

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Laís Stehling de Queiroz Nascimento

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS E EXPRESSÃO GÊNICA
DO COMPLEXO POLIPLOIDE *Lippia alba* SOB CONDIÇÕES DE
ESTRESSE**

DISSERTAÇÃO

Juiz de Fora

2020

LAÍS STEHLING DE QUEIROZ NASCIMENTO

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS E EXPRESSÃO GÊNICA
DO COMPLEXO POLIPLOIDE *Lippia alba* SOB CONDIÇÕES DE
ESTRESSE**

Dissertação de mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini

Juiz de Fora
2020

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Nascimento, Laís Stehling de.

Respostas morfofisiológicas e expressão gênica do complexo poliploide *Lippia alba* sob condições de estresse / Laís Stehling de Nascimento. -- 2020.

121 f. : il.

Orientador: Lyderson Facio Viccini

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas.

Programa de

Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2020.

1. *Lippia alba*. 2. Estresses abióticos. 3. Morfofisiologia. 4. Expressão gênica. 5. Genes de referência. I. Viccini, Lyderson Facio , orient. II. Título.

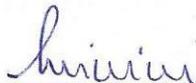
LAIS STEHLING DE QUEIROZ NASCIMENTO

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS E EXPRESSÃO GÊNICA DO COMPLEXO
POLIPLOIDE *Lippia alba* SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE**

Dissertação de mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 13 / 03 / 2020.

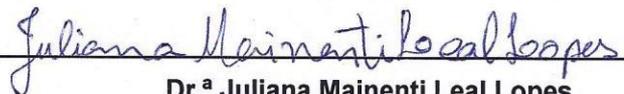
BANCA EXAMINADORA:



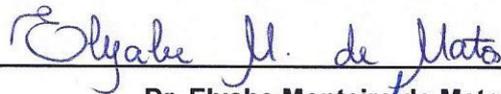
Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora



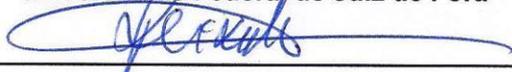
Prof. Dr. Wagner Campos Otonari
Universidade Federal de Viçosa



Dr.ª Juliana Mainenti Leal Lopes
Universidade Federal de Juiz de Fora



Dr. Elyabe Monteiro de Matos
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Paulo Henrique Pereira Peixoto
Universidade Federal de Juiz de Fora

À minha avó Deise e minha mãe Gisele,
pelo amor incondicional.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao ferramenta de Pós-graduação em Ciências Biológicas, UFJF, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pela bolsa e financiamento do trabalho;

À Deus, pelo privilégio que é viver e pelas infinitas bênçãos concedidas para superar e aprender com as expiações e provas em meu caminho;

Aos meus avós Rogério (que me assiste de outro plano) e Deise, minha mãe Gisele, irmãs Priscila e Bárbara e ao meu amor Renan, pelos ensinamentos, exemplo, compreensão, apoio, amor e pelas orações;

Ao professor e orientador Lyderson, pelo profissionalismo, ensinamentos, confiança e oportunidades;

À Juliana, pela gentileza, por me ensinar com muito carinho a trabalhar com genética molecular, pelo tempo dedicado a me ajudar (pessoal e profissionalmente) e discutir os experimentos, não medindo esforços! Você é especial!

Ao Elyabe, pelo tempo dedicado a me ensinar a trabalhar com a cultura de tecidos, sempre disposto a ajudar (pessoal e profissionalmente), com muita bondade e sabedoria! Você é incrível!

À técnica Adriana, pela disposição em ajudar e bom ânimo;

Ao professor Wagner Otoni, pela gentileza e por abrir as portas do seu laboratório, para que grande parte deste trabalho pudesse ser realizado!

Ao Evandro, pela disponibilidade e ajuda nos experimentos, não medindo esforços;

Aos professores Paulo, Cristiano e Richard, pela contribuição a este trabalho, ensinamentos e atenção;

Aos amigos do Laboratório de Genética e Biotecnologia, Ana Luiza, Victória, Isabel, Aryane, Tatiara, Rhaisa, Rafaela, Eva, Matheus e Rafael pela companhia, pela amizade e bons momentos de descontração!

Ao recordar meus momentos de estudo e bancada, meu coração transborda alegria e gratidão! Pois se cheguei até aqui, foi com a ajuda de pessoas maravilhosas! **MUITO OBRIGADA!**

*“Don’t find fault, find a remedy;
anybody can complain.”*

(Henry Ford)

RESUMO

Lippia alba (Mill) N.E. Brown, é uma espécie medicinal cuja composição de seu óleo essencial, está associada aos níveis de ploidia (diploide, triploide e tetraploide). A poliploidia e variações ambientais podem levar a alterações significativas na rota metabólica. Devido à importância medicinal e econômica da espécie, investigar respostas relacionadas a diferentes estresses, torna-se importante para se compreender o efeito da poliploidia e modular a produção de compostos de interesse. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de estresses abióticos no crescimento, fisiologia, produção de óleo essencial e na expressão de genes relacionados à via de monoterpênicos, em acessos diploide, triploide e tetraploide de *L. alba* cultivados por 40 dias *in vitro*. Adicionalmente, avaliaram-se genes de referência candidatos em diploides de *L. alba* para as diferentes condições de estresse. Assim, os três níveis de ploidia foram cultivados *in vitro*, com adição de 60 mM NaCl para indução de estresse salino; 1% PEG-4000 para estresse hídrico; 10 µM ABA para estresse por ácido abscísico; 10 µM AS para estresse por ácido salicílico; submetidos à 4°C para induzir estresse térmico e estresse por fermento mecânico. Foram avaliados seis genes de referência candidatos sob os seis estresses e realizadas análises de variáveis de crescimento; bioquímicas e fisiológicas; expressão gênica relativa à biossíntese de monoterpênicos e microextração de óleo essencial. Os estresses foram capazes de modular a morfofisiologia, expressão gênica e teor de óleo essencial. O estresse salino e hídrico provocaram as maiores alterações. Acessos poliploides, mostraram, em geral, maior crescimento e tolerância metabólica sob os estresses, quando comparados ao acesso diploide. Como resultado da avaliação dos genes de referência, o gene *NADH* foi o menos variável sob a maioria dos estresses, exceto o estresse hídrico, cujo gene *TUB* foi o mais recomendado. Os resultados, em conjunto, demonstraram que estresses abióticos são capazes de influenciar na morfofisiologia e expressão gênica, assim como modular a produção de óleos essenciais em *Lippia alba*, fornecendo subsídios para futuras estratégias de melhoramento e uso da espécie.

Palavras-chave: *Lippia alba*; estresses abióticos; morfofisiologia; monoterpênicos; expressão gênica; genes de referência.

ABSTRACT

Lippia alba (Mill) N.E. Brown, is a medicinal species whose composition of its essential oil is associated with ploidal levels (diploid, triploid and tetraploid). Polyploidy and environmental variations can lead to significant changes in the metabolic pathway. Due to the medicinal and economic importance of the species, investigating responses related to different stresses, it is important to understand the effect of polyploidy and modulate the production of compounds of interest. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of abiotic stresses on growth, physiology, essential oil production and on the expression of genes related to monoterpene pathway, in diploid, triploid and tetraploid accessions of *L. alba* cultivated for 40 days *in vitro*. Additionally, candidate reference genes in *L. alba* diploids were evaluated for different stress conditions. Thus, the three ploidal levels were cultivated *in vitro*, with the addition of 60 mM NaCl to induce salt stress; 1% PEG-4000 for water stress; 10 μ M ABA for abscisic acid stress; 10 μ M AS for salicylic acid stress; subjected to 4°C to induce thermal stress and mechanical wounding stress. Six candidate reference genes were evaluated under the six stresses and analyzes of growth variables were performed; biochemical and physiological; gene expression related to monoterpene biosynthesis and microextraction of essential oil. Stresses were able to modulate morphophysiology, gene expression and essential oil content. The salt and water stress caused the biggest changes. Polyploid accessions showed, in general, greater growth and metabolic tolerance under stress, when compared to diploid accession. As a result of the evaluation of the reference genes, the *NADH* gene was the least variable under most stresses, except water stress, whose *TUB* gene was the most recommended. The results, taken together, demonstrated that abiotic stresses are capable of influencing morphophysiology and gene expression, as well as modulating the production of essential oils in *Lippia alba*, providing input for future breeding and species use strategies.

Keywords: *Lippia alba*; abiotic stresses; morphophysiology; monoterpenes; gene expression; reference genes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Vias do mevalonato (MVA) e metileritritol fosfato (MEP) na biossíntese de mono e sesquiterpenos, ocorrem no citoplasma e cloroplastos, respectivamente. As seguintes enzimas e metabólitos estão representados: Acetil coenzima-A (acetil-CoA), gliceraldeído 3-fosfato (G3P), 2-C-metil-d-eritritol 4-fosfato (MEP), isopentenil pirofosfato (IPP), dimetilalil pirofosfato (DMAPP), mevalonato-5-pirofosfato (MVPP), farnesil pirofosfato (FPP), geranil pirofosfato (GPP) (adaptado de YANG et al., 2012).....29
- Figura 2 Acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 60 mM de NaCl. Barra = 1cm.....51
- Figura 3 Variáveis de crescimento em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 60 mM de NaCl. A: Comprimento da parte aérea (cm); B: Comprimento da maior raiz (cm); C: Número de nós; D: Número de folhas; E: Massa fresca total (g); F: Massa fresca das folhas (g); G: Massa fresca das raízes (g) e H: Área foliar (cm²). Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 60 mM NaCl; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey (n=3).....52
- Figura 4 Análises bioquímicas e fisiológicas em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 60 mM de NaCl. A: Ascorbato peroxidase; B: Catalase; C: Peroxidase; D: Peroxidação de lipídeos; E: Peróxido de hidrogênio; F: Eficiência fotoquímica FS(II); G: Prolina. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 60 mM NaCl; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey (n=3).....54
- Figura 5 Expressão de genes relacionados à síntese de terpenos em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 60 mM de NaCl. A: *LIS1* (S-linalol sintase) e B: *GDS* (geranil desidrogenase) O gene *CIT* (citocromo b) foi usado como controle endógeno. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 60 mM

	NaCl; minúscula: entre ploidias) acima da barra indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste <i>t</i> de Student (n=3).....55
Figura 6	Componente majoritário do óleo essencial (% m/m) em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de <i>L. alba</i> , cultivados por 40 dias <i>in vitro</i> em meio MS com 0 e 60 mM de NaCl. A: Linalol e B: Citral. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 60 mM NaCl; minúscula: entre ploidias) acima da barra indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste <i>t</i> de Student (n=3).....56
Figura 7	Perfil cromatográfico dos constituintes do óleo essencial em <i>L. alba</i> . 0 mM NaCl (A: diploide; C: triploide; E: tetraploide); 60 mM NaCl (B: diploide; D: triploide; F: tetraploide). Tempos de retenção: linalol (10,87), neral (12,68) e geranial (12,98).....57
Figura 8	Acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de <i>L. alba</i> , cultivados por 40 dias <i>in vitro</i> em meio MS com 0 e 1% PEG. Barra = 1cm.....59
Figura 9	Variáveis de crescimento em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de <i>L. alba</i> , cultivados por 40 dias <i>in vitro</i> em meio MS com 0 e 1% PEG. A: Comprimento da parte aérea (cm); B: Comprimento da maior raiz (cm); C: Número de nós; D: Número de folhas; E: Massa fresca total (g); F: Massa fresca das folhas (g); G: Massa fresca das raízes (g) e H: Área foliar (cm ²). Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 1% PEG; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey (n=3).....60
Figura 10	Análises bioquímicas e fisiológicas em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de <i>L. alba</i> , cultivados por 40 dias <i>in vitro</i> em meio MS com 0 e 1% PEG. A: Ascorbato peroxidase; B: Catalase; C: Peroxidase; D: Peroxidação de lipídeos; E: Peróxido de hidrogênio; F: Eficiência fotoquímica do FS(II); G: Prolina. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 1% PEG; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey (n=3).....62
Figura 11	Expressão de genes relacionados à síntese de terpenos em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de <i>L. alba</i> , cultivados por 40 dias <i>in vitro</i> em meio MS com 0 e 1% PEG. A: <i>LIS1</i> (S-linalol sintase) e B: <i>GDS</i> (geraniol desidrogenase) O

gene *CIT* (citocromo b) foi usado como controle endógeno. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 1% PEG; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).....63

- Figura 12 Componente majoritário do óleo essencial (% m/m) em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 1% PEG. A: Linalol e B: Citral. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 1% PEG; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).....64
- Figura 13 Perfil cromatográfico dos constituintes do óleo essencial em *L. alba*. 0 PEG (A: diploide; C: triploide; E: tetraploide); 1% PEG (B: diploide; D: triploide; F: tetraploide). Tempos de retenção: linalol (10,87), neral (12,68) e geranial (12,98).....65
- Figura 14 Acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 μM de ABA. Barra = 1cm.....67
- Figura 15 Variáveis de crescimento em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 μM de ABA. A: Comprimento da parte aérea (cm); B: Comprimento da maior raiz (cm); C: Número de nós; D: Número de folhas; E: Massa fresca total (g); F: Massa fresca das folhas (g); G: Massa fresca das raízes (g) e H: Área foliar (cm^2). Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 10 μM de ABA; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey ($n=3$).....68
- Figura 16 Análises bioquímicas e fisiológicas em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 μM de ABA. A: Ascorbato peroxidase; B: Catalase; C: Peroxidase; D: Peroxidação de lipídeos; E: Peróxido de hidrogênio; F: Eficiência fotoquímica do FS(II); G :Prolina. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 10 μM de ABA; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey ($n=3$).....70
- Figura 17 Expressão de genes relacionados à síntese de terpenos em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 μM de

ABA. A: *LIS1* (S-linalol sintase) e B: *GDS* (geraniol desidrogenase) O gene CIT (citocromo b) foi usado como controle endógeno. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 10 μ M de ABA; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).....71

- Figura 18 Componente majoritário do óleo essencial (% m/m) em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 μ M de ABA. A: Linalol e B: Citral. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 10 μ M de ABA; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$)....72
- Figura 19 Perfil cromatográfico dos constituintes do óleo essencial em *L. alba*. 0 μ M de ABA (A: diploide; C: triploide; E: tetraploide); 10 μ M de ABA (B: diploide; D: triploide; F: tetraploide). Tempos de retenção: linalol (10,87), neral (12,68) e geraniol (12,98).....73
- Figura 20 Acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 μ M de AS. Barra = 1cm.....74
- Figura 21 Variáveis de crescimento em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 μ M de AS. A: Comprimento da parte aérea (cm); B: Comprimento da maior raiz (cm); C: Número de nós; D: Número de folhas; E: Massa fresca total (g); F: Massa fresca das folhas (g); G: Massa fresca das raízes (g) e H: Área foliar (cm²). Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 10 μ M de AS; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey ($n=3$).....75
- Figura 22 Análises bioquímicas e fisiológicas em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 μ M de AS. A: Ascorbato peroxidase; B: Catalase; C: Peroxidase; D: Peroxidação de lipídeos; E: Peróxido de hidrogênio; F: Eficiência fotoquímica do FS(II); G: Prolina. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 10 μ M de AS; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey ($n=3$).....77

