

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

KAMILA MOTTA DE CASTRO

**EFEITO DO PRECURSOR, DO FIXADOR E DE INIBIDORES DA SÍNTESE
E DA AÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETILENO EM TRÊS QUIMIOTIPOS DE**

Lippia alba in vitro.

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2016

KAMILA MOTTA DE CASTRO

**EFEITO DO PRECURSOR, DO FIXADOR E DE INIBIDORES DA SÍNTESE
E DA AÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETILENO EM TRÊS QUIMIOTIPOS DE**

Lippia alba in vitro.

**Trabalho de conclusão de curso apresentado
à Universidade Federal de Viçosa como
parte das exigências para a obtenção do
título de Engenheiro Agrônomo.**

Modalidade: Trabalho científico.

Orientador: Wagner Campos Otoni

Coorientador: Diego Silva Batista

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2016

KAMILA MOTTA DE CASTRO

**Trabalho de conclusão de curso apresentado
à Universidade Federal de Viçosa como
parte das exigências para a obtenção do
título de Engenheiro Agrônomo.
Modalidade: Trabalho científico.**

APROVADO:

Prof. Wagner Campos Otoni
(UFV)

RESUMO

A erva-cidreira [*Lippia alba* (Miller) N.E. Brown] possui importância econômica devido à produção de óleos essenciais. Esses apresentam funções medicinais como 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 etileno (ET) participa em respostas de plantas a diferentes estresses e está diretamente ligado à abscisão foliar e nas redes de sinalização de outros fitormônios como o ácido jasmônico, o ácido salicílico, o ácido abscísico e as poliaminas. Foi avaliado o efeito de um precursor, do fixador e de inibidores da síntese e da ação do ET em três quimiotipos de *L. alba*: um triploide -BGEN-01, um diploide - BGEN-02 e um hexaploide - BGEN-42. Para tanto, segmentos nodais foram transferidos para frascos de vidro (350 mL de capacidade), contendo 50 mL de meio de cultura MS. Foram adicionados ao meio de cultura o precursor da síntese do ET ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC); o inibidor da síntese: aminoetoxivinilglicina (AVG); o inibidor da ação: tiosulfato de prata (TSP) e um fixador do ET presente no interior do frasco: perclorato de mercúrio (PM). Amostras 1cm³ da porção gasosa (*headspace*) do interior do frasco de cultura foram retiradas durante 36 dias de cultivo e o acúmulo de ET foi quantificado em cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5890. Ao fim do período de cultura, a expressão da gene *ACC oxidase (LaACO)* foi analisada. Para tanto, foi extraído o mRNA total da parte aérea, o qual foi tratado com DNase e utilizado como molde para a síntese de cDNA. Os níveis de expressão foram determinados através da técnica de RT-qPCR em tempo real. Foram observadas diferenças significativas no acúmulo do ET entre os quimiotipos. Os maiores níveis de acúmulo ocorreram, em ordem decrescente, em BGEN-42, BGEN-01 e BGEN-02, com valores máximos entre o 15° e o 18° dias. O tratamento ACC foi o que apresentou os níveis mais altos de ET em BGEN-02 e BGEN-01. O BGEN-42, que teve maior taxa de abscisão foliar ao 36° dia, apresentou maior concentração de ET no controle, seguido pelo ACC. Os tratamentos TSP, PM e AVG tiveram valores nulos de ET durante todo o cultivo, mostrando que os inibidores da síntese e da ação, assim como o fixador, foram eficazes em suprimir o ET no ambiente *in vitro*. Dentre os tratamentos aplicados no BGEN-42, o controle e o ACC apresentaram maior abscisão foliar que os demais. Os quimiotipos BGEN-01 e BGEN-02 não obtiveram diferenças significativas em resposta à abscisão foliar, entretanto

BGEN-01 nos tratamentos ACC e TSP foram os que apresentaram maiores taxas da queda de folhas. Os quimiotipos BGEN-01 e BGEN-42 cultivados com o ACC foram os que tiveram maior expressão de *LaACO*. No tratamento com o TSP, os níveis de expressão de *LaACO* também foram significativos para o quimiotipo BGEN-01, visto que o TSP atua inibindo a ação do etileno. Conclui-se que a expressão de *LaACO* pode ser alterada pela adição de ACC ou TSP; que o precursor e os inibidores/fixador do ET foram eficazes em estimular e suprimir, respectivamente, a produção do ET *in vitro* e que os quimiotipos com diferentes ploidias respondem de forma distinta quanto à produção desse hormônio em *L. alba*.

