguera M, Tumimbang E, Walia H, Blumwald E (2011) Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress. *Plant Biotechnology Journal* 9:747-758.

Peng Y, Li Y (2014) Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hydrocolloids* 36:287-293.

Per TS, Khan NA, Reddy PS, Masood A, Hasanuzzaman M, Khan MIR, Anjum NA (2017) Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: phytohormones, mineral nutrients and transgenics. *Plant Physiology and Biochemistry* 115:126-140.

Petropoulos SA, Daferera D, Polissiou MG, Passam HC (2008) The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. *Scientia Horticulturae* 115:393-397.

Pola CC, Medeiros EA, Pereira OL, Souza VG, Otoni CG, Camilloto GP, Soares NF (2016) Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. *Food Packaging and Shelf Life* 9:69-78.

Raut JS, Karuppayil SM (2014) A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 62 250-264.

Saljoughian S, Shahin R, Alaa El-Din AB, Ralf G, Alireza O, Nooshin N, Amin MK (2018) The effects of food essential oils on cardiovascular diseases: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58:1688-1705.

Sharp RE (2002) Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant, Cell & Environment* 25:211-222.

Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 10:296-302.

Sofo A, Scopa A, Nuzzaci M, Vitti A (2015) Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 16:13561-13578.

Szczepanski S, Lipski A (2014) Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Control* 36:224-229.

Wilkinson S, Davies WJ (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell & Environment* 33:510-525.

Wilkinson S, Kudoyarova GR, Veselov DS, Arkhipova TN, Davies WJ (2012) Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. *Journal of Experimental Botany* 63:3499-3509.

Wu F, Bao W, Li F, Wu N (2008) Effects of drought stress and N supply on the growth, biomass partitioning and water-use efficiency of *Sophora davidii* seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 63:248-255.

Xuemei J, Dong B, Shiran B, Talbot MJ, Edlington JE, Trijntje H, Rosemary GW, Frank G, Dolferus R (2011) Control of ABA catabolism and ABA homeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals. *Plant Physiology* 151:111-121.

Yadav RK, Sangwan RS, Sabir F, Srivastava AK, Sangwan NS (2014) Effect of prolonged water stress on specialized secondary metabolites, peltate glandular trichomes, and pathway gene expression in *Artemisia annua* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 74:70-83.

CONCLUSÕES GERAIS

Lippia alba é uma espécie que apresenta destacada plasticidade fisiológica nos diferentes fotoperíodos com melhor desempenho em dias longos. O melhor desempenho em crescimento, organização anatômica do mesofilo, caule, raízes e feixes, pigmentos fotossintéticos, maior taxa fotossintética e maior síntese de proteínas totais foi sob fotoperíodo de 24 h. A biossíntese de linalol, componente majoritário do quimiotipo BGEN-04, foi aumentada sob fotoperíodo de 24 h, com a redução da expressão de *LaGES*.

O estresse salino afeta negativamente o metabolismo primário de *L. alba*, em que o crescimento, desenvolvimento e atividades fisiológicas foram comprometidas. O metabolismo secundário foi modulado, tendo aumento nos teores de linalol e redução dos teores de eucaliptol em plantas sob estresse salino mais severo (60 mM). Elevadas concentrações de NaCl podem comprometer a fisiologia das plantas no cultivo *in vitro*, entretanto, esta é uma espécie que apresenta plasticidade fisiológica sob estresse salino moderado sendo capaz de crescer e desenvolver e não comprometer a via dos monoterpenos e sesquiterpenos.

A *Lippia alba* mostrou-se uma espécie capaz de adaptar em solos com baixa disponibilidade hídrica. O metabolismo primário é afetado com redução do crescimento, área foliar e taxa fotossintética. A limitação hídrica aumentou no conteúdo de aminoácidos e proteínas totais. O metabolismo secundário foi modulado, com aumento nos teores de linalol e redução nos teores de germacreno em plantas sob déficit hídrico.