- Figura 23 Expressão de genes relacionados à síntese de terpenos em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 μM de AS. A: *LIS1* (S-linalol sintase) e B: *GDS* (geraniol desidrogenase) O gene *CIT* (citocromo b) foi usado como controle endógeno. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 10 μM de AS; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).....78
- Figura 24 Componente majoritário do óleo essencial (% m/m) em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 μM de AS. A: Linalol e B: Citral. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 10 μM de AS; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$)....79
- Figura 25 Perfil cromatográfico dos constituintes do óleo essencial em *L. alba*. 0 μM de AS (A: diploide; C: triploide; E: tetraploide); 10 μM de AS (B: diploide; D: triploide; F: tetraploide). Tempos de retenção: linalol (10,87), neral (12,68) e geranial (12,98).....80
- Figura 26 Acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS, sem e com fermento. Barra = 1cm.....82
- Figura 27 Variáveis de crescimento em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS sem e com fermento. A: Comprimento da parte aérea (cm); B: Comprimento da maior raiz (cm); C: Número de nós; D: Número de folhas; E: Massa fresca total (g); F: Massa fresca das folhas (g); G: Massa fresca das raízes (g) e H: Área foliar (cm^2). Letras iguais (maiúscula: entre sem e com fermento; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey ($n=3$).....83
- Figura 28 Análises bioquímicas e fisiológicas em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS sem e com fermento. A: Ascorbato peroxidase; B: Catalase; C: Peroxidase; D: Peroxidação de lipídeos; E: Peróxido de hidrogênio; F: Eficiência fotoquímica do FS(II); G: Prolina. Letras iguais (maiúscula: entre sem e com fermento; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam

	diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey (n=3).....	85
Figura 29	Expressão de genes relacionados à síntese de terpenos em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de <i>L. alba</i> , cultivados por 40 dias <i>in vitro</i> em meio MS sem e com fermento. A: <i>LIS1</i> (S-linalol sintase) e B: <i>GDS</i> (geraniol desidrogenase) O gene <i>CIT</i> (citocromo b) foi usado como controle endógeno. Letras iguais (maiúscula: entre sem e com fermento; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste <i>t</i> de Student (n=3).....	86
Figura 30	Componente majoritário do óleo essencial (% m/m) em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de <i>L. alba</i> , cultivados por 40 dias <i>in vitro</i> em meio MS sem e com fermento. A: Linalol e B: Citral. Letras iguais (maiúscula: entre sem e com fermento; minúscula: entre ploidias) acima da barra indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste <i>t</i> de Student (n=3).....	86
Figura 31	Perfil cromatográfico dos constituintes do óleo essencial em <i>L. alba</i> . Sem fermento (A: diploide; C: triploide; E: tetraploide); com fermento (B: diploide; D: triploide; F: tetraploide). Tempos de retenção: linalol (10,87), neral (12,68) e geraniol (12,98).....	87
Figura 32	Acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de <i>L. alba</i> , cultivados por 40 dias <i>in vitro</i> em meio MS, sob 25°C e 4°C. Barra = 1cm.....	88
Figura 33	Variáveis de crescimento em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de <i>L. alba</i> , cultivados por 40 dias <i>in vitro</i> em meio MS sob 25°C e 4°C. A: Comprimento da parte aérea (cm); B: Comprimento da maior raiz (cm); C: Número de nós; D: Número de folhas; E: Massa fresca total (g); F: Massa fresca das folhas (g); G: Massa fresca das raízes (g) e H: Área foliar (cm ²). Letras iguais (maiúscula: entre 25°C e 4°C; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey (n=3).....	90
Figura 34	Análises bioquímicas e fisiológicas em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de <i>L. alba</i> , cultivados por 40 dias <i>in vitro</i> em meio MS sob 25°C e 4°C. A: Ascorbato peroxidase;	

B: Catalase; C: Peroxidase; D: Peroxidação de lipídeos; E: Peróxido de hidrogênio; F: Eficiência fotoquímica FS(II); G: Prolina. Letras iguais (maiúscula: entre 25°C e 4°C; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey ($n=3$).....92

- Figura 35 Expressão de genes relacionados à síntese de terpenos em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS sob 25°C e 4°C. A: *LIS1* (S-linalol sintase) e B: *GDS* (geraniol desidrogenase) O gene *CIT* (citocromo b) foi usado como controle endógeno. Letras iguais (maiúscula: entre 25°C e 4°C; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).....93
- Figura 36 Componente majoritário do óleo essencial (% m/m) em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS sob 25°C e 4°C. A: Linalol e B: Citral. Letras iguais (maiúscula: entre 25°C e 4°C; minúscula: entre ploidias) acima da barra indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).....94
- Figura 37 Perfil cromatográfico dos constituintes do óleo essencial em *L. alba*. 25°C (A: diploide; C: triploide; E: tetraploide); 4°C (B: diploide; D: triploide; F: tetraploide). Tempos de retenção: linalol (10,87), neral (12,68) e geranial (12,98).....95
- Figura 38 Expressão relativa aos genes *TUB* (salino e ABA); *RNApol* (hídrico e fermento) e *G6i* (AS e térmico) em *L. alba* (2x-BGEN-39), cultivada por 40 dias *in vitro*. Os genes *NADH* e *ELONG* (salino e AS); *TUB* e *CIT* (hídrico); *NADH* e *G6i* (ABA); *NADH* e *CIT* (ferimento) e *NADH* e *TUB* (térmico), foram tomados como genes referência separadamente. Letras iguais (maiúscula: entre mesma ploidia; minúscula: entre ploidias) acima da barra indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).....101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência de <i>primers</i> para as reações de RT-qPCR. F: <i>Forward</i> (senso); R: <i>Reverse</i> (anti-senso).....47
Tabela 2	Sequência de <i>primers</i> candidatos à genes de referência. F: <i>Foward</i> (senso); R: <i>Reverse</i> (anti-senso).....49
Tabela 3	Valores de estabilidade da expressão de seis genes de referência candidatos em <i>L. alba</i> (2x) cultivado <i>in vitro</i> , sob estresses salino (0 e 60 mM NaCl); hídrico (0 e 1% PEG); hormônios exógenos (0 e 10 µM de ABA e AS); com e sem fermento e térmico (25°C e 4°C) pela ferramenta BestKeeper.....96
Tabela 4	Valores de estabilidade da expressão (M) de seis genes de referência candidatos em <i>L. alba</i> (2x) cultivado <i>in vitro</i> , sob estresses salino (0 e 60 mM NaCl); hídrico (0 e 1% PEG); hormônios exógenos (0 e 10 µM de ABA e AS); com e sem fermento e térmico (25°C e 4°C) pela ferramenta GeNorm.....97
Tabela 5	Valores de estabilidade da expressão de seis genes de referência candidatos em <i>L. alba</i> (2x) cultivado <i>in vitro</i> , sob estresses salino (0 e 60 mM NaCl); hídrico (0 e 1% PEG); hormônios exógenos (0 e 10 µM de ABA e AS); com e sem fermento e térmico (25°C e 4°C) pela ferramenta NormFinder.....98
Tabela 6	Valores de estabilidade da expressão de seis genes de referência candidatos em <i>L. alba</i> (2x) cultivado <i>in vitro</i> , sob estresses salino (0 e 60 mM NaCl); hídrico (0 e 1% PEG); hormônios exógenos (0 e 10 µM de ABA e AS); com e sem fermento e térmico (25°C e 4°C) e recomendação geral, pela ferramenta RefFinder.....100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% = porcentagem
°C = grau Celcius
μL = microlitro
μM = micromolar
ABA = ácido abscísico
APX = ascobato peroxidase
AS = ácido salicílico
CAT = catalase
cDNA = DNA complementar
CG-EM = cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
CIT = citocromo *b*
cm = centímetro
cm² = centímetro quadrado (área)
CO₂ = dióxido de carbono
CoA = acetil-Coenzima A
CT = ciclo *threshol*
DMAPP = diametialil pirofosfato
DNA = ácido desoxirribonucleico
EDTA = ácido etilenodiaminotetracético
ELISA = ensaio imunoenzimático
ELONG = fator de alongação 1-α
EROs = espécies reativas de oxigênio
FPP = farnesil pirofosfato
FSII = fotossistema II
Fv/Fm = máximo rendimento quântico fotoquímico
g = grama
g = força G
G6i = glicose-6- fosfato isomerase
GDS = geraniol desidrogenase
h = hora
H₂O₂ = peróxido de hidrogênio
ICB = Instituto de Ciências Biológicas
IPP = isopentenil pirofostato
kPa = kilopascal
L = litro
L. alba = *Lippia alba*
LIS1 = S-linalol sintase
m = metro
M = molar
MDA = malondialdeído
MEP = metileritritol fosfato
min = minuto
mL = mililitro
mm = milímetro
mM = milimolar
mmol = milimol
MS = Murashige e Skoog

MVA = ácido mevalônico
n = número haploide de cromossomos
n = número de replicata biológica
NaCl = cloreto de sódio
NADH = nicotinamida-adenina dinucleotídeo desidrogenase
nm = nanômetro
p/v = peso/volume
pb = pares de bases
PEG = polietilenoglicol
pH = potencial hidrogeniônico
POD = peroxidase oxireductase
PVPP = polivinilpolipirrolidona
RNA = ácido ribonucleico
RNApol = RNA polimerase
rpm = rotações por minuto
RT-qPCR = reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
s = segundo
TBA = ácido 2-tiobarbitúrico
TCA = ácido tricloroacético
TPs = terpeno sintases
TUB = α -tubulina
UFJF = Universidade Federal de Juiz de Fora
x = número cromossômico básico
 α = alfa

SUMÁRIO

RESUMO.....	22
ABSTRACT	24
1 INTRODUÇÃO GERAL	25
1.2 <i>Lippia alba</i>	27
1.3 ÓLEO ESSENCIAL.....	28
2.3 POLIPLOIDES E ÓLEO ESSENCIAL	31
1.4 EFEITOS DE ESTRESSES ABIÓTICOS.....	32
1.5 FERRAMENTAS PARA AVALIAÇÃO DE ESTRESSES EM PLANTAS	36
1.6 ANÁLISE DE GENES DE REFERÊNCIA	38
2 MATERIAL E MÉTODOS	40
2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	41
2.3 ESTRESSES ABIÓTICOS	41
2.4 ANÁLISES DE CRESCIMENTO	42
2.5 QUANTIFICAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	42
2.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	43
2.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	44
2.8 MÁXIMO RENDIMENTO QUÂNTICO FOTOQUÍMICO (Fv/Fm).....	44
2.9 PROLINA	44
3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	45
3.2 SÍNTESE DE cDNA	45
3.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL.....	46
4 MICROEXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL.....	47
5 AVALIAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA.....	48
6 RESULTADOS DOS ESTRESSES	49
6.1 ESTRESSE SALINO	49
6.1.1 ANÁLISE DE CRESCIMENTO	50
6.1.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS ESTRESSE SALINO	53
6.1.3 EXPRESSÃO GÊNICA ESTRESSE SALINO	55
6.1.4 MICROEXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL ESTRESSE SALINO	55
6.2 RESULTADOS ESTRESSE HÍDRICO	58
6.2.1 RESULTADOS ANÁLISE DE CRESCIMENTO	58
6.2.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS	61
6.2.3 EXPRESSÃO GÊNICA.....	63

6.2.4 MICROEXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL.....	63
6.3 RESULTADOS HORMÔNIO EXÓGENO: ÁCIDO ABSCÍSICO	66
6.3.1 ANÁLISE DE CRESCIMENTO	66
6.3.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS	69
6.3.3 EXPRESSÃO GÊNICA.....	71
6.3.4 MICROEXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL.....	71
6.4 RESULTADOS HORMÔNIO EXÓGENO: ÁCIDO SALICÍLICO	74
6.4.1 ANÁLISE DE CRESCIMENTO	74
6.4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS	76
6.4.3 EXPRESSÃO GÊNICA.....	78
6.4.4 MICROEXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL.....	78
6.5 RESULTADOS ESTRESSE POR FERIMENTO	81
6.5.1 ANÁLISE DE CRESCIMENTO	81
6.5.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS	84
6.5.3 EXPRESSÃO GÊNICA.....	86
6.4.4 MICROEXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL.....	86
6.6 RESULTADOS ESTRESSE TÉRMICO	88
6.6.1 ANÁLISE DE CRESCIMENTO	88
6.6.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS	91
6.6.3 EXPRESSÃO GÊNICA.....	93
6.6.4 MICROEXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL.....	93
7 RESULTADOS GENES DE REFERÊNCIA.....	96
7.1 BestKeeper	96
7.2 GeNorm	97
7.3 NormFinder	98
7.4 RefFinder	99
8 EXPRESSÃO GÊNICA GENES DE REFERÊNCIA	101
9 DISCUSSÃO	102
10 CONCLUSÕES	113
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
APÊNDICE A – Quadro comparativo	120
APÊNDICE B – Gráficos BestKeeper, GeNorm, NormFinder	121
APÊNDICE C – Gráficos RefFinder	122

RESUMO

A poliploidia pode modular o perfil metabólico das plantas, como na morfofisiologia, expressão gênica e rota biossintética dos óleos essenciais. Além disso, estresses ambientais também podem provocar alterações na via metabólica. *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown, é uma espécie medicinal com ampla variação genética, fenotípica e química, sendo a composição de seu óleo essencial associada aos níveis de ploidia. Devido ao potencial medicinal e econômico da espécie, investigar respostas relacionadas a diferentes estresses, torna-se importante para se compreender a produção do seu óleo essencial. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de estresses abióticos (salino, estresse hídrico, hormônios exógenos ácido abscísico e ácido salicílico, fermento e térmico) na morfofisiologia, produção de óleo essencial e na expressão de genes relacionados à síntese de monoterpenos, em acessos diploide, triploide e tetraploide de *Lippia alba* cultivados por 40 dias *in vitro*. Para indução dos estresses, foram adicionados ao meio de cultivo 60 mM NaCl (estresse salino); 1% PEG-4000 (estresse hídrico); 10 μ M ABA (estresse por ácido abscísico); 10 μ M AS (estresse por ácido salicílico); submetidos à 4°C (estresse térmico) e fermento mecânico. Foram realizadas análises de variáveis de crescimento; bioquímicas e fisiológicas (APX, CAT, POX, MDA, H₂O₂, eficiência fotoquímica do fotossistema II e prolina); expressão gênica relativa às enzimas (S)-Linalol sintase (*LIS1*), Geraniol desidrogenase (*GDS*) e microextração de óleo essencial. Dentro de cada nível de ploidia, o estresse salino e hídrico, modularam a morfofisiologia, expressão gênica e o teor de óleo essencial para os acessos diploide e triploide. Além disso, os estresses por hormônio exógeno ácido salicílico, aumentou o teor de linalol no acesso triploide, e o ácido abscísico, provocaram a diminuição na expressão de linalol do acesso tetraploide. Já o estresse térmico, provocou alteração em variáveis bioquímicas para o acesso diploide. O estresse por fermento, provocou alteração da eficiência fotoquímica do fotossistema II para o acesso triploide. Acessos poliploides evidenciaram, maior crescimento e tolerância metabólica sob estresse, quando comparados ao acesso diploide. Os resultados demonstraram que os estresses abióticos foram capazes de alterar a morfofisiologia e expressão gênica, bom como modular a produção de óleo essencial em *Lippia alba*, abrindo novas possibilidades de uso e melhoramento da espécie. Na tentativa de avaliar diferentes genes de referência para a espécie, a técnica de RT-qPCR é uma das principais ferramentas para o estudo da expressão gênica, e precisa de normalização com um gene de referência estável. Diferentes condições experimentais podem alterar a expressão dos genes normalizadores. Assim, também objetivou-se com esse trabalho, avaliar genes de referência para uso em análise de RT-qPCR em acesso diploide de *L. alba*. Foram analisados seis genes constitutivos (*NADH*, *CIT*, *G6i*, *TUB*, *RNApol* e *ELONG*), a partir das ferramentas BestKeeper, GeNorm, NormFinder e RefFinder. Os resultados confirmaram o conhecimento prévio de que diferentes condições experimentais podem afetar a expressão dos genes de referência. O gene *TUB* foi o mais estável sob estresse hídrico. Entretanto, o gene *NADH* mostrou-se estável, para a maioria dos estresses abióticos (salino, hormônios exógenos, fermento e térmico). Ambos são, portanto, recomendados para serem empregados como genes de referência em estudos de expressão gênica em acessos diploides de *L. alba* sob condições ambientais específicas. A recomendação de genes estáveis, permite auxiliar posteriores estudos de expressão gênica para a espécie.

Palavras-chave: *Lippia alba*; poliploidia; estresses abióticos; morfofisiologia; monoterpenos; genes de referência; expressão gênica.

ABSTRACT

Polyploidy can modulate the metabolic profile of plants, as in morphophysiology, gene expression and biosynthetic route of essential oils. In addition, environmental stresses can also cause changes in the metabolic pathway. *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown, is a medicinal species with wide genetic, phenotypic and chemical variation, the composition of its essential oil being associated with ploidal levels. Due to the medicinal and economic potential of the species, investigating responses related to different stresses, becomes important to understand the production of its essential oil. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of abiotic stresses (saline, water stress, exogenous hormones abscisic acid and salicylic acid, wounding and heat) on morphophysiology, production of essential oil and on the expression of genes related to the synthesis of monoterpenes, in diploid, triploid and tetraploid accessions of *Lippia alba* cultivated for 40 days *in vitro*. For stress induction, 60 mM NaCl (saline stress) was added to the MS medium; 1% PEG-4000 (water stress); 10 μ M ABA (abscisic acid stress); 10 μ M AS (salicylic acid stress); subjected to 4°C (thermal stress) and mechanical wounding. Analysis of growth variables was performed; biochemical and physiological (APX, CAT, POX, MDA, H₂O₂, photochemical efficiency of photosystem II and proline); gene expression related to (S) -Linalol synthase (LIS1), Geraniol dehydrogenase (GDS) and microextraction of essential oil. Within each ploidal level, saline and water stress, modulated morphophysiology, gene expression and essential oil content for diploid and triploid accessions. In addition, stresses due to exogenous hormone salicylic acid, increased the linalool content in the triploid accession, and abscisic acid, caused the decrease in the linalool expression of the tetraploid accession. Thermal stress, on the other hand, caused changes in biochemical variables for diploid accession. Stress due to injury caused a change in the photochemical efficiency of photosystem II for triploid accession. Polyploid accessions showed greater growth and metabolic tolerance under stress, when compared to diploid accession. The results showed that the abiotic stresses were able to alter the morphophysiology and gene expression, as well as modulate the production of essential oil in *Lippia alba*, opening new possibilities of use and improvement of the species. In an attempt to evaluate different reference genes for the species, the RT-qPCR technique is one of the main tools for the study of gene expression, and needs normalization with a stable reference gene. Different experimental conditions, can alter the expression of normalized genes. Thus, the objective of this work was to evaluate reference genes for RT-qPCR in diploid accession of *L. alba*. Six constitutive genes (*NADH*, *CIT*, *G6i*, *TUB*, *RNApol* and *ELONG*) were analyzed, using the BestKeeper, GeNorm, NormFinder and RefFinder tools. The results confirmed the previous knowledge that different experimental conditions can affect the expression of the reference genes. The *TUB* gene was the most stable under water stress. However, the *NADH* gene proved to be stable for most of the abiotic stresses (saline, exogenous hormones, wounding and thermal). Both are, therefore, recommended to be used as reference genes in studies of gene expression in diploid accessions of *L. alba* under specific environmental conditions. The recommendation of stable genes, helps further studies of gene expression for the species.