Palavras-chave: abscisão foliar, erva-cidreira, expressão gênica, poliploidia.

ABSTRACT

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown has economic importance due to the production of essential oils. These have medicinal functions such as improvement the quality of sleep, stress, control of respiratory diseases, gastrointestinal, anti-inflammatory and natural sedative. They can also be used in biological control from various pathogens and food preservation. The ethylene (ET) is involved in plant responses to different stresses and is directly connected to the leaf abscission and in the crosstalk and signaling with other phytohormones such as jasmonic acid, salicylic acid, abscisic acid and polyamines. Here we evaluated the effect of the precursor, of the scavenger and inhibitors of the synthesis and action of ET in three chemotypes of *L. alba*, with varying ploidy, namely B-GEN-01 (triploid), BGEN-02 (diploid), and BGEN-42 (hexaploid). Therefore, nodal segments were transferred to glass flasks (350 mL capacity) containing 50 mL of MS culture medium, and added to the culture medium a precursor of ET synthesis (acid 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; ACC; an inhibitor of the synthesis (aminoethoxyvinylglycine; AVG); an inhibitor of the action (silver thiosulfate; TSP), and a scavenger of the ET within the flask (mercury perchlorate; PM). Samples (1cm³) of headspace portion of the interior of the culture flask were withdrawn during 36 days of cultivation and the accumulation of ET was quantified by gas chromatograph Hewlett-Packard 5890. At the end of the culture period the expression of the *ACC oxidase* gene (*LaACO*) and the extracted total mRNA, which was treated with DNase, was used as template for cDNA synthesis. Expression levels were determined by RT-qPCR in real time. Significant differences were observed build up ET between the chemotypes. The largest ET accumulation levels occurred, in descending order, BGEN-42, BGEN-01 and BGEN-02, with maximum values between 15 and 18 ° days. Treatment with ACC showed the highest levels of ET in BGEN-02 and BGEN-01. The BGEN-42 had a higher rate of leaf abscission after 36 days, and showed higher ET concentration in control, followed by the ACC. TSP treatments, MP and AVG had values nulls ET throughout the cultivation, showing that inhibitors of the synthesis and action, as the fixative were effective in suppressing ET *in vitro* environment. The treatments TSP, MP and AVG had null ET values throughout the cultivation, showing that inhibitors of the synthesis and action, as the fixative were effective in suppressing ET *in vitro* environment. Among the treatments applied BGEN-42, control and ACC

showed higher leaf abscission than others. The BGEN-01 and BGEN-02 chemotypes did not show significant differences in response to falling of the leaves, however BGEN-01 in the presence of ACC and TSP had larger leaf abscission rate. The chemotypes BGEN-01 and BGEN-42 that was grown with ACC were those who had greater *LaACO* gene expression. In the treatment with TSP *LaACO* expression levels were also significant for chemotype BGEN-01, since the TSP acts on the inhibition of ethylene action. Therefore *LaACO* expression can be altered by the addition of ACC or TSP; the precursor and inhibitors or ET scavenger were effective in stimulating and deleting, respectively, the production of ET in vitro and that chemotypes with different ploidy levels respond differently as the production of this hormone in *L. alba*.

Keywords: leaf abscission, gene expression, lemongrass, polyploidy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Material vegetal	11
3.2 Efeito de inibidores e precursores.....	12
3.3 Análises do acúmulo de etileno	12
3.4 Extração de mRNA da parte aérea.....	13
3.5 Tratamento com DNase e verificação da integridade do RNA	13
3.6 Síntese de cDNA fita simples	14
3.7 Análise de RT-PCR em Tempo Real.....	14
3.8 Análises estatísticas	14
4.RESULTADOS E DISCUSÃO.....	15
5. REFERÊNCIAS	20

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Lippia* (Verbenaceae), apresenta grande diversidade de espécies extensamente distribuídas em países tropicais como o Brasil, o Paraguai, a Argentina e no continente africano. O número estimado de espécies é próximo de 200 (Pascual et al. 2001).

Dentro da grande diversidade desse gênero, a espécie *Lippia alba*, denominada popularmente de cidreira, falsa-melissa, alecrim-do-campo ou sálvia exprime grande importância social e econômica (Lorenzi & Matos 2008).

Adotada na medicina popular, *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 & Matos 2008). A indústria que circunda os setores farmacêuticos, cosméticos, aromatizantes e fitoterápicos desfruta da crescente procura por produtos naturais (Rufino et al. 2010). Em virtude dos compostos secundários sintetizados pela *Lippia*, em especial os óleos essenciais, estes também são empregados com intuito de diminuir os efeitos negativos de oxidantes, radicais e microrganismos que causam prejuízos na indústria alimentícia (Pereira 2008).

Dada a ampla utilização de *Lippia alba* em diferentes cenários, esta espécie foi considerada importante na preservação e manejo dos recursos genéticos (Vieira et al. 2002).

A cultura de tecidos vegetais baseia-se na totipotência celular e utiliza inúmeras técnicas de cultivo *in vitro* de indivíduos ou parte destes, denominado de explantes, sendo o ambiente *in vitro* asséptico e controlado em relação à luminosidade e temperatura (Pereira 2008, Morais 2012). O cultivo *in vitro* de *Lippia alba* permite facilidade na multiplicação dos quimiotipos, os quais variam tanto na composição dos óleos essenciais quanto na composição dos compostos não-voláteis possibilitando a aplicação da biotecnologia vegetal para explorar a variabilidade genética, e os efeitos abióticos no metabolismo secundário dessas plantas (Hennebelle et al. 2008, Kothari et al. 2010, Batista et al. 2016). O acúmulo de gases como o CO₂ e o ET no ambiente *in vitro* pode alterar os padrões no metabolismo secundário e na morfogênese (Sharafzadeh & Ordoorkhani 2011, Batista et al. 2013).

A estrutura química do ET é composta por dois carbonos e quatro átomos de hidrogênio (C_2H_4), sendo sintetizado na maioria dos tecidos e células vegetais (Abeles et al. 1992, Schaller & Kieber 2002, Wang et al. 2002, Tsuchisaka & Theologis 2004). A participação do ET em respostas de plantas a diferentes estresses está intimamente ligada ao efeito da abscisão foliar, e também tem influência das redes de sinalização de outros fitormônios como o ácido jasmônico, o ácido salicílico e o ácido abscísico, tendo assim uma influência direta no processo morfogênico (Adie et al. 2007, Kwon et al. 2009).

A biossíntese de ET em plantas se inicia com a conversão da metionina em S-adenosilmetionina (SAM), a qual é transformada em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela enzima sintase do ACC (ACS). O ACC através da enzima oxidase do ACC (ACO) é então convertido em etileno. As enzimas ACS e ACO são codificadas por uma família multigênica onde cada gene é regulado independentemente por um estresse específico (Bleecker & Kende, 2000, Ge et al. 2000, Feng et al. 2011, Siddique et al. 2011).

A inibição do ET pode ser induzida em diferentes etapas em suas vias de biossíntese. Para estudar os efeitos do ET em sua rota biosintética os inibidores dos primeiros passos na via, como a SAM ou o ACC, têm sido largamente utilizados. A inibição da atividade da sintase do ACC usando aminoetoxivinilglicina (AVG) ou ácido amino-oxiacético (AOA), que impedem a formação do ACC, também pode ser proficiente no estudo dos efeitos do etileno (Lin et al. 2009).

Os íons de prata podem ser utilizados para a inibição da ação do ET, sendo aplicado na forma de nitrato de prata ($AgNO_3$) ou tiosulfato de prata (TSP), atuando como um potente inibidor da ação desse fitormônio pois compete por sítios de ligação dos receptores do ET que estão localizados predominantemente nas membranas (Kumar et al. 2009).

Buscando entender melhor as implicações práticas da biossíntese de ET em plantas, a pesquisa básica visa interpretar melhor a estrutura de genes que codificam enzimas biossintéticas de ET e seus diferentes padrões de expressão. A ACC-oxidase (ACO) está envolvida no passo final da produção desse fitormônio e há uma forte evidência de que a expressão desse gene é positivamente correlacionada com as taxas de produção de ET. Assim, a regulação da atividade da ACO está envolvida como um dos principais níveis de regulação para controle da biossíntese de ET em plantas superiores (Rudus et al. 2012).