Keywords: *Lippia alba*; polyploidy; abiotic stresses; morphophysiology; monoterpenes; reference genes; gene expression.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Estímulos bióticos e abióticos, particularmente relacionados à natureza sésil das plantas, frequentemente contribuem para modular a produção de metabólitos (MOORE et al., 2014; MOHAMMADI et al., 2019). Estudos sobre os perfis metabólicos em plantas poliploides, têm mostrado alterações nos mecanismos que regulam a biossíntese dos compostos voláteis (FASANO et al., 2016) cujas vias biossintéticas são complexas e ainda pouco estudadas (DELGODA e MURRAY, 2017; HENRY et al., 2018; HEMMERLIN et al., 2012).

Diferentes estresses causam indução do estresse oxidativo, que pode afetar o desenvolvimento da planta como um todo. Porém, ao longo da evolução, as plantas desenvolveram sistemas antioxidantes de proteção (CHOUDHURY et al., 2017), através dos sistemas enzimáticos e não-enzimáticos, para amenizar os efeitos tóxicos celulares (KAUR e ASTHIR, 2015; KONG et al., 2016). Foram relatadas alterações no metabolismo primário, no perfil de expressão gênica e de óleos essenciais para diversas plantas submetidas a estresses como baixas temperaturas, ferimento, salino, estresse hídrico e uso de hormônios como ácido salicílico e abiscísico (BAE et al., 2016; BÚFALO et al., 2016; SENJI e MANDOULAKANI, 2018; ZHOU et al., 2018; AZIZ et al., 2019; LUCHO et al., 2019; SHELKE et al., 2019).

Os óleos essenciais estão presentes em pequenas quantidades nas plantas, oriundos do metabolismo secundário. Podem ser considerados insumos importantes para a fabricação de produtos nas indústrias de cosméticos, perfumaria, agroquímicos, fármacos e alimentos. Além disso, possuem grande papel ecológico, uma vez que atraem polinizadores e, atuam na defesa contra predadores e patógenos (HUSSAIN et al., 2012; JACOB et al., 2017). Os terpenos, por exemplo, são uns dos compostos secundários mais produzidos pelas plantas que conferem importantes propriedades medicinais e valor econômico (JACOB et al., 2017; GUERRIERO et al., 2018).

Lippia alba (Mill) N. E. Brown (Verbenaceae) é uma espécie com grande plasticidade fenotípica, genética e química. Cinco números cromossômicos revelaram um complexo poliploide que produz, em maior quantidade, monoterpenos cujas propriedades são amplamente utilizadas na medicina popular na indústria (REIS et al., 2014). Além disso, também pode ser considerada uma espécie com plasticidade

fisiológica em resposta a estresses abióticos, que podem provocar alterações no metabolismo primário e secundário, bem como modular a expressão de genes relacionados à produção dos óleos essenciais (BATISTA et al., 2016a, 2016b, 2017).

Em *Lippia alba*, estudos envolvendo os estresses lumínico, por dióxido de carbono, hídrico, salinidade e fotoperíodo, demonstraram alterações no perfil de expressão gênica (BATISTA et al., 2016a, 2017b) e do perfil de monoterpenos majoritários (CASTRO, et al., 2019, 2020a, 2020b), em um acesso triploide. Entretanto, efeitos de estresses como frio, fermento e aplicação de hormônios exógenos ainda não foram relatados para a espécie, assim como os estresses salino e estresse hídrico não foram estudados *in vitro*, considerando-se mais de um nível de ploidia.

Diante da falta de informações, impacto econômico e medicinal, investigar respostas morfofisiológicas e de expressão gênica relacionadas a diferentes estresses em *Lippia alba*, se torna importante para otimizar a produção de óleos essenciais e entender, comparativamente, o comportamento de diferentes níveis de ploidia. Desta forma, o presente trabalho pretende responder às perguntas: (1) Qual o efeito comparativo de diferentes estresses em *Lippia alba*? (2) Diploides e poliploides respondem diferentemente à estresses abióticos?

Para responder a essas perguntas, acessos diploide, triploide e tetraploide de *Lippia alba* foram avaliados do ponto de vista bioquímico, morfológico, da produção de óleos essenciais e da expressão de genes relacionados à síntese de monoterpenos, sob diferentes condições de estresse. Adicionalmente, serão avaliados genes de referência candidatos em acesso diploide, na tentativa de contribuir para futuros estudos de expressão gênica na espécie sob estresses abióticos.

1.2 *Lippia alba*

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown é um arbusto aromático que pertence à família Verbenaceae. Espécie tropical amplamente usada pela população da América do Sul e Central (DI STASI et al., 2002; HENNEBELLE et al., 2008; REIS et al., 2014) e ocorre em campos, brejos e florestas. O Brasil, é o país que concentra maior número de registros da espécie, com ampla distribuição ao longo do território (PASCUAL et al., 2001a; HENNEBELLE et al., 2008; SALIMENA e MÚLGURA, 2015).

A espécie é conhecida como erva-cidreira do campo, alecrim do campo, falsa-melissa e chá-de-tabuleiro (HOLETZ et al., 2002) e seu uso na medicina tradicional evidencia sua importância. Seus extratos são utilizados principalmente por possuírem propriedades neurosedativas, analgésicas, antioxidantes, e antiinflamatórias, usadas no tratamento de gripe, bronquite, infecção cutânea, diarreia, problema cardíaco e desordem menstrual (PASCUAL et al., 2001b; HENNEBELLE et al., 2008; CONDE et al., 2011; TAVARES, MOMENTÉ, NASCIMENTO, 2011; CARMONA et al., 2013; CHIES et al., 2013). Assim, é uma espécie promissora para uso em indústrias farmacêuticas e cosméticas, também possui propriedades antifúngicas, antimicrobianas e antivirais (HENNEBELLE et al., 2008).

Estudos anteriores, revelaram que a espécie possui cinco ploidias descritas, sendo um complexo poliploide, com cinco números cromossômicos. Os citótipos descritos incluem diploides ($2n = 2x = 30$), aneuploides ($2n = 2x + 8 = 38$), triploides ($2n = 3x = 45$), tetraploides ($2n = 4x = 60$) e hexaploide ($2n = 6x = 90$). Apresenta grande plasticidade fenotípica e genômica originada possivelmente por autoploidia. Cruzamentos intraespecíficos envolvendo gametas desbalanceados e/ou não reduzidos, aliados à duplicações cromossômicas ao longo do tempo provavelmente contribuíram para formar o complexo como é visto hoje (REIS et al., 2014; VICCINI et al., 2014; LOPES et al., 2020).

A espécie pode ser considerada um importante modelo para estudos de poliploidização e do metabolismo secundário, onde predominam os terpenos (VICCINI et al., 2014; LOPES et al., 2020), visto que autoploidios naturais são pouco estudados devido à semelhança morfológica aos seus progenitores diploides (SOLTIS e SOLTIS, 2000) e as rotas biossintéticas dos terpenos são complexas e permanecem pouco estudadas (DELGODA e MURRAY, 2017).

1.3 ÓLEO ESSENCIAL

A crescente procura por substâncias biologicamente ativas permite o maior uso dos óleos essenciais na indústria, principalmente como reagentes para a produção de novos compostos semissintéticos. Esses produtos são desenvolvidos, com o objetivo de aumentar suas atividades biológicas e também reduzir a volatilidade, com finalidade em aplicações farmacológicas, alimentares e cosméticas (ZHAO, DAVIS, VERPOORTE, 2005; FIGUEIREDO et al., 2007; FUMAGALI et al., 2008; BIZZO, HOVELL, REZENDE, 2009; FIGUEIREDO, PEDRO, BARROSO, 2014; JACOB et al., 2017).

Segundo Figueiredo et al. (2007), óleos essenciais produzidos nas folhas das plantas, são tóxicos para pragas e alguns patógenos, com a vantagem de não se acumularem no meio ambiente. Assim, o fato de que são naturais, biodegradáveis, possuem baixa toxicidade para mamíferos e são capazes de realizar, ao mesmo tempo, a função de mais de um dos seus equivalentes sintéticos, contribuem para seu uso (FIGUEIREDO et al., 2007; ZULIAN, DÖRR, ALMEIDA, 2013).

Os óleos essenciais acumulam-se principalmente em estruturas secretoras especializadas como tricomas glandulares, ductos, canais e laticíferos, em órgãos como flores, folhas e caules (FIGUEIREDO et al., 2007; FIGUEIREDO, PEDRO, BARROSO, 2014; TIWARI e RANA, 2015). Possuem composição química complexa e de baixo peso molecular, que pode variar entre as espécies, sendo constituídos principalmente por derivados terpênicos como os monoterpenos, sesquiterpenos e os fenilpropanoides (MIRANDA et al., 2016).

Além disso, a composição desses óleos depende de fatores ecológicos, fisiológicos, geográficos e genéticos, além do desenvolvimento da planta (FIGUEIREDO, PEDRO, BARROSO, 2014), garantindo aos vegetais vantagens adaptativas no meio em que estão inseridos. Os terpenos, em especial os monoterpenos e sesquiterpenos, apresentam efeitos de proteção contra a herbivoria, patógenos, perda de água, temperatura, efeitos alelopáticos e também atração de polinizadores (BARROS, ZAMBARDA, HEINZMANN, 2009; JACOB et al., 2017).

Os metabólitos secundários que compõem os óleos essenciais são moléculas voláteis, biossintetizadas a partir de isômeros de isopreno, isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalil pirofosfato (DMAPP), constituirão os monômeros que

darão origem aos diferentes terpenos, principalmente monoterpenos e sesquiterpenos, principais substâncias constituintes dos óleos essenciais nas plantas (JACOB et al., 2017).

A partir da união de IPP com DMAPP forma-se o geranyl pirofosfato (GPP), precursor dos monoterpenos na via cloroplastidial, chamada de metileritritol fosfato (MEP). A união de dois IPP com DMAPP leva à formação de farnesil pirofosfato (FPP), precursor dos sesquiterpenos na via citoplasmática do ácido mevalônico (MVA). As duas vias biossintéticas alternativas estão localizadas em compartimentos subcelulares diferentes, ocorrem de maneira simultânea e trocam isômeros de isopreno entre si (Figura 1) (BARROS, ZAMBARDA, HEINZMANN, 2009; NAGEGOWDA, 2010; HEMMERLIN, HARWOOD, BACH, 2012; JACOB et al., 2017).

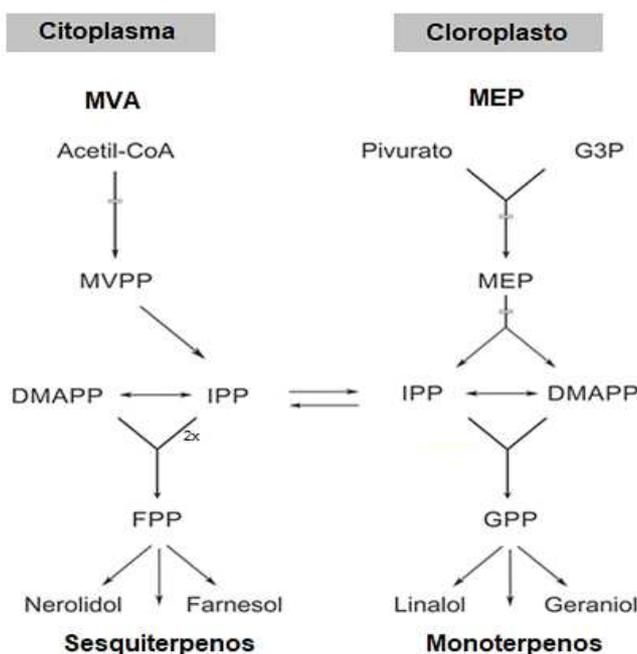


Figura 1 - Vias do mevalonato (MVA) e metileritritol fosfato (MEP) na biossíntese de mono e sesquiterpenos, ocorrem no citoplasma e cloroplastos, respectivamente. As seguintes enzimas e metabólitos estão representados: Acetil coenzima-A (acetil-CoA), gliceraldeído 3-fosfato (G3P), 2-C-metil-d-eritritol 4-fosfato (MEP), isopentenil pirofosfato (IPP), dimetilalil pirofosfato (DMAPP), mevalonato-5-pirofosfato (MVPP), farnesil pirofosfato (FPP), geranyl pirofosfato (GPP); 2x: dois IPP (adaptado de YANG et al., 2012).

Para a ativação da biossíntese dos metabólitos secundários são necessários sinais extracelulares ou intracelulares percebidos por receptores de membrana plasmática ou endomembrana. Assim, a percepção dos mesmos inicia redes de transdução de sinal que leva à ativação dos fatores de transcrição que

inativam ou ativam a expressão dos genes envolvidos na produção dos óleos essenciais (ZHAO, DAVIS, VERPOORTE, 2005).

Uma das famílias particularmente rica nestes metabólitos secundários é a família Verbenaceae, a qual exhibe grande diversidade química como flavonoides, alcaloides, taninos, esteroides, terpenos, entre outros (FIGUEIREDO et al., 2007; CASER et al., 2019). Em *L. alba*, o óleo essencial é armazenado nas folhas, particularmente na epiderme foliar, caule e parênquima (TAVARES, MOMENTÉ, NASCIMENTO, 2011). Batista et al. (2016a) relataram a presença de óleos essenciais nos tricomas glandulares de superfície em *L. alba* utilizando teste histoquímico em seção transversal de suas folhas.

O óleo essencial de *L. alba* e as variações nos seus constituintes, dividem a espécie em quimiotipos, termo que refere-se à genótipos de uma mesma espécie com compostos voláteis majoritários específicos (HENNEBELLE et al., 2008; TAVARES, MOMENTÉ, NASCIMENTO, 2011; TELES et al., 2012). Estudos anteriores sugerem uma possível relação entre a produção de óleo e o conteúdo de DNA (VICCINI et al., 2014).

Em *L. alba* predominam os terpenos e, notoriamente, diploides e tetraploides possuem como componente majoritário de seus óleos essenciais o citral (VICCINI et al., 2014), que possui atividade fungicida (PEIXOTO, BLANK, ARRIGONI-BLANK, 2018) e sedativa (VALE et al., 2002). Já os triploides produzem linalol como principal terpeno majoritário (VICCINI et al., 2014), com atividade bactericida (TOFIÑO-RIVERA et al., 2016); analgésica (OLIVEIRA et al., 2018), também usado na perfumaria e cosméticos diversos (CHISVERT et al., 2007) e como inseticida (SENJI; MANDOULAKANI, 2018). A biossíntese desses monoterpenos inclui as terpeno sintases (TPs) que sintetizam linalol e geraniol. Já o citral é obtido naturalmente pela mistura de dois isômeros, o geraniol e neral, provenientes da degradação do geraniol. (BARROS, ZAMBARDA, HEINZMANN, 2009; PEIXOTO, BLANK, ARRIGONI-BLANK, 2018).

2.3 POLIPLÓIDES E ÓLEO ESSENCIAL

A poliploidia é apontada como principal força evolutiva para a diversificação das angiospermas, sendo definida pela existência de mais de dois conjuntos cromossômicos no mesmo núcleo. Pode resultar em especiação ao longo do tempo, aumentando a biodiversidade e fornecendo novo material genético para a evolução (JIAO et al., 2011). Além disso, o aumento do conteúdo de DNA afeta não só o genoma, mas também o fenótipo, fisiologia e metaboloma das plantas (SHMEIT et al., 2020). Os poliploides apresentam, muitas vezes, maior vantagem adaptativa, maior produção e diversidade de enzimas e metabólitos secundários, além de maior tolerância a estresses abióticos e resistência à patógenos (SOLTIS, VISGER e SOLTIS, 2014; IANNICELLI et al., 2016; SHMEIT et al., 2020).