A senescência foliar está intimamente ligada à idade de desenvolvimento, sendo regulada por fatores externos e internos (Zhang & Zhou 2013). Grbic & Bleeker (1995) ressaltam que o ET promove senescência foliar através de regulação positiva da expressão de genes associados a este fenômeno e regulação negativa da transcrição de genes associados a fotossíntese. Um estudo recente relacionando a senescência foliar em resposta ao etileno evidenciou a super expressão de genes envolvidos neste processo (Koyama et al. 2013).

Pimenta et al. (2013), em estudo com *Lippia filifolia*, reportaram que o uso de inibidores de ET teve efeitos positivos na conservação de germoplasma *in vitro* dessa espécie, uma vez que aumentou a eficiência da micropropagação e reduziu a frequência do subcultivo.

Viccini et al. (2004, 2005, 2010) revelam que há grande variabilidade genética entre as espécies do gênero *Lippia* em que o número de cromossomos e valores do C-DNA são distintos entre espécies, evidenciando que durante a evolução dessas plantas ocorreu ao menos um evento de poliploidização.

Dong et al. (2011), em estudo com poliploides de *Gossypium hirsutum*, evidenciaram alterações na expressão gênica em relação a diferentes estresses abióticos, sugerindo que este pode estar ligado na preservação de alguns genes nesta espécie. Todavia, não há trabalhos na literatura científica que estudem as diferentes respostas à ação do etileno em diferentes ploidias em *Lippia alba*.

2. OBJETIVOS

Esse trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do precursor, do fixador e de inibidores da síntese e da ação de etileno, assim como a expressão da ACC oxidase em três quimiotipos de *Lippia alba* com diferentes ploidias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Três quimiotipos de *Lippia alba*: um triploide - BGEN-01; um diploide - BGEN-02 e um hexaploide - BGEN-42, procedentes do Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Juiz de Fora – MG, foram utilizados nos experimentos. Essas plantas foram

subcultivadas e mantidas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCT II/BIOAGRO-UFV).

3.2 Efeito de inibidores e precursores

Seis segmentos nodais foram transferidos para frascos de vidro (350 mL de capacidade), contendo 50 mL de meio de cultura composto pelos sais e vitaminas do meio MS (Murashige & Skoog 1962), 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 6,5 g L⁻¹ de ágar Merck[®], com pH ajustado para 5,7 ± 0,1, sendo autoclavado a 120 °C, 108 kPa por 20 min. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, sob irradiância de 41 μmol m⁻² s⁻¹ fornecida por duas lâmpadas LED branca (SMD 100, 18W, Vilux[®], Vitória, ES, Brazil) sob temperatura de 25 ± 2 °C.

Um precursor da síntese do etileno: ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), e os inibidores aminoetoxivinilglicina (AVG) e tiosulfato de prata (TSP) foram adicionados ao meio em alíquotas de soluções-estoque filtro-estéreis, correspondentes às concentrações de 3 μM de ACC e AVG, e 10 μM de TSP (Batista et al. 2013). O TSP foi preparado vertendo-se solução de tiosulfato de sódio sobre cristais de nitrato de prata a uma proporção molar final de 4:1 (tiosulfato: prata) (Reid et al. 1980).

A solução de perclorato de mercúrio (PM) (1 mM) foi introduzida ao sistema por meio da fixação de um microtubo de 1,5 mL, previamente autoclavado, ao meio de cultura, sendo o volume de PM utilizado de 500 μL (Dias et al. 2010).

Após 36 dias de cultivo foram analisados o acúmulo do ET, a abscisão foliar e a expressão da *LaACO*.

3.3 Análises do acúmulo de etileno

A mensuração dos níveis de ET foi realizada no Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas, do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Para tal, foi utilizada uma seringa de 1 cm³ para a coleta de amostras

do ar contidas no interior dos recipientes. As coletas foram realizadas a cada 3 dias. A concentração de etileno, expressa em pmol C₂H₄ por plântula, foi avaliada em cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5890, série II, com detector de ionização de chama (FID) a temperatura de 150°C, injetor a 110°C e coluna Porapak-N a temperatura de 60°C, usando como gás de arraste o dinitrogênio.

Na Tabela 1, tem-se um resumo das substâncias e concentrações utilizadas.

Tabela 1 - Substâncias adicionadas ao meio MS em cada tratamento e suas concentrações

Tratamento	Substância	Concentração
1- Controle	—	—
2- ACC	Ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano	3 µM
3- AVG	Aminoetoxivinilglicina	3 µM
4-TSP	Tiosulfato de prata	10 µM
5-PM	Perclorato de mercúrio	1 mM

3.4 Extração de mRNA da parte aérea

Foi coletada a parte aérea das plântulas e armazenada em ultrafreezer a -80 °C. Posteriormente, foi extraído o mRNA, para isso as amostras foram maceradas e adicionadas em 500 µL de TRIZOL[®] (Invitrogen) em microtubos de 1,5 mL. Em seguida foi adicionada à cada tubo 50 µL de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1 v/v). Após homogeneização em vórtex as amostras foram incubadas no gelo durante 5 min e em seguida centrifugadas a 12000 g por 15 min a 4 °C. Após centrifugação, a fase aquosa foi recolhida, dispensada em tubos novos sendo a ela adicionado o mesmo volume de isopropanol para precipitação do RNA, incubado por duas horas a -20 °C e novamente centrifugado a 12000 g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado em 800 µL de etanol (70%). Os pellets foram colocados para secar em capela de fluxo laminar e ressuspensos em 30 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, SIGMA).

3.5 Tratamento com DNase e verificação da integridade do RNA

Após a extração, todas as amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante e, em seguida, purificadas com solução de fenol:clorofórmio:álcoolisoamílico na proporção 25:24:1.

A quantificação foi feita por espectrofotometria a 260 nm, utilizando o NanoDrop ND-1000 (NanoDropTechnologies™).

3.6 Síntese de cDNA fita simples

Para a síntese de cDNA fita simples 1,5 µg de RNA total e 500 ng de oligodT, contidos num volume de 11 µL de água tratada com DEPC 0,1%, foram incubados a 70 °C por 5 min e, em seguida, colocados no gelo por 2 min. Posteriormente, foram adicionados 4 µL do tampão de síntese de primeira fita de DNA, 2 µL de mistura de dNTPs, e 1 µL (200U) da enzima transcriptase reversa (SuperScript™ First-Strand Synthesis System, Invitrogen™). A reação foi incubada a 42 °C durante 1 h e, em seguida, 15 min a 70 °C para inativação da enzima. O cDNA foi armazenado a -20 °C até o momento do uso.

3.7 Análise de RT-PCR em Tempo Real

A reação de PCR em tempo real (RT- qPCR) foi feita em um equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Os primers da *l-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (LaACO)* e da *álcool desidrogenase*, que foi utilizado como gene de referência, foram obtidos de um transcriptoma gerado a partir de folhas de *Lippia alba* (Souza et al. no prelo). A PCR seguiu o seguinte gradiente: 2 min a 50 °C e 10 min a 90 °C, seguido de 40 ciclos de 16 s a 95 °C e 1 min a 60 °C, e 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C, 30 s a 95 °C e 15 s a 60 °C. Todas as reações foram feitas utilizando qPCR-SYBR-Green mix/Rox (Ludwig Biotec®, Alvorada, Brasil). Os níveis de expressão foram determinados usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen 2001) e pelo menos três replicatas técnicas foram feitas para cada amostra.

3.8 Análises estatísticas

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, montado em esquema fatorial 3x5 (quimiotipo x composto adicionado), sendo a unidade experimental composta por um frasco de cultivo contendo seis plântulas. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelos testes de Scott & Knott (abscisão foliar) e Dunnett (expressão gênica) a 5% de probabilidade.

4.RESULTADOS E DISCUSÃO

Após avaliação, foram observadas diferenças significativas na síntese do ET nos quimiotipos de *L. alba* cultivados *in vitro* em respostas a diferentes tratamentos.