Existem mecanismos capazes de promover a variação dos metabólitos secundários, dentre eles, o acúmulo de mutações pontuais, poliploidização natural ou induzida e fatores ambientais (CAMPOS et al., 2011; KROYMANN, 2011; WENG, PHILIPPE, NOEL, 2012; MOORE et al., 2014; VICCINI et al., 2014). Estudos sobre os perfis metabólicos em plantas poliploides, têm mostrado influência do aumento do genoma no metabolismo das mesmas, tanto em nível qualitativo como quantitativo. Sendo resultado de alterações nos mecanismos que regulam a biossíntese dos compostos voláteis, aumentando a atividade bioquímica e expressão variada dos genes (FASANO et al., 2016).

Em estruturas como tricomas, responsáveis pelo armazenamento dos óleos essenciais, também foi relatado aumento de tamanho (LAVANIA et al., 2012). O aumento de biomassa em poliploides pode estar associado ao aumento do metabolismo secundário. Entretanto, essa relação nem sempre é possível, pois a poliploidia aumenta o tamanho das células, mas pode influenciar diferencialmente o crescimento e biomassa, uma vez que pode haver redução no número de células (LAVANIA, 2013). Tetraploides de tomilho (SHMEIT et al., 2020), alho (YOUSEF e ELSADEK, 2019), psyllium (SABZEHZARI et al., 2020) e *Lippia integrifolia* (IANNICELLI et al., 2016) mostraram aumento de biomassa e também da biossíntese de óleos essenciais, comparados aos progenitores diploides.

Plantas sob estresse biótico e/ou abiótico podem apresentar diferenças no comportamento metabólico dependendo do nível de ploidia (IANNICELLI et al., 2020).

Poliploides sob estresse salino (KHALID et al., 2020), baixas temperaturas (LI e VAN DE PEER, 2020; JIANG et al., 2020) e estresse hídrico (OLIVEIRA et al., 2017) apresentaram maior tolerância que as diploides. Assim, em geral, plantas poliploides são consideradas promissoras por apresentarem maiores vantagens farmacológicas e agrônômicas (SABZEHZARI et al., 2020).

1.4 EFEITOS DE ESTRESSES ABIÓTICOS

O estresse ambiental está se tornando mais frequente, principalmente devido à condição sésil das plantas e das mudanças climáticas globais, provocando efeitos diversos no crescimento, desenvolvimento e rendimento das plantas (GONG et al., 2020). A qualidade das plantas medicinais e aromáticas, depende da composição e concentração dos seus metabólitos secundários (CASER et al., 2019). A regulação da biossíntese de terpenos, por exemplo, é controlada por fatores genéticos e por condições ambientais (BROECK et al., 2017; MENG et al., 2018; VALIFARD et al., 2018). Assim, os estímulos do ambiente levam a alterações significativas na rota metabólica para a modulação da biossíntese de diferentes compostos (MORAIS, 2009; VERMA e SHUKLA, 2015; RUAN et al., 2017).

Embora muitos estudos mostrem mudanças nas emissões de compostos voláteis das plantas sob estresses bióticos, os mecanismos envolvidos nas respostas de defesa das plantas diante dos estresses abióticos são pouco estudados (CAPARROTTA et al., 2018; ASHRAF et al., 2019). As plantas, de maneira geral, sob condições de estresse têm uma resposta que afeta o crescimento, morfologia, desenvolvimento, fotossíntese, produção de hormônios, metabólitos primários e secundários, expressão gênica, entre outros (LIU et al., 2016; ARBONA et al., 2017; GHASSEMI-GOLEZANI, GHASSEMI, SALMASI, 2018a; SENJI e MANDOULAKANI, 2018; ARIF, ISLAM, ROBIN, 2019; SHAKYA et al., 2019).

A salinização do solo é atualmente uma das causas principais da redução de produtividade em plantas, podendo ser causada por irrigação com água de má qualidade, chuvas, erosão, desmatamento, intemperismo rochoso e sal proveniente do mar, desencadeando uma ampla gama de perturbações osmóticas, causadas principalmente por limitação hídrica, diminuindo a absorção de água e nutrientes,

provocando desequilíbrio iônico e toxicidade, podendo levar à alterações morfológicas e de desenvolvimento (PITMAN, LÄUCHLI, 2002; MUNNS, TESTER, 2008; NEGRÃO, SCHMÖCKEL, TESTER, 2017; CHAPAGAIN et al., 2018; FORMENTIN et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019).

A resposta à salinidade, normalmente se desenvolve por um período de tempo maior (dias a semanas) e envolve o acúmulo de íons em concentrações tóxicas, causando, por fim, a morte das plantas (NEGRÃO, SCHMÖCKEL, TESTER, 2017). Porém, ainda são escassos os estudos sobre os efeitos da salinidade em plantas medicinais (LUCHO et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019).

O cloreto de sódio é considerado o sal mais tóxico, compreende íons sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-), compondo mais de 50% do total de sais solúveis no solo salino, tornando-o mais difundido. Sua acumulação, leva a uma diminuição da atividade dos estômatos e da cadeia de transporte de elétrons, causando excesso de espécies reativas de oxigênio (SHELKE et al., 2019).

Estudos apontam que além de afetar o crescimento e desenvolvimento das plantas, a exposição ao sal leva a uma variação na produção das vias biossintéticas de metabólitos secundários, qualitativa e quantitativamente (ABDALLAH et al., 2016; ABIDIN et al., 2016; NEGRÃO, SCHMÖCKEL, TESTER, 2017; VALIFARD et al., 2018; CARDOSO et al., 2019; LUCHO et al., 2019; SHELKE et al., 2019).

O estresse hídrico é também um dos fatores mais importantes que limitam a produtividade das culturas, que acabou por se agravar nos últimos anos diante das rápidas mudanças no clima global (GAYEN et al., 2019) e causam aumento na produção de reativos de oxigênio, podendo levar à morte celular (BÚFALO et al., 2016; CHAPAGAIN et al., 2018). Além disso, a menor absorção de água causa perda de turgor celular (desidratação tecidual/seca) e variação de metabólitos secundários (RAZAVIZADEH et al., 2019), além de provocar alterações na expressão gênica (YANG, SHENG, DUAN, 2012; ABIDIN et al., 2016; CHAPAGAIN et al., 2018), bem como mecanismos de defesa como acumulação de enzimas antioxidantes, açúcares solúveis, prolina, entre outros (RAZAVIZADEH et al., 2019).

Com relação aos hormônios e seus efeitos, é importante entender como os metabólitos secundários interagem com reguladores de crescimento (MANSOURI e ASRAR, 2009). O ácido abscísico (ABA) é um hormônio primordial para o desenvolvimento das plantas, afetando a germinação de sementes, crescimento,

senescência e respostas ao estresse, principalmente osmótico, salino, baixas temperaturas e estresse hídrico. É também importante como molécula sinal para regular a expressão dos genes de defesa da planta e pode ocasionar o acúmulo de metabólitos secundários (ZHAO, DAVIS, VERPOORTE, 2005b; LI et al., 2010; SAH, REDDY, LI, 2016). Quando exógeno, pode provocar alterações no metabolismo primário e secundário (ALONSO, BERLI, RUBE, 2016; WANG et al., 2017).

O ácido salicílico (AS) é uma molécula sinal conhecida por seu efeito na defesa contra predadores ou infecções, envolvida assim na resposta a estresses ambientais; influencia também o crescimento e o desenvolvimento das plantas (DONG, WAN, LIANG, 2010; GAO et al., 2012). Quando exógeno, promove modulação no metabolismo primário e secundário (DONG, WAN, LIANG, 2010; WANG et al., 2017). Além disso, ambos (ABA e AS) estão relacionados às mudanças na expressão gênica da via de produção de metabólitos secundários (DONG, WAN, LIANG, 2010; ALONSO, BERLI, 2015; MENG et al., 2018).

As plantas também podem sofrer estresse após ferimentos por meio da herbivoria e mecanicamente, devido ao vento, granizo, areia e chuva, danificando a parte aérea (CHASSOT et al., 2008; BALUSAMY et al., 2015; KANAGENDRAN, PAZOUKI, NIINEMETS, 2018). Essas respostas surgem inclusive em suas partes lesionadas, que podem apresentar regeneração e até formação de novos ramos em regiões distantes da lesão, levando a alterações no transcriptoma (IKEUCHI et al., 2017). Assim, as respostas induzidas pelo ferimento são um mecanismo de defesa complexo que envolve a variação do óleo essencial (BALUSAMY et al., 2015; LI et al., 2018).

O ferimento pode levar ao acúmulo de terpenos (BALUSAMY et al., 2015). Os sinais locais são traduzidos em sinais elétricos e químicos que são transmitidos para todas as partes da planta, fazendo com que metabólitos secundários sejam produzidos nas células vegetais paralelamente após serem submetidos ao estresse (CHASSOT et al., 2008; IKEUCHI et al., 2017; LI et al., 2018). A produção de terpenos também pode ser modulada no período de recuperação da planta, cerca de horas ou dias após ter ocorrido a injúria (KANAGENDRAN, PAZOUKI, NIINEMETS, 2018), por meio de subsequentes processos oxidativos, aumento de etileno, perda de textura, perda de massa e desidratação, diminuição na quantidade de nutrientes, quebra de membrana e enfraquecimento dos tecidos (MADANI, MIRSHAKARI, IMAHORI, 2019).

O estresse pelo frio afeta todo o metabolismo da planta. O efeito surge tanto da inibição direta das enzimas metabólicas, quanto da variação da expressão gênica e remodelação de estruturas celulares (LIU et al., 2016; ZHANG et al., 2017) incluindo aumento do nível de solutos intracelulares, acúmulo de antioxidantes e espécies reativas de oxigênio (ZHANG et al., 2017). O efeito do estresse pelo frio sobre a produção de terpenos e a expressão dos genes envolvidos na via biossintética das plantas medicinais permanecem pouco estudados (SENJI e MANDOULAKANI, 2018).

Os diversos estresses desencadeiam uma resposta chamada de estresse oxidativo, induzido pela alta produção e acúmulo de moléculas contendo oxigênio ativado e chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROs) danificando as células e provocando sinalização e reações de defesa nas plantas. Sob condições normais, a produção das EROs se dá nos cloroplastos, nas mitocôndrias, nos peroxissomos e no apoplasto, sendo controlada por componentes de defesa antioxidante, como a catalase, a peroxidase, entre outros (KAUR e ASTHIR, 2015; CHOUDHURY et al., 2017). Os antioxidantes não enzimáticos são principalmente solutos orgânicos, como o aminoácido prolina, com alto poder redutor. Pode ser acumulado pelas plantas para manter a homeostase celular da água (osmoprotetor) e para evitar danos causados pela interação de EROs com o DNA, proteínas e lipídios (MORENO-GALVÁN et al., 2020).

Assim, o acúmulo de EROs afeta todo o metabolismo e desenvolvimento, podendo ocorrer a oxidação dos ácidos nucleicos, membranas celulares (peroxidação lipídica), proteínas, e também inibir a fotossíntese e a respiração (KAUR e ASTHIR, 2015). Alguns estresses, por exemplo, estresse hídrico (DUDZIAK et al., 2019), salino (KIM et al., 2005), ferimento (SUZUKI e MITTLER, 2012), por ABA e AS exógenos (AGARWAL et al., 2005) e por frio (JAN et al., 2018), induziram estresse oxidativo, com variação na produção de enzimas antioxidantes (JAN et al., 2018; DUDZIAK et al., 2019) em plantas. O óleo essencial de *L. alba* apresenta alta atividade redutora, sugerindo uma fonte natural de substâncias antioxidantes, capazes de doar átomos de hidrogênio ou de elétrons, transformando radicais livres em substâncias estáveis (PANDELÓ et al., 2012).

Estudos em alcaçuz (SHIRAZI et al., 2019) sob estresse salino, funcho (HASHMI et al., 2012) sob estresse por ácido salicílico exógeno, *Artemisia annua* (YADAV et al., 2014) sob estresse por estresse hídrico, *Arabidopsis* (BALUSAMY et

al., 2017) sob estresse por ferimento, videira (ALONSO e BERLI, 2015) sob estresse por ácido abscísico e *Malus hupehensis* (WANG et al., 2017) sob estresse por baixas temperaturas, corroboram a ideia de que estresses abióticos provocam alterações no metabolismo primário e secundário.

Em *L. alba*, objeto deste trabalho, o cultivo *in vitro* de três quimiotipos, carvona, linalol e citral, sob várias fontes de luz e concentrações de CO₂, resultou em variações no crescimento, diferenças qualitativas nos óleos essenciais e alteração da expressão dos genes que estão relacionados às rotas biossintéticas de mono e sesquiterpenos (BATISTA et al., 2016a, 2016b). Estudos recentes em um acesso triploide de *L. alba* avaliaram efeitos do estresse hídrico, salinidade e fotoperíodo. De modo geral, foram observadas alterações no metabolismo primário (crescimento, anatomia, açúcares, entre outros) e secundário, com aumento no teor de linalol, para os três estresses (CASTRO et al., 2019, 2020a, 2020b).

1.5 FERRAMENTAS PARA AVALIAÇÃO DE ESTRESSES EM PLANTAS

A cultura *in vitro* de plantas é um dos métodos eficientes para se estudar os efeitos do estresse e suas respostas, uma vez que é considerada uma alternativa para representar o ambiente externo com suas condições diversas (GAO et al., 2018; REZENDE et al., 2018; SHELKE et al., 2019). Essa ferramenta permite estudos do metabolismo primário, secundário e de tolerância ao estresse, devido à condição *in vitro* ser mais uniforme e asséptica quando comparada ao cultivo em campo (LUCHO et al., 2019).

O cultivo *in vitro* de clones em grande número e sob condições controladas do ambiente, nutrientes e assepsia, é uma eficaz ferramenta para reproduzir com tempo, custo e espaço reduzidos, exemplares que apresentam propriedades importantes para a indústria e medicina (TAVARES et al., 2005; ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005a; FUMAGALI et al., 2008; SHAKYA et al., 2019; SHELKE et al., 2019).

Nos sistemas convencionais de propagação *in vitro*, as tampas atuam como barreiras. Desta forma, ocorrem baixas taxas de transpiração e fotossíntese, o que

pode influenciar na absorção de água e nutrientes, reduzindo a taxa de crescimento do explante. Assim, o uso de membranas ou selos permitem uma maior troca gasosa, aumentando o crescimento (SALDANHA et al., 2012).

As consequências dos estresse abióticos em plantas mantidas em cultura de tecidos podem ser avaliadas de diferentes maneiras. Análises de crescimento são realizadas através de medidas de comprimento da parte aérea, comprimento de raízes, pesos da parte aérea e das raízes, área foliar, entre outros, sendo essenciais para medir respostas de desenvolvimento à estresses (SCHNEIDER et al., 2012; CHAVOUSHI et al., 2020; ORREGO et al., 2020).

Análises bioquímicas das plantas sob estresse realizadas em microplacas de ELISA (ensaio imunoabsorvente ligado a enzimas) e analisadas através de leituras de absorbância em espectrofotômetro, são necessárias para verificar os níveis de produção de enzimas (catalase, peroxidase, ascorbato peroxidase, etc.) e solutos orgânicos (prolina, etc.), que são consideradas marcadores bioquímicos da atividade antioxidante (SADAK et al., 2019). Análises fisiológicas que verificam a atividade fotossintética como a razão F_v/F_m ou máximo rendimento quântico fotoquímico do FSII (F_v/F_m), onde folhas saudáveis apresentam valores entre 0,8 a 0,75 (abaixo do intervalo indica-se que os centros de reação do FSII foram danificados), podendo ser medida por equipamentos como Handy-PEA ou MINI-PAM, também são importantes para analisar as respostas das plantas sob estresse (KALAJI et al., 2016; MILLER, COETZEE, HILL, 2019).

Para se analisar os compostos voláteis utiliza-se a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM), solvente como o n-hexano, eficaz para a extração de óleo devido à sua natureza apolar (SILVA et al., 2010; RAHIMI, TALEEI, RANJBAR, 2017). Segundo Jannuzzi et al., (2010) essa é uma técnica muito utilizada na identificação de todos os constituintes químicos, qualitativa e quantitativamente, presentes nos óleos essenciais.

A identificação é baseada no tempo de retenção e área dos picos, conforme obtidos pelos cromatogramas (DAVIS et al., 2005; GRAUSGRUBER-GRÖGER et al., 2012; PAZOUKI et al., 2016; MOHAMMADI et al., 2019). A quantificação dos constituintes do óleo essencial pode ser feita pelo método do padrão interno, que é o uso de substância conhecida (padrão conhecido de quantidade) e diferente do

composto que se quer analisar, no solvente de extração, usada para normalizar a área do pico do composto desconhecido (FORTINI et al., 2017; LEGGIO et al., 2017).

Embora novas técnicas como o sequenciamento de RNA permitam uma análise de vários genes ao mesmo tempo, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR ou RT-RT-qPCR) é frequentemente utilizada para análises quantitativas, devido à sua sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, além de ser adequada para estudos de um pequeno número de genes envolvendo múltiplas amostras (LIU et al., 2016; NARANCIO et al., 2018).