Os níveis mais elevados de etileno durante os 36 dias de cultivo foram evidenciados, em ordem decrescente, nos quimiotipos BGEN-42, BGEN-01 e BGEN-02 (Figura1). Sendo que para todos o valor máximo foi observado entre o 15° e 18° dia. Estes resultados são concordantes com os encontrados por Batista et al. (2013) na influência do etileno e de poliaminas na morfogênese *in vitro* de *Capsicum annuum L.*

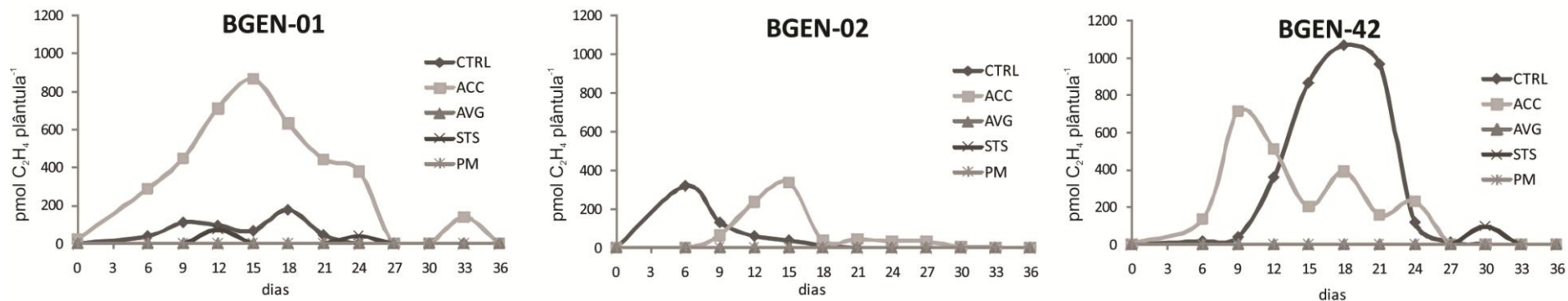


Figura 1. Acúmulo de etileno (pmol C₂H₄ plântula⁻¹) ao longo de 36 dias em três quimiotipos de *Lippia alba* cultivados *in vitro* com o precursor e inibidores do etileno. CTRL = controle; ACC = ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico (3 μM); AVG = aminoetoxivinilglicina (3 μM); TSP = tiosulfato de prata (10 μM); PM = perclorato demercúrio (1 mM).

O Tratamento ACC foi o que apresentou os níveis mais altos de ET nos quimiotipos BGEN-02 e BGEN-01(Figura 1), visto que o ACC é um precursor da síntese do ET, é convertido em ET pela enzima oxidase do ACC (ACO) (Ruduś et al. 2012). Todavia, em BGEN-42 o controle apresentou maior concentração de ET em relação ao tratamento ACC, esse comportamento diferenciado pode estar relacionado com a ploidia, uma vez que os quimiotipos apresentam variações na composição dos óleos essenciais, a poliploidização natural pode responder de forma distinta a diferentes estresses abióticos (Madlung 2013, Li et al. 2012, Viccini et al. 2004).

Os tratamentos TSP, MP e AVG tiveram valores nulos de ET durante o decorrer do experimento, sugerindo eficácia das diferentes estratégias de diminuição dos níveis de ET no ambiente interno dos frascos de cultura. Entretanto o TSP apresentou pequenos picos de ET no 12° e no 24 ° dia de cultivo no quimiotipo BGEN-01, do mesmo modo que o AVG no 18°dia (Figura 1).

Ao se adicionar o AVG no meio de cultura, este afeta diretamente a produção de ACC por inibição enzimática, diminuindo a produção de ET. Enquanto isso o TSP atua na ação do etileno, uma vez que o íon prata compete com o ET pelo mesmo substrato. O PM, por sua vez, age fixando o ET do headspace do frasco de cultura (Gong et al. 2005, Batista et al. 2013).

A eficácia da captura do ET pelo PM observada nesse estudo com *Lippia alba* concorda com os resultados obtidos por Dias et al. (2010) , para *Passiflora edulis*, e por Batista et al. (2013) para *Capsicum annum*L.

O quimiotipo BGEN-42 foi o que apresentou maior abscisão foliar (Tabela 2), o que se pode relacionar diretamente com o maior acúmulo de etileno em relação aos outros quimiotipos. Os diferentes níveis de ploidia também podem explicar essa diferença na taxa de abscisão foliar entre os quimiotipos, uma vez que Batista et al. (2016) em experimento avaliando a influência da qualidade de luz nesses mesmos quimiotipos de *L. alba* também observaram que o hexaploide (BGEN-42) foi mais susceptível à abscisão foliar que os demais.