A RT-qPCR usa *taq*-polimerase, tampão, dNTPs e *primers* para a amplificação de fragmentos pequenos (80-150 pb) de cDNA (DNA complementar) (NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006). A diferença em relação ao método convencional é que para cada ciclo de amplificação, um sinal fluorescente é emitido e monitorado por um termociclador computadorizado, permitindo a análise em tempo real do produto amplificado (THORNTON e BASU, 2011).

Um dos principais corantes intercalantes para detecção do fragmento amplificado é o *SybrGreen*, que se liga de forma inespecífica à fita dupla de DNA durante a amplificação, gerando fluorescência, e pode ser usado com qualquer par de *primer* para qualquer gene alvo, (BUH GAŠPARIČ et al., 2010; THORNTON; BASU, 2011). O sinal de fluorescência exibido durante os ciclos da reação (CT ou *threshold cycle*) é uma quantidade detectável de produto amplificado que foi gerada durante a fase exponencial da reação (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; BUH GAŠPARIČ et al., 2010).

1.6 ANÁLISE DE GENES DE REFERÊNCIA

Nosso grupo de pesquisa realizou a análise de transcriptoma (sequenciamento de RNA) de um acesso triploide (BGEN04) e sua análise permitiu encontrar genes endógenos para *L. alba*, bem como genes da via biossintética de monoterpenos (BATISTA, 2016; SOUZA, 2016; LOPES, 2019). Os perfis de cada gene de referência foram recentemente analisados em três níveis de ploidia diferentes (diploide, triploide e tetraploide) e demonstraram que o gene de referência *CIT* (citocromo b) mostrou-se mais estável para as diferentes ploidias (LOPES, 2019). Até

a presente data, poucos estudos sobre validação de endógenos e análise da expressão gênica em relação a poliploides foram realizados (LI et al., 2016; ZORRILLA-FONTANESI et al., 2016; LOPES, 2019; XIONG et al., 2019). Genes de referência endógenos são aqueles normalmente necessários para manter a função celular básica, permanecendo estáveis. São usados para normalizar os dados da expressão gênica (HONG et al., 2008), já que a quantidade de gene-alvo expressa pode variar (BUH GAŠPARIČ et al., 2010).

Plantas submetidas a estresses bióticos e/ou abióticos, ativam rotas complexas de resposta e regulação que envolvem direta ou indiretamente vias bioquímicas, que podem alterar a expressão dos genes de referência (WANG et al., 2018a; BATISTA et al., 2019).

O cultivo *in vitro* permite estudar os efeitos do estresse e suas respostas, uma vez que é considerada uma alternativa para representar o ambiente externo com suas condições diversas (GAO et al., 2018; REZENDE et al., 2018; SHELKE et al., 2019). Dessa forma, é importante avaliar genes que sejam estáveis em diferentes condições experimentais específicas (WANG et al., 2018a) sendo crucial para uma quantificação confiável na técnica de RT-qPCR (HONG et al., 2008; NARANCIO et al., 2018).

Para avaliar os genes de referência, ferramentas como BestKeeper, analisa a estabilidade de expressão por meio da correlação dos padrões dos genes candidatos, com um índice que compara genes-alvo, para verificar se serão expressos diferencialmente sob um tratamento. A análise é realizada calculando-se a variação baseada na média geométrica do valor de CT, com desvio padrão menor ou igual a um (≤ 1) (PFAFFL et al., 2004). A ferramenta GeNORM, por sua vez, classifica os genes a partir da estabilidade de expressão média (M), média da variação por pares, obtendo-se um desvio padrão para as combinações. O gene mais estável e a melhor combinação de genes, deverá apresentar menor média do valor M que deve ser inferior a 1,5 (VANDESOMPELE et al., 2002). Outra alternativa é a utilização do NormFinder, que propõe avaliar a estabilidade inter e intra grupos, sendo o menor desvio padrão, indicativo da estabilidade combinada (ANDERSEN; JENSEN, ORNTOFT, 2004).

A ferramenta *online* RefFinder, integra quatro algoritmos (BestKeeper, GeNorm, Δ CT, NormFinder) que compara separadamente e depois combina os resultados, classificando os genes de referência candidatos (XIE et al., 2012). Ambas

as quatro ferramentas, são muito utilizadas e possuem algoritmos desenvolvidos para analisar quais são os genes de referência apropriados para normalizar os dados de PCR em tempo real (GOIDIN et al., 2001; VANDESOMPELE et al., 2002; ANDERSEN; JENSEN, ORNTOFT, 2004; BRUNNER, YAKOVLEV, STRAUSS, 2004; DHEDA et al., 2004; RADONIĆ et al., 2004; DAI et al., 2018; WANG et al., 2018a).

Até o momento, não existem estudos que avaliam genes de referência em *L. alba* sob diferentes condições de estresses abióticos. Assim, o conhecimento gerado neste trabalho será fundamental para posteriores estudos de expressão gênica por RT-qPCR para a espécie, principalmente para definir os genes normalizadores mais adequados para cada condição, dada a plasticidade de resposta à fatores ambientais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Três acessos de *L. alba*, depositados no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ) sob o número 48383 (BGEN-39, diploide), 48372 (BGEN- 04, triploide) e 48370 (BGEN-06, tetraploide), mantidos sob cultivo *in vitro* no Laboratório de Genética e Biotecnologia, no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF, MG, Brasil) foram utilizados como material de estudo. Para avaliar genes de referência sob estresse, o acesso diploide de *L. alba* (BGEN-39), foi utilizado como material de estudo.

Os acessos foram micropropagados *in vitro* em meio de cultura MS, na ausência de reguladores de crescimento, em frasco de vidro contendo 60mL de solução com 1,2 g L⁻¹ de sacarose, 0,18 g L⁻¹ de meio MS e 0,28 g L⁻¹ de ágar (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), utilizado como tratamento controle. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,01 e o meio foi autoclavado a 121°C e 108 kPa durante 20 min (MURASHIGE e SKOOG, 1962; JULIÃO et al., 2020). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética e Biotecnologia, no ICB (Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil).

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A unidade experimental foi composta por um frasco de cultivo (600 mL de capacidade), vedados com tampas de polipropileno com dois orifícios (10 mm) cobertos com membranas para permitir a troca gasosa. As membranas foram confeccionadas de acordo com Saldanha et al., (2012). Cada frasco continha oito segmentos nodais micropropagados. Três repetições biológicas foram consideradas em todos os experimentos. Após 40 dias, foram realizadas análises de crescimento, folhas foram coletadas e armazenadas a -20°C para análises dos metabólitos primários e secundários. Folhas do segundo nó foram armazenadas em -80°C para extração de RNA.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com análise dos dados em esquema fatorial, realizados no ferramenta *GraphPad Software* (La Jolla, USA). Adotou-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk seguidos de análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey.

Para a análise de expressão gênica (duas repetições técnicas) e análise de óleo essencial, utilizou-se teste *t* de Student. Ambos os testes foram realizados à 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

2.3 ESTRESSES ABIÓTICOS

Ao meio de cultivo MS, previamente descrito, foi adicionado cloreto de sódio (NaCl) na concentração de 60 mM, para indução de estresse salino (CASTRO et al., 2020b); para estresse hídrico, foi adicionado polietilenoglicol (PEG-4000) 1% (m/v) (CASTRO et al., 2020a); aplicação aos meios MS de ácido abscísico (10 μ M) e ácido salicílico (10 μ M), para estresses por hormônios (VIVES-PERIS et al., 2018 adaptado). As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16h/8h (luz/escuro) e intensidade luminosa de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (JULIÃO et al., 2020) por 40 dias. Para indução de estresse por ferimento, durante a manutenção em sala de crescimento, folhas foram feridas três vezes com agulha (0.8 x 25mm) estéril (BD Vacutainer PrecisionGlide, Swindon, UK) dentro da câmara

de fluxo, sendo mantidas na sala de cultivo por 36 h, completando 40 dias de cultivo *in vitro* (KANAGENDRAN, PAZOUKI, NIINEMETS, 2018, adaptado) e, para estresse térmico, frascos foram mantidos à 4°C por 36 h dentro da câmara fria com fotoperíodo de 16h/8h (luz/escuro), completando 40 dias de cultivo *in vitro* (CHENG et al., 2019, adaptado; JULIÃO et al., 2020).

2.4 ANÁLISES DE CRESCIMENTO

Foram analisadas características de crescimento como: massa fresca (g) total (parte aérea), folhas e raízes, comprimento total da parte aérea (cm), comprimento total da maior raiz (cm) e área foliar (cm²) (SALDANHA et al., 2012). A determinação da área foliar foi realizada com o ferramenta ImageJ (HOLGUÍN et al., 2019).

2.5 QUANTIFICAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Aproximadamente 50 mg de folhas foram coletadas, posteriormente congeladas e conservadas em ultra freezer -80 °C. As amostras foram maceradas no equipamento TissueLyser Adapter Sets (QIAGEN, Hilden, DE), e 500 mL de ácido tricloroacético (TCA) (0,1 %; m/v) foi adicionado. Após homogeneizadas em vórtex, as amostras foram centrifugadas a 14.000 g por 15 min, a 4°C. Foram adicionados 20 mL do sobrenadante, 80 mL de tampão fosfato de potássio (10 mM e pH 7,0) e 100 mL de iodeto de potássio (1 M), em microplaca de ELISA. Para a reação, foram incubadas no escuro por 45 min em temperatura ambiente. Leituras a 390 nm foram realizadas e conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi calculado com base em curva padrão, sendo os valores expressos em mmol g⁻¹ de matéria fresca (VELIKOVA, YORDANOV, EDREVA, 2000).

2.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Foram quantificadas as enzimas Catalase (CAT, EC1.11.1.6), Ascorbato peroxidase (APX, EC1.11.1.11), e Peroxidase oxidoreductase (POD, EC1.11.1.7). Para tanto, foram coletados 50 mg de folhas, posteriormente congeladas e conservadas em ultra freezer -80 °C. Para a obtenção do extrato bruto, o material foi macerado no equipamento TissueLyser Adapter Sets (QIAGEN, Hilden, DE) e 2 mL do meio de extração (Tampão fosfato de potássio a 0,1 M, pH 6.8; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0.1 mM; fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) foi adicionado. O material foi então centrifugado a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo de 2 mL e reservado em gelo.

Para a determinação da atividade da CAT foram adicionados 2,9 mL de meio de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM) e 10 µL do extrato em microplaca de ELISA. Após homogeneização, a leitura foi realizada em comprimento de onda de 240 nm por 1 minuto (a cada 10 segundos), e o cálculo da atividade enzimática foi expresso pelo decréscimo da absorbância (HAVIR e MCHALE, 1987).

A determinação da atividade da APX foi realizada através do acréscimo do meio de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, ácido ascórbico 0,25 mM, EDTA 0,1 mM e H₂O₂ 0,3 mM) com 10 µL do extrato em microplaca de ELISA. Após homogeneização, foi realizada a leitura em comprimento de onda de 290 nm durante um minuto, com absorbância decrescente (NAKANO e ASADA, 1981).

A atividade da POD foi determinada de acordo com Chance e Maelhy, (1955). Foi adicionado o meio de reação (13 mM guaiacol, 5 mM H₂O₂ e 50 mM de fosfato de sódio, pH 6,5) com 10 µL extrato em microplaca de ELISA. Após homogeneização, foi realizada a leitura à 470 nm por 1 minuto.

2.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica foi determinada a partir da quantificação dos teores de malodialdeído (MDA), através da metodologia proposta por Heath e Packer, (1968) com algumas modificações. Foi acrescentado 1 mL de ácido tricloroacético 1% (TCA) em 100 mg de material vegetal fresco e macerado. Em seguida, a solução foi vortexada e centrifugada a 12.000 g por 15 minutos à 4 °C. Foram transferidos 250 mL do sobrenadante para novos tubos, juntamente com 750 mL de ácido 2-tiobarbitúrico 0,5 % (TBA; p/v) em TCA 20% (p/v). A reação ocorreu por incubação em agitação à 95 °C, e paralisada em banho de gelo após 30 min. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, centrifugados (10.000 g, 10 min, 4 °C) e a leitura realizada em espectrofotômetro a 532 e 600 nm. A concentração de MDA foi expressa pela subtração da leitura de absorbância na faixa de 600 nm pela leitura de absorbância na faixa de 532 nm, e calculada de acordo com o coeficiente de extinção de 155 mM cm⁻¹.

2.8 MÁXIMO RENDIMENTO QUÂNTICO FOTOQUÍMICO (Fv/Fm)

Para verificar o máximo rendimento quântico fotoquímico ou razão Fv/Fm, folhas intactas, foram mantidas previamente ao abrigo da luz, por 30 minutos. A razão Fv/Fm foi medida por fluorômetro portátil (Handy-PEA, Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn Norfolk, UK), induzida pela luz vermelha com pico de 650 nm, de aproximadamente 3.000 µmol m⁻² s⁻¹ (MARTINAZZO et al., 2012).

2.9 PROLINA

Foram coletados aproximadamente 50 mg de folhas, que foram congeladas e conservadas em ultra freezer -80 °C. O material ainda congelado, foi macerado no equipamento TissueLyser Adapter Sets (QIAGEN, Hilden, DE) e liofilizado no

equipamento Terroni LS3000 (TERRONI Equipamentos Científicos Ltda., São Paulo, BR). Para a obtenção do extrato bruto, foi adicionado 1 mL de ácido sulfosalicílico 3% (p/v), o extrato foi homogeneizado por 3 s de vortexação, centrifugado a 7.500 rpm por 10 min e 200 µL do sobrenadante foi coletado. Adicionou-se 400 µL de solução ácida de niidrina e a solução foi incubada por 1 h a 100 °C, em banho maria, seguido de banho de gelo, sendo transferida para microplaca de ELISA. A concentração de prolina foi obtida através da leitura de absorbância na faixa de 520 nm e curva padrão (BATES et al., 1973, adaptado).

3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Folhas de *L. alba* do segundo nó foram coletadas, no mesmo estágio de desenvolvimento, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C, até o início do processo de extração de RNA.

Para extração de RNA, 30 mg de folhas foram trituradas em nitrogênio líquido utilizando-se cadinho e pistilo, previamente autoclavados a 121°C e 108 kPa durante 20 min. O RNA total foi extraído utilizando o kit *illustra RNAspin Mini* (GE Healthcare Life Sciences, SP, BR), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade e a quantidade de cada amostra de RNA foram determinadas usando o espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific, EUA), razão 260/280 de 1,9 a 2,1 e razão 260/230 de 1,8 a 2,2.

3.2 SÍNTESE DE cDNA

A síntese de cDNA foi realizada usando 5 µL de RNA total, 1 µL dNTPs, 1 µL oligo dT, 9 µL de água, 1 µL Transcriptase Reversa e 1 µL tampão (Ludwig Biotechnology, Alvorada, BR) em um volume final de 18 µL para cada amostra, de acordo com o protocolo do fabricante. A reação foi incubada a 5 minutos a 70°C, após este tempo foi adicionado a enzima e incubado à 42°C por 1 hora. O cDNA foi

armazenado a -20°C. Os produtos de cDNA foram diluídos para a concentração de 100 ng/μL com água livre de nucleasse, antes de serem usados nos ensaios de PCR quantitativo em tempo real. A qualidade e a quantidade de cada amostra de cDNA foram determinadas usando o espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), razão 260/280 de 1,8 a 2,1 e razão 260/230 de 1,8 a 2,2.

3.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL

A escolha dos genes-alvo de monoterpenos se deu a partir dos compostos majoritários em *Lippia alba*, referentes às enzimas S-linalol sintase (*LIS1*), envolvida na produção de linalol, e a geraniol desidrogenase (*GDS*), que transforma o geraniol em geranial. Os perfis de expressão gênica foram normalizados usando o gene de referência mais recomendado para normalização e comparação entre três níveis de ploidia (diploide, triploide e tetraploide) em *L. alba*, o citocromo b (*CIT*), proteína que atua na cadeia transportadora de elétrons (LOPES, 2019). Os *primers* (Tabela 1) foram obtidos a partir de um transcriptoma foliar previamente analisado de *L. alba* (SOUZA, 2016; LOPES, 2019).

As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A detecção dos produtos de PCR foi realizada com *SYBR Green PCR Master Mix* (Bio-Rad, Hercules, USA), 1mM de cada *primer* e 50ng de cDNA total foram utilizados. As condições de amplificação foram realizadas da seguinte forma: 95°C por 10 min × 1 ciclo (ativar a polimerase), e 95°C por 15s a 66°C por 30s e 60°C por 30s × 40 ciclos (desnaturação/ligação/extensão), seguido pela curva de *melting* 95°C durante 15s, 60°C durante 1 min e 95°C durante 15s.

Os dados de fluorescência foram analisados pelo *software ABI StepOnePlus* e analisados os valores de CT usando o método $\Delta\Delta Ct$ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) com três repetições biológicas e duas repetições técnicas (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001; VANGUILDER, VRANA, FREEMAN, 2008; BATISTA et al., 2017).