Tabela 2. Média do número de folhas abscindidas em plantas de três quimiotipos de *Lippia alba* após 36 dias de cultivo *in vitro* na presença de inibidores, fixadores ou precursores do etileno. CTRL = controle; ACC = ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico (3 μ M); AVG = aminoetoxivinilglicina (3 μ M); TSP = tiosulfato de prata (10 μ M); PM = perclorato de mercúrio (1mM).

Composto	Quimiotipo		
	BGEN-01	BGEN-02	BGEN-42
CTRL	0.20 Bb	0.40 Ba	2.67 Aa
ACC	1.17 Ba	0.40 Ba	3.60 Aa
AVG	0.00 Bb	0.00 Bb	1.00 Ab
PM	0.00 Bb	0.00 Bb	0.80 Ab
TSP	0.80 Ba	0.20 Bb	1.40 Ab

Médias indicadas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Nos tratamentos aplicados no BGEN-42, o controle e o ACC apresentaram maior abscisão foliar que os demais. Os quimiotipos BGEN-01 e BGEN-02 não obtiveram diferenças significativas em resposta a abscisão foliar (Tabela 2), entretanto BGEN-01 nos tratamentos ACC e TSP foram os que apresentaram maiores taxas da queda de folhas, visto que o ACC é precursor da síntese de ET, o que pode influenciar na abscisão foliar, entretanto o TSP é um inibidor da ação deste hormônio, impedindo a atuação do etileno dentro do ambiente *in vitro*.

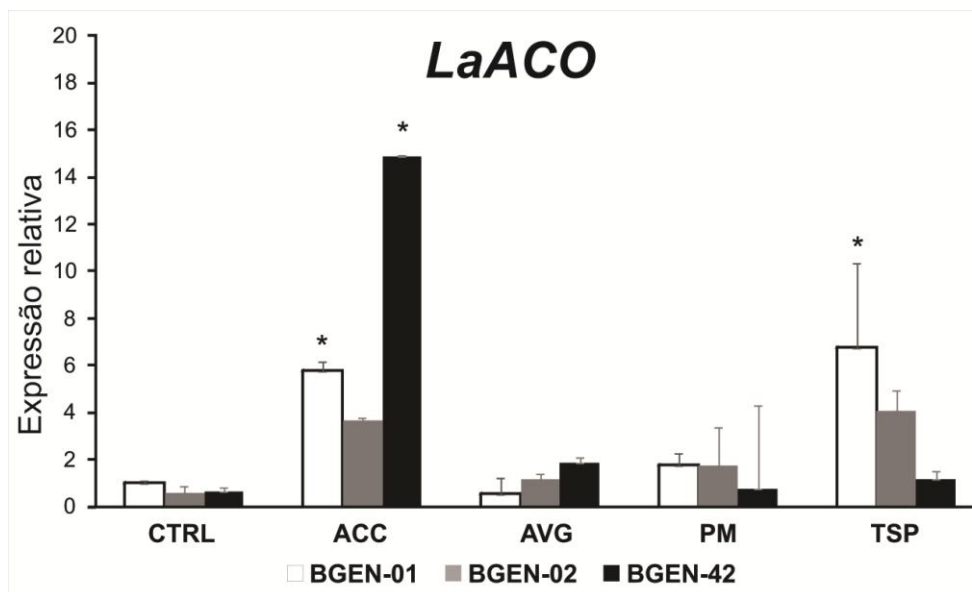


Figura 2. Expressão relativa da LaACO (ACC-oxidase de *Lippia alba*) ao longo de 36 dias em três quimiotipos de *Lippia alba* cultivados *in vitro* com o precursor, fixador e inibidores da síntese e da ação do etileno. CTRL = controle; ACC = ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico (3 μ M); AVG = aminoetoxivinilglicina (3 μ M); TSP = tiosulfato de prata (10 μ M); PM = perclorato de mercúrio (1mM) .* = Difere do controle a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

Dentre os quimiotipos de *L. alba*, cultivados *in vitro* com o precursor ACC adicionado ao meio de cultura, o BGEN-01 e o BGEN-42 evidenciaram maior expressão de *LaACO* (Figura 2), demonstrando sua atuação no último passo final da rota biossintética do ET.