Gene	Sequência 5'-3'	Tm (°C)
Citocromo b (<i>CIT</i>)	F: CTCATATTGTGCCGGAATGGT	60
	R: GGCTACACCTCCCGATTTGTC	60
S-linalol sintase (<i>LIS1</i>)	F: CGCCAAGAAATTCCTCCAAG	62
	R: AATGACCCAACCATGATGAGC	62
Geraniol desidrogenase (<i>GDS</i>)	F: AAAGCTATTGCCCTTCTTGCTG	62
	R: CCCAAGGGAAGTAGATGTACCG	62

Tabela 1- Sequência de *primers* para as reações de RT-qPCR. F: *Forward* (senso); R: *Reverse* (anti-senso).

4 MICROEXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL

Para a microextração de óleo essencial, aproximadamente 100 mg de folhas frescas foram transferidas para tubos de 2 mL, em triplicata. Foi adicionado aproximadamente 1 mL de solução contendo n-hexano com padrão interno (linalol $0,2 \times 10^{-3}$ mg/mL para amostras diploides e tetraploides; citral $0,4 \times 10^{-3}$ mg/mL para triploides). As amostras foram mantidas por 10 min em banho de ultrassom (Thornton-INPEC, Vinhedo, SP, BR) com frequência de 70KHz. Em seguida, 100 mg de sulfato de sódio anidro foi adicionado e o sobrenadante filtrado por uma mecha de algodão estéril para os vials (Shimadzu, Quioto, JA) (SILVA et al., 2010, adaptado).

A análise quantitativa do composto majoritário foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Quioto, JA) e coluna Rtx-5MS (Restek, Bellefonte, PA) de 30m x 0,25mm. 1 μ L da solução límpida obtida contendo os óleos extraídos foi analisada. A análise iniciou-se com a temperatura em 70°C, mantida por 3 minutos, seguida por aumento de 6°C por 1 minuto, até 300°C. O injetor foi operado no modo '*split*' (1:10), à temperatura de 240°C, a interface e o detector de massas à 300°C. Utilizou-se hélio como gás de arraste, com fluxo de $1,53 \text{ mL/min}^{-1}$. A identificação dos constituintes foi realizada de acordo com o método da padronização interna (LEGGIO et al., 2017). A concentração dos componentes majoritários em 100 mg de folhas foi calculada a partir da equação abaixo:

$$Q = \frac{(Aa/A_{pi}) \times C_{pi} \times C_{pm}}{(Ma/Va)} \times 100$$

Onde, Q é a concentração do composto majoritário; Aa é a área do pico correspondente ao composto majoritário; A_{pi} é a área do pico correspondente ao padrão interno; C_{pi} é a concentração, em mg/mL, da solução do padrão interno; C_{pm} é a constante de peso molecular da amostra/padrão interno; Ma é a massa pesada de folhas frescas em mg e Va é o volume de solução adicionado na amostra.

5 AVALIAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA

Foram avaliados genes de referência para o acesso diploide (controle e tratado, em triplicata biológica) sob seis estresses. Os genes de referência candidatos (Tabela 1) foram obtidos a partir de um transcriptoma foliar previamente analisado de *L. alba* (SOUZA, 2016).

Tabela 2- Sequência de *primers* candidatos à genes de referência. F: *Foward* (senso); R: *Reverse* (anti-senso).

Gene	Sequência 5'-3'	T _m (°C)
Citocromo b (<i>CIT</i>)	F: CTCATATTGTGCCGGAATGGT	60
	R: GGCTACACCTCCCGATTTGTC	60
Fator de alongação 1-α (<i>ELONG</i>)	F: TTGTCGCCCATTTCTGGATTTG	61
	R: GAGGGTTGGTCCCTTGTACCA	61
Glicose-6-fosfato isomerase (<i>G6i</i>)	F: GGGTGGGTGGCAGAACATC	62
	R: CCCAGCGAGCATTCTTTA	62
NADH desidrogenase (<i>NADH</i>)	F: TTGGTTACCCGAAGCTCATGT	62
	R: AAAAACCCGTAGGTTCCCAATT	62
RNA polimerase (<i>RNApol</i>)	F: AAAAGAGGGTTGACGGTTGGA	62
	R: TAGCTCAGCACCAATCAAGAATG	62
α-tubulina (<i>TUB</i>)	F: AGGTTTGCAAGGGTTCTTGGT	62
	R: ACCGTTCCAAGAGCAACGAA	62

As reações foram realizadas no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A detecção dos produtos de PCR foi realizada com *SYBR Green* PCR Master Mix (Bio-Rad, Hercules, USA), 1 mM de cada *primer* e 50 ng de cDNA total foram utilizados. As condições de amplificação foram realizadas da seguinte forma: 95°C por 10 min \times 1 ciclo (ativar a polimerase), e 95°C por 15 s a

66°C por 30 s e 60°C por 30 s × 40 ciclos (desnaturação/ligação/extensão), seguido pela curva de *melting* 95°C durante 15 s, 60°C durante 1 min e 95°C durante 15 s.

Ferramentas foram utilizadas para avaliar a estabilidade da expressão dos genes de referência: Bestkeeper (PFAFFL et al., 2004); GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002); NormFinder (ANDERSEN et al., 2004) e RefFinder, este último analisa quatro algoritmos para comparar e classificar a estabilidade dos genes: Bestkeeper, geNorm, NormFinder e Δ CT (ZHANG et al., 2019, ZHANG et al., 2020).

Para avaliar a influência dos genes de referência na normalização da expressão gênica de diploide de *L. alba* sob estresse, o gene mais estável e o menos estável foram tomados como normalizadores.

6 RESULTADOS DOS ESTRESSES

Os acessos de *Lippia alba* (diploide, triploide e tetraploide) foram submetidos a condições de estresse *in vitro*, como descritas no material e métodos deste trabalho. Como controle, os acessos foram mantidos *in vitro* na ausência de estresse. Em seguida, utilizaram-se parâmetros morfofisiológicos, quantificação de óleo essencial e expressão de genes relacionados à via de monoterpenos para avaliar o efeito dos estresses.

6.1 ESTRESSE SALINO

Os acessos de *Lippia alba* (diploide, triploide e tetraploide) foram submetidos a NaCl 60mM por 40 dias de cultivo *in vitro*. Como controle, os acessos foram também mantidos sem a adição de NaCl. Em seguida, utilizaram-se parâmetros morfofisiológicos, quantificação de óleo essencial e expressão de genes relacionados à via de monoterpenos para avaliar o efeito do estresse.

6.1.1 ANÁLISE DE CRESCIMENTO

O acesso diploide (Figura 2) não apresentou diferença significativa para o comprimento da maior raiz, área foliar, massa fresca das folhas e raiz (Figura 3 B, F, G e H). Houve diminuição no comprimento da parte aérea, número de nós, número de folhas e massa fresca total (Figura 3 A, C, D e E).

Observou-se diferença significativa quando o acesso diploide foi comparado aos acessos poliploides, houve aumento para o comprimento da maior raiz quando comparado ao acesso triploide na ausência de NaCl (Figura 3 B). Identificou-se diminuição do comprimento da parte aérea e número de folhas quando comparado aos acessos poliploides submetidos a 60 mM de NaCl (Figura 3 A e D); redução da massa fresca das raízes comparado aos poliploides na ausência de NaCl (Figura 3 G) e, da massa fresca das folhas comparado ao tetraploide nas mesmas condições (Figura 3 F). Observou-se ainda a redução do comprimento da maior raiz, número de nós, massa fresca total, massa fresca das folhas e massa fresca das raízes, quando o diploide foi comparado ao tetraploide sob estresse salino (Figura 3 B, C, E, F e G).

O acesso triploide (Figura 2) não apresentou diferenças significativas para as variáveis de crescimento (Figura 3 A, C, D, E, F, G e H) quando submetido a 60 mM de NaCl. Porém, o comprimento da maior raiz aumentou sob estresse salino (Figura 3 B).

O acesso tetraploide (Figura 2) não apresentou diferenças significativas para as variáveis de crescimento analisadas (Figura 3). No entanto, apresentou maior comprimento da maior raiz, massa fresca total, massa fresca das folhas e massa fresca das raízes (Figura 3 B, E, F, e G) quando comparado ao demais níveis de ploidia sob estresse salino.

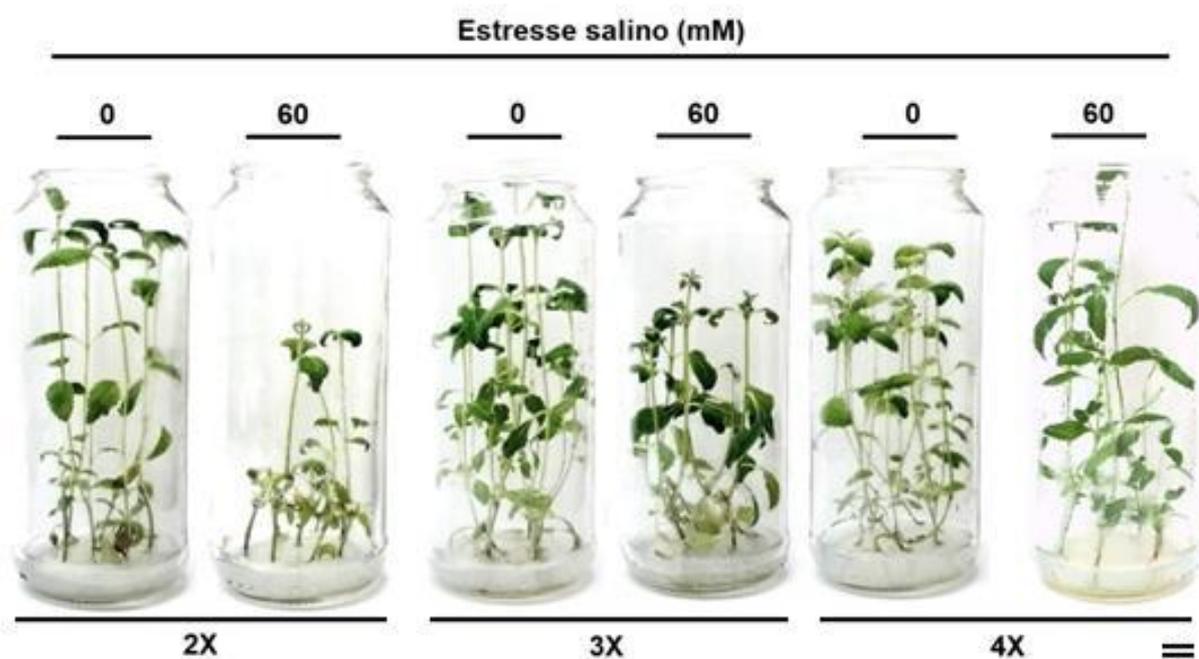


Figura 2- Acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 60 mM de NaCl. Barra = 1cm.

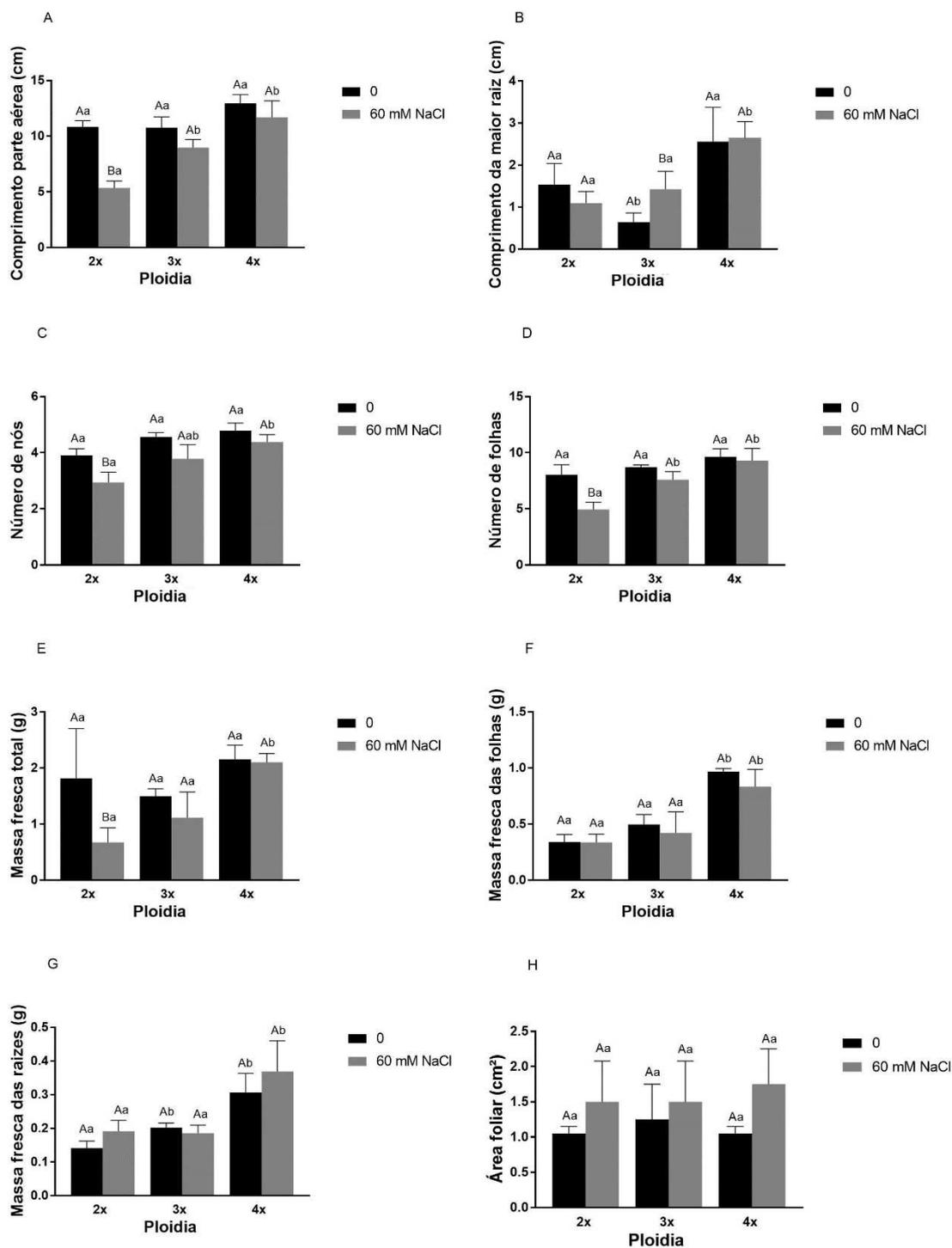


Figura 3- Variáveis de crescimento em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 60 mM de NaCl. A: Comprimento da parte aérea (cm); B: Comprimento da maior raiz (cm); C: Número de nós; D: Número de folhas; E: Massa fresca total (g); F: Massa fresca das folhas (g); G: Massa fresca das raízes (g) e H: Área foliar (cm²). Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 60 mM NaCl; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey ($n=3$).

6.1.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS ESTRESSE SALINO

O acesso diploide apresentou aumento das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase, catalase e peroxidase, assim como aumento de peróxidos de hidrogênio e redução da eficiência fotoquímica do fotossistema II (Figura 4 A, B, C, E e F), sob estresse salino.

Observou-se também diferença significativa, quando o acesso diploide foi comparado ao acesso tetraploide, submetidos a 60 mM de NaCl, para a eficiência fotoquímica do fotossistema II (Figura 4 F), e aumento de ascorbato peroxidase, catalase, peroxidase e peróxidos de hidrogênio, quando comparado aos poliploides, sob as mesmas condições (Figura 4 A, B, C e E).

O triploide apresentou redução significativa da eficiência fotoquímica do fotossistema II (Figura 4 F), quando sob 60 mM de NaCl. No entanto, não houve alteração para os demais parâmetros analisados (Figura 4 A, B, C, D, E e G).

O acesso tetraploide não apresentou alterações significativas para os parâmetros avaliados (Figura 4). Entretanto, apresentou maior eficiência fotoquímica do fotossistema II quando comparado ao demais níveis de ploidia sob estresse salino (Figura 4 F).

Ambos os níveis de ploidia não apresentaram diferenças significativas para a concentração de prolina (Figura 4 G) sob estresse salino. No entanto, os acessos diploide e tetraploide, na ausência do estresse, evidenciaram maior teor de prolina quando comparados ao acesso triploide (Figura 4 G).

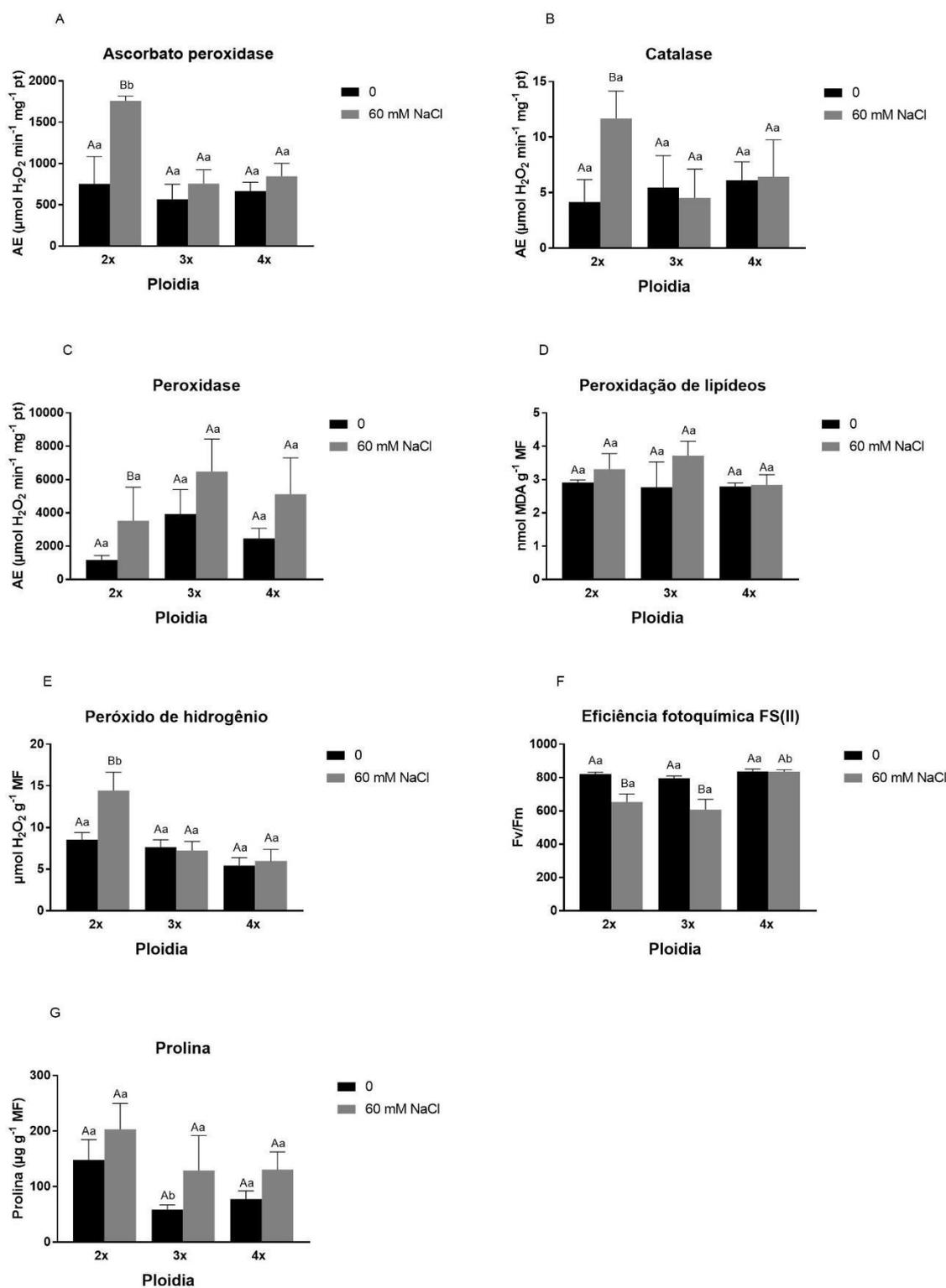


Figura 4- Análises bioquímicas e fisiológicas em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 60 mM de NaCl. A: Ascorbato peroxidase; B: Catalase; C: Peroxidase; D: Peroxidação de lipídeos; E: Peróxido de hidrogênio; F: Eficiência fotoquímica FS(II); G: Prolina. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 60 mM NaCl; minúscula: entre ploídias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey ($n=3$).

6.1.3 EXPRESSÃO GÊNICA ESTRESSE SALINO

O acesso diploide apresentou diferença significativa na expressão relativa dos genes *LIS1* e *GDS* (Figura 5 A e B). Os poliploides não apresentaram diferença significativa para ambos os genes (Figura 5), sob estresse salino.

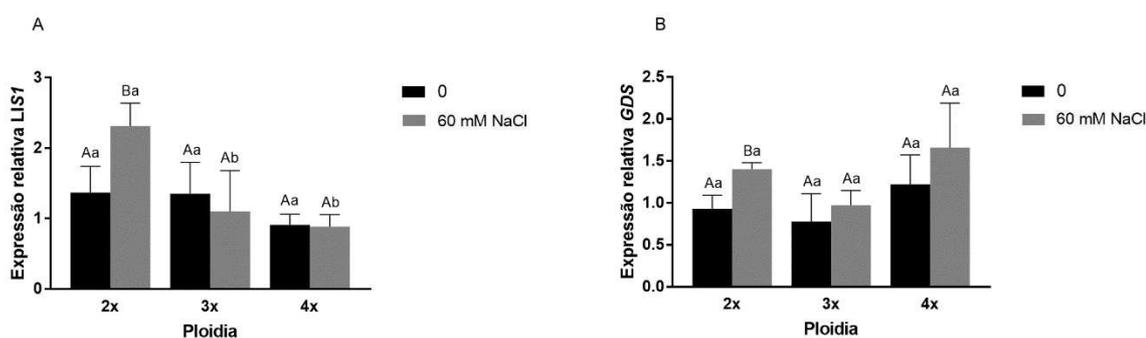


Figura 5- Expressão de genes relacionados à síntese de terpenos em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 60 mM de NaCl. A: *LIS1* (S-linalol sintase) e B: *GDS* (geraniol desidrogenase) O gene *CIT* (citocromo b) foi usado como controle endógeno. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 60 mM NaCl; minúscula: entre ploidias) acima da barra indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).

6.1.4 MICROEXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL ESTRESSE SALINO

O acesso triploide apresentou aumento do teor de linalol, entretanto, para o diploide e tetraploide, não houve diferença nos teores de citral (Figura 6 e 7), sob estresse salino.

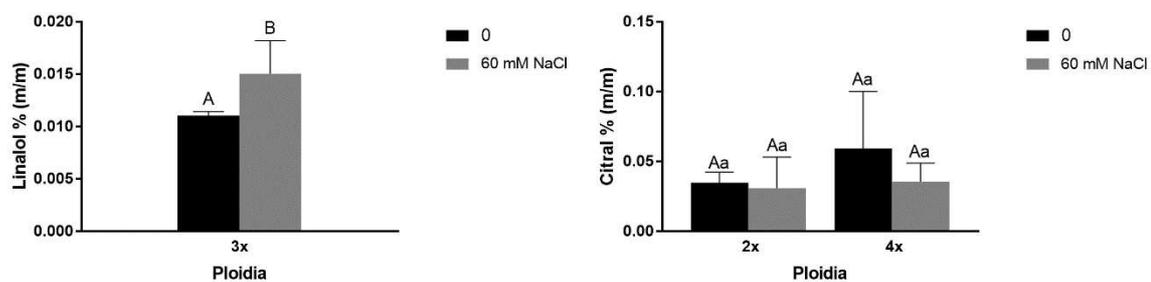


Figura 6- Componente majoritário do óleo essencial (% m/m) em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 60 mM de NaCl. A: Linalol e B: Citral. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 60 mM NaCl; minúscula: entre ploidias) acima da barra indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).

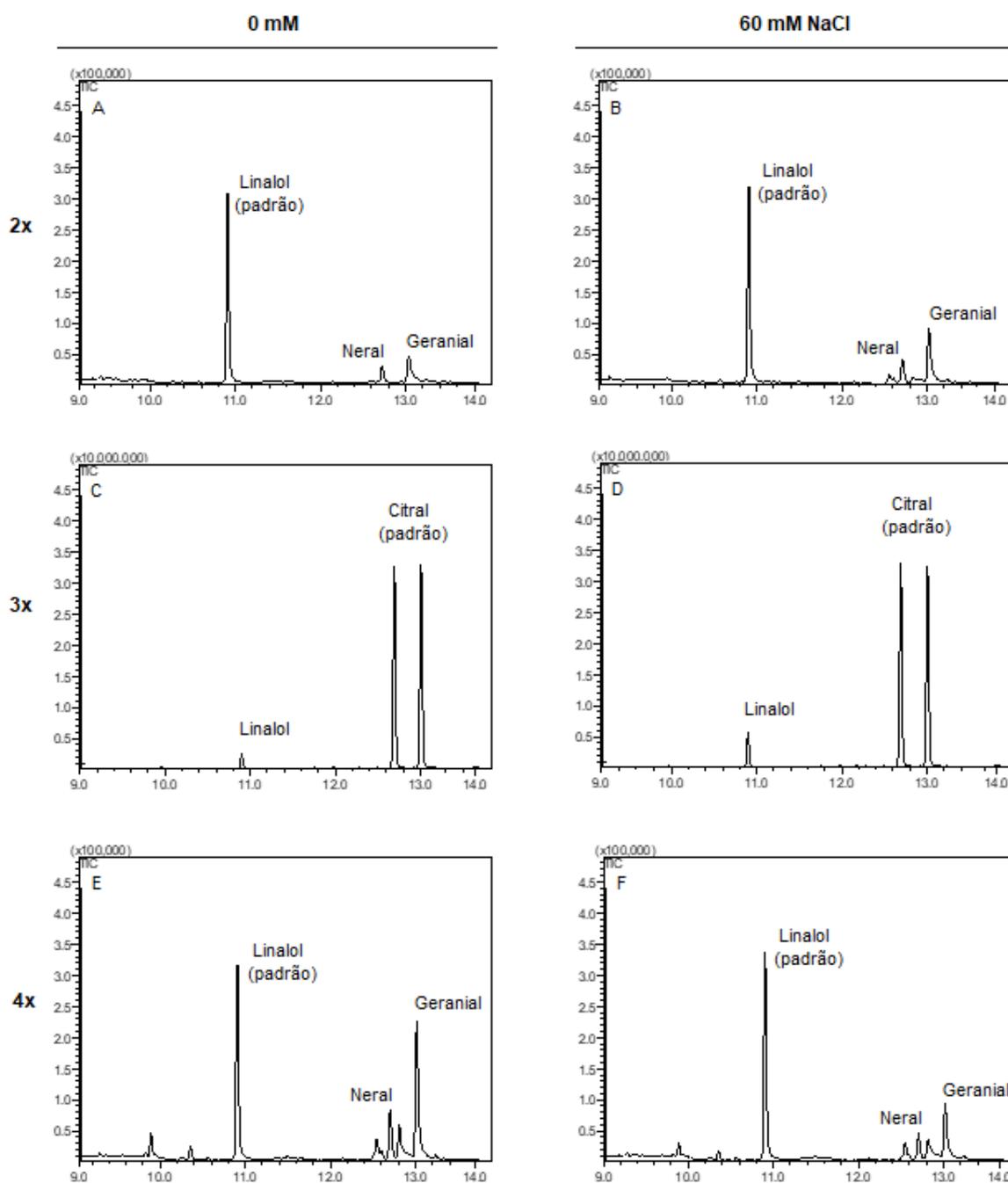


Figura 7- Perfil cromatográfico dos constituintes do óleo essencial em *L. alba*. 0 mM NaCl (A: diploide; C: triploide; E: tetraploide); 60 mM NaCl (B: diploide; D: triploide; F: tetraploide). Tempos de retenção: linalol (10,87), neral (12,68) e geranial (12,98).

6.2 RESULTADOS ESTRESSE HÍDRICO

Os acessos de *Lippia alba* (diploide, triploide e tetraploide) foram submetidos a PEG-4000 a 1% por 40 dias de cultivo *in vitro*. Como controle, os acessos foram também mantidos sem a adição de PEG. Em seguida, utilizaram-se parâmetros morfofisiológicos, quantificação de óleo essencial e expressão de genes relacionados à via de monoterpenos para avaliar o efeito do estresse.

6.2.1 RESULTADOS ANÁLISE DE CRESCIMENTO

O acesso diploide (Figura 8) não apresentou diferença significativa para o comprimento da maior raiz, número de nós, massa fresca das folhas e raízes (Figura 9 B, C, F e G), e apresentou redução do comprimento da parte aérea, número de folhas, massa fresca total e área foliar (Figura 9 A, D, E e H). Também apresentou diferença significativa quando comparado aos acessos poliploides. Os acessos triploide e tetraploide apresentaram maior número de folhas comparados ao acesso diploide, quando não estavam sob estresse (Figura 9 D) e aumento da massa fresca total quando comparados ao acesso diploide sob 1% PEG (Figura 9 E).

O acesso triploide (Figura 9) não apresentou diferenças significativas para as variáveis comprimento da maior raiz, massa fresca das folhas e raízes (Figura 9 B, F e G). No entanto, observou-se redução no comprimento da parte aérea, número de nós, número de folhas, massa fresca total e área foliar (Figura 9 A, C, D, E e H) sob estresse.

O acesso tetraploide (Figura 9) não apresentou diferenças significativas para as variáveis de crescimento analisadas (Figura 9). No entanto, observou-se maior comprimento da maior raiz e massa fresca total quando comparado ao acesso diploide (0 e 1% PEG) (Figura 9 B e E). Além disso, apresentou maior número de nós e de folhas quando comparados os acessos diploide e tetraploide sob 1% PEG (Figura 9 C e D).

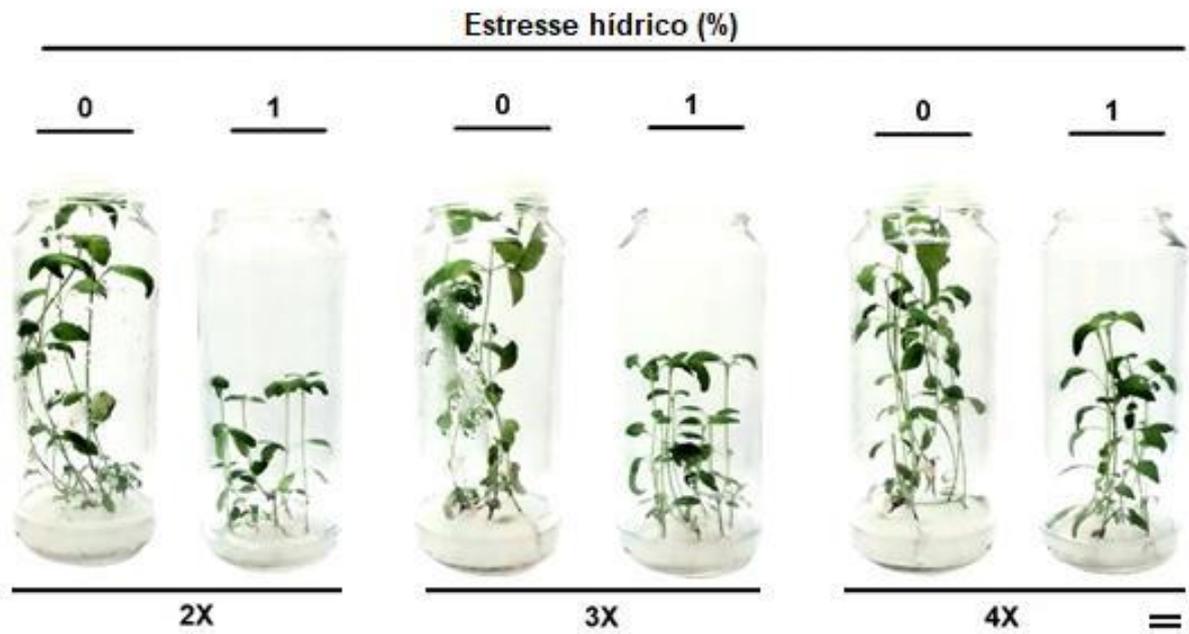


Figura 8- Acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 1% PEG. Barra = 1cm.