No tratamento com o TSP, os níveis de expressão de *LaACO* também foram significativos para o quimiotipo BGEN-01, o que pode estar correlacionado com sua taxa de abscisão foliar, visto que o TSP atua inibindo a ação do ET, ou seja, ocorreu a sua síntese mas sua ação na planta foi inibida.

Em conclusão, temos que o precursor e os inibidores/fixador do ET foram eficazes em, respectivamente, estimular e suprimir a produção de ET *in vitro* em *Lippia alba* e que os quimiotipos com diferentes ploidias respondem de forma distinta quanto ao acúmulo desse hormônio, na taxa de abscisão foliar e, conseqüentemente, nos níveis de expressão de *LaACO*.

5. REFERÊNCIAS

- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME Jr (1992) Ethylene in plant biology, 2° ed. Academic Press, San Diego
- Batista DS, Dias LLC, Macedo AF, Rêgo MM, Rêgo ER, Floh EIS, Finger FL, Otoni CW (2013) Suppression of ethylene levels promotes morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 49(6):759-764.
- Batista DS, CastroKM, 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.
- Grbic V, Bleeker AB (1995) Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *arabidopsis*. *Plant Journal* 8:595–602.
- GongY, Gao F, Tang K (2005) *In vitro* high frequency direct root and shoot regeneration in sweet potato using the ethylene inhibitor silver nitrate. *South African Journal of Botany* 71:110–13.
- Hennebelle T, Sahpaz S, Joseph H, Bailleul F (2008) Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology* 116:211–222.
- Koyama T, Nii H, Mitsuda N, Ohta M, Kitajima S, Ohme-Takagi M, Sato F (2013) A regulatory cascade involving class II ETHYLENE RESPONSE FACTOR transcriptional repressors operates in the progression of leaf senescence. *Plant Physiology* 162:991–1005.
- Lorenzi H, Matos FJA (2008) Plantas Mediciniais no Brasil - Nativas e Exóticas. Nova Odessa: *Instituto Plantarum de Estudos da Flora*. 512p.
- Li X, Yu E, Fan C, Zhang C, Fu T, Zhou Y (2012) Developmental, cytological and transcriptional analysis of autotetraploid *Arabidopsis*. *Planta* 236:579–596.

Madlung A (2013) Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. *Heredity* 110 (2):99–104.

Morais TP, Luz JMQ, Silva SM, Resende RF, Silva AS. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Botucatu, v. 14, n.1, p. 110-121, 2012.

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.

Rudus I, Sasiak M, Kełpczyn'ski J (2012) Regulation of ethylene biosynthesis at the level of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) gene. *Acta Physiologiae Plantarum* 35:295–307.

Rufino ER, Siqueira WJ, Marques MOM, Colombo CA, Chiorato AF, Azevedo Filho JA, Lourenção AL, Yamamoto PY, Martins ALM (2010) Estimativas de parâmetros genéticos de caracteres relacionados ao vigor de estacas em *Lippia alba*. *Bragantia* 69:779-785.

Sharafzadeh S, Ordoorkhani K (2011) Influence of carbon dioxide enrichment on accumulation of secondary metabolites in plants. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5:1681–1686.

Schaller G E, Kieber JJ (2002) Ethylene. In: *The Arabidopsis Book* e0071.

Tsuchisaka A, Theologis A (2004) Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiology* 136:2982–3000.

Viccini LF, Costa DCS, Machado MA, Campos AL (2004) Genetic diversity among nine species of *Lippia* (Verbenaceae) based on RAPD markers. *Plant Systematics and Evolution* 246:1–8.

Viccini LF, Pierre PMO, Prac MM, Costa DCS, Sousa SM, Peixoto PHP, Salimena FRG (2005) Chromosome numbers in the genus *Lippia*. *Plant Systematics and Evolution* 256:171–178.

Vieira RF, Silva SR (2002) *Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico(CNPq) 184p.

Wang K, Li H, Ecker JR (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14(Suppl):S131–S151.

Zhang H, Zhou C (2013) Signal transduction in leaf senescence. *Plant Molecular Biology* 82:539–545.