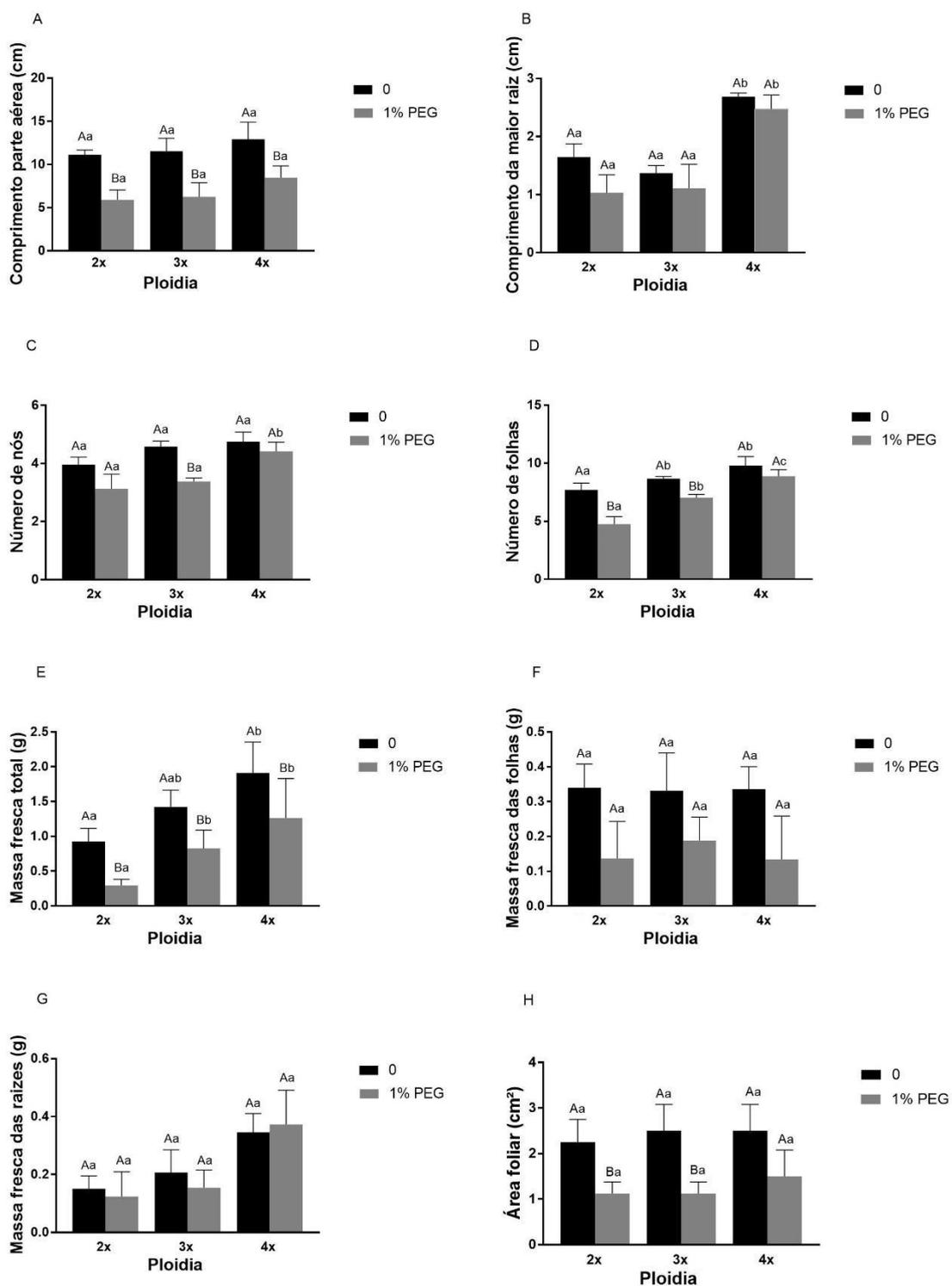


Figura 9- Variáveis de crescimento em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 1% PEG. A: Comprimento da parte aérea (cm); B: Comprimento da maior raiz (cm); C: Número de nós; D: Número de folhas; E: Massa fresca total (g); F: Massa fresca das folhas (g); G: Massa fresca das raízes (g) e H: Área foliar (cm²). Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 1% PEG; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey ($n=3$).

6.2.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS

O acesso diploide apresentou aumento da enzima catalase e prolina sob 1% PEG (Figura 10 B e G) e o teor de prolina foi maior quando comparado aos demais níveis de ploidia, na ausência e presença do estresse. Entretanto, não observou-se diferenças significativas para os demais parâmetros analisados (Figura 10 A, C, D, E e F).

Observou-se que o acesso triploide, apresentou redução eficiência fotoquímica do fotossistema II e do teor de prolina (Figura 10 F e G), não havendo, contudo, alteração para os demais parâmetros sob estresse por estresse hídrico (Figura 10 A, B, C, D e E).

O acesso tetraploide apresentou aumento do teor de prolina (Figura 10 G), contudo, não apresentou alterações significativas para os demais parâmetros avaliados (Figura 10 A, B, C, D, E e F). Entretanto, observou-se que a eficiência fotoquímica do fotossistema II foi maior quando comparada às demais ploidias sob 1% PEG (Figura 10 F).

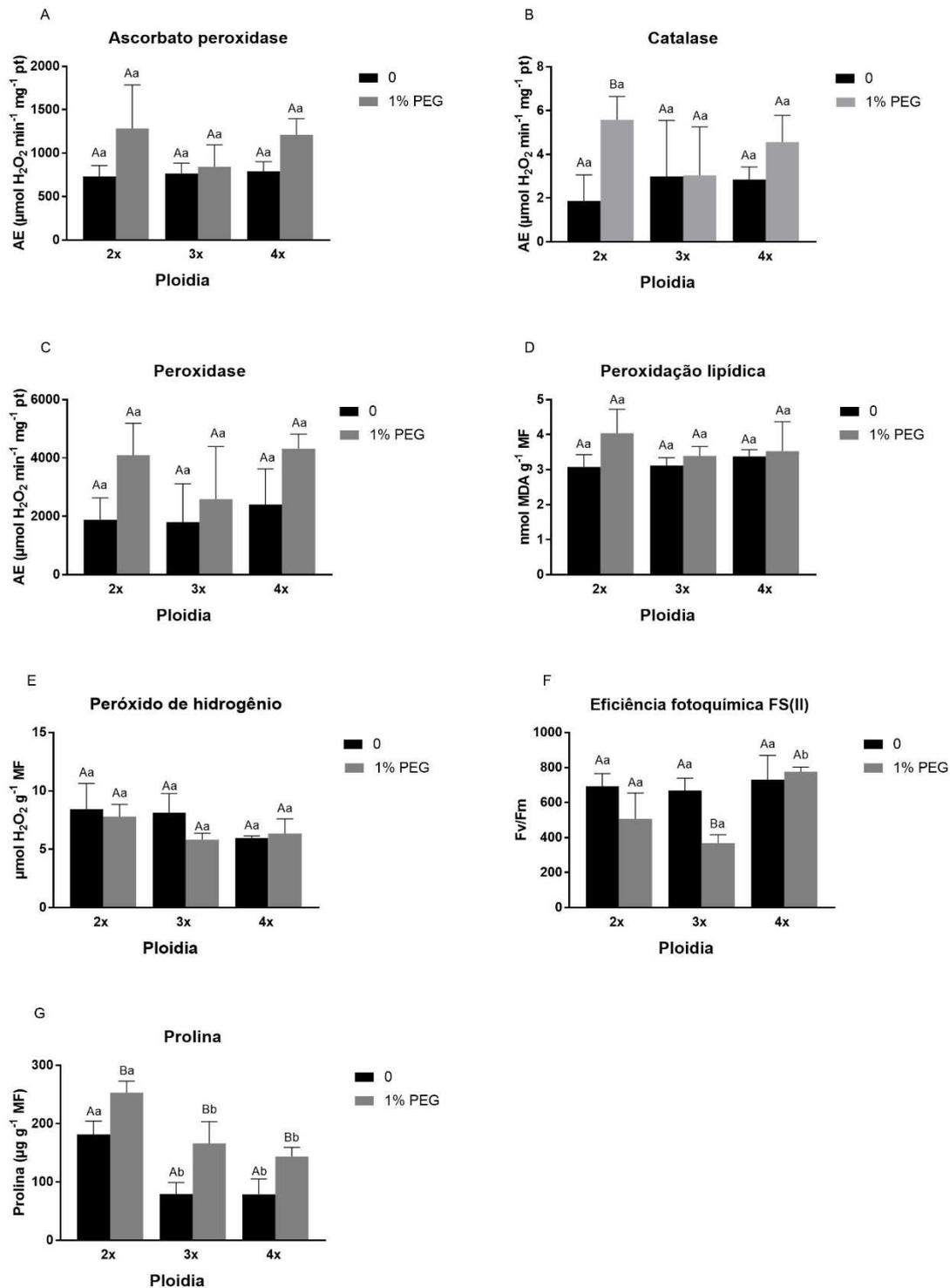


Figura 10- Análises bioquímicas e fisiológicas em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 1% PEG. A: Ascorbato peroxidase; B: Catalase; C: Peroxidase; D: Peroxidação de lipídeos; E: Peróxido de hidrogênio; F: Eficiência fotoquímica do FS(II); G :Prolina. Letras iguais (maiuscula: entre 0 e 1% PEG; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey (n=3).

6.2.3 EXPRESSÃO GÊNICA

O acesso triploide, apresentou aumento da expressão relativa ao gene *LIS1* sob 1% PEG. Acessos diploide e triploide, apresentaram maior produção de *LIS1* quando comparados ao tetraploide sob 1% PEG (Figura 11 A). Já para o gene *GDS*, não houve diferença significativa para ambas as ploidias sob estresse por estresse hídrico (Figura 11 B).

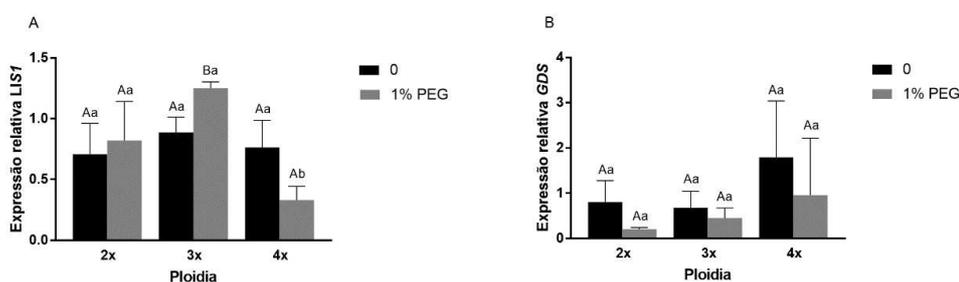


Figura 11- Expressão de genes relacionados à síntese de terpenos em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 1% PEG. A: *LIS1* (S-linalol sintase) e B: *GDS* (geraniol desidrogenase) O gene *CIT* (citocromo b) foi usado como controle endógeno. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 1% PEG; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).

6.2.4 MICROEXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL

Observou-se aumento no teor de linalol sob 1% PEG para o acesso triploide (Figura 12 A e Figura 13 C e D). Entretanto, para os acessos diploide e tetraploide, não houve diferença significativa para os teores de citral (Figura 12 B e 13 A, B, E e F). Comparando-se acessos diploide e tetraploide não submetidos ao estresse por estresse hídrico, o diploide apresentou menor teor de citral (Figura 12 B).

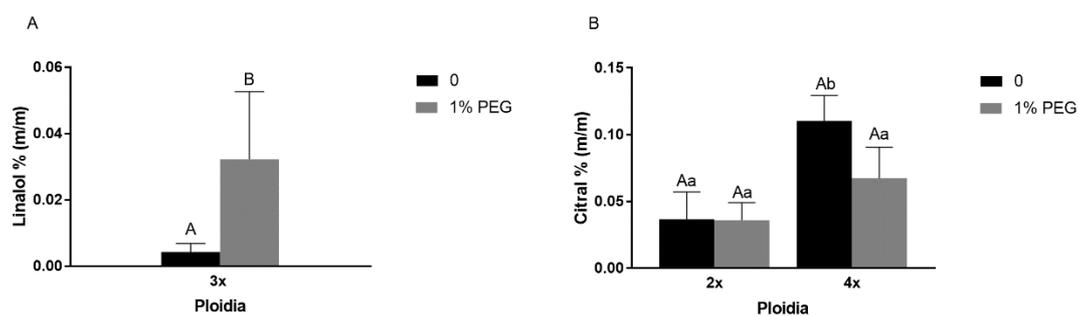


Figura 12- Componente majoritário do óleo essencial (% m/m) em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 1% PEG. A: Linalol e B: Citral. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 1% PEG; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).

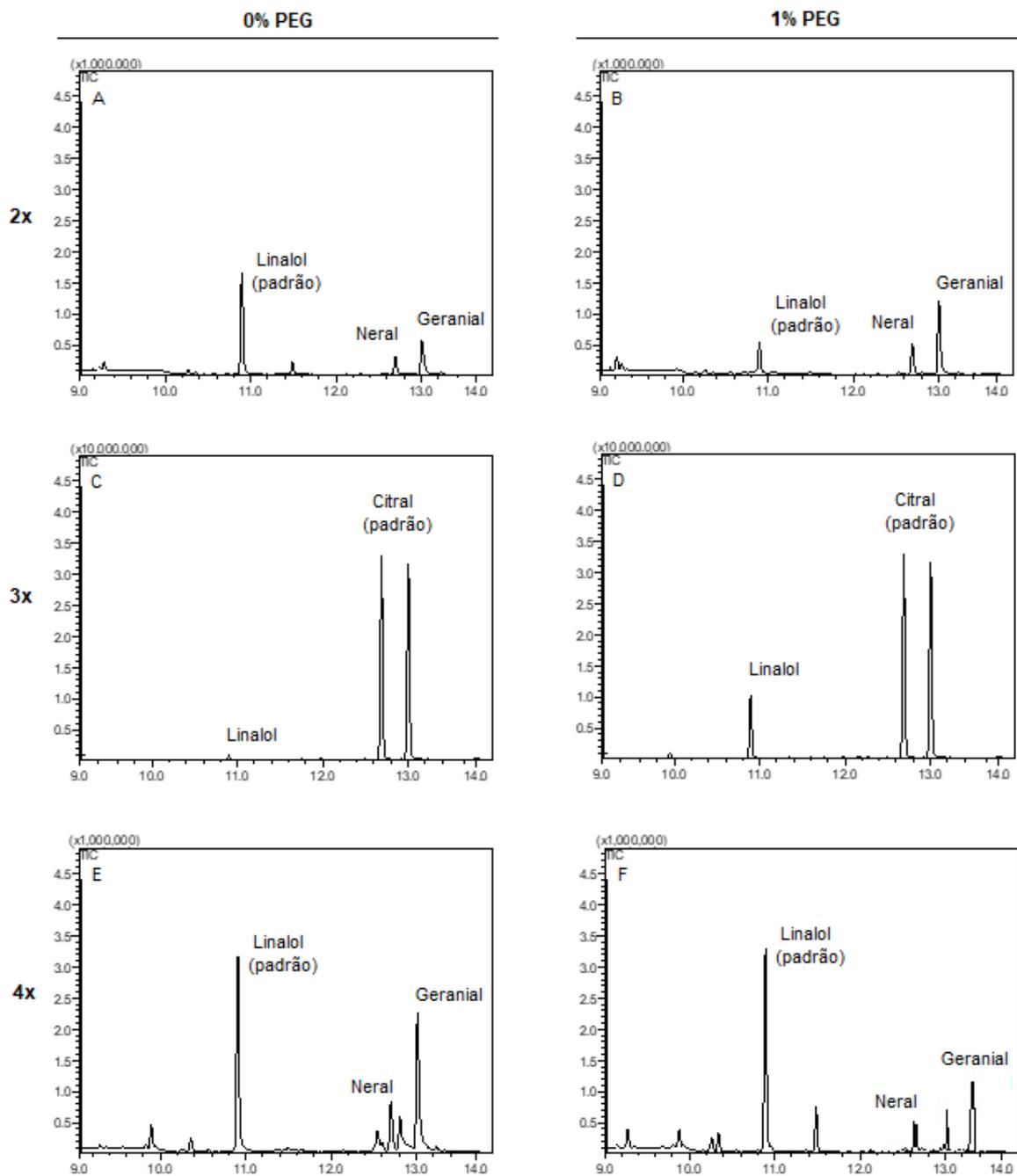


Figura 13- Perfil cromatográfico dos constituintes do óleo essencial em *L. alba*. 0 PEG (A: diploide; C: triploide; E: tetraploide); 1% PEG (B: diploide; D: triploide; F: tetraploide). Tempos de retenção: linalol (10,87), neral (12,68) e geranial (12,98).

6.3 RESULTADOS HORMÔNIO EXÓGENO: ÁCIDO ABSCÍSICO

Os acessos de *Lippia alba* (diploide, triploide e tetraploide) foram submetidos a 10 μ M ABA por 40 dias de cultivo *in vitro*. Como controle, os acessos foram também mantidos sem a adição de ABA. Em seguida, utilizaram-se parâmetros morfofisiológicos, quantificação de óleo essencial e expressão de genes relacionados à via de monoterpenos para avaliar o efeito do estresse.

6.3.1 ANÁLISE DE CRESCIMENTO

Os acessos diploide, triploide e tetraploide (Figura 14) não apresentaram diferenças significativas para as variáveis de crescimento analisadas (Figura 15).

O acesso diploide, no entanto, apresentou diferenças significativas quando comparado aos acessos poliploides. O acesso tetraploide, quando submetido a 10 μ M ABA, mostrou-se superior ao diploide no número de folhas, massa fresca total e massa fresca das raízes (Figura 15 D, E e G). Sob as mesmas condições e também na ausência de ABA, o acesso tetraploide apresentou valores superiores ao diploide para o comprimento da maior raiz, número de folhas, massa fresca total e massa fresca das raízes (Figura 15 B, D, E e G).

O acesso triploide apresentou maior massa fresca das folhas, quando comparado ao acesso diploide (Figura 15 F), e menor comprimento da maior raiz quando comparado ao acesso tetraploide sob estresse (Figura 15 B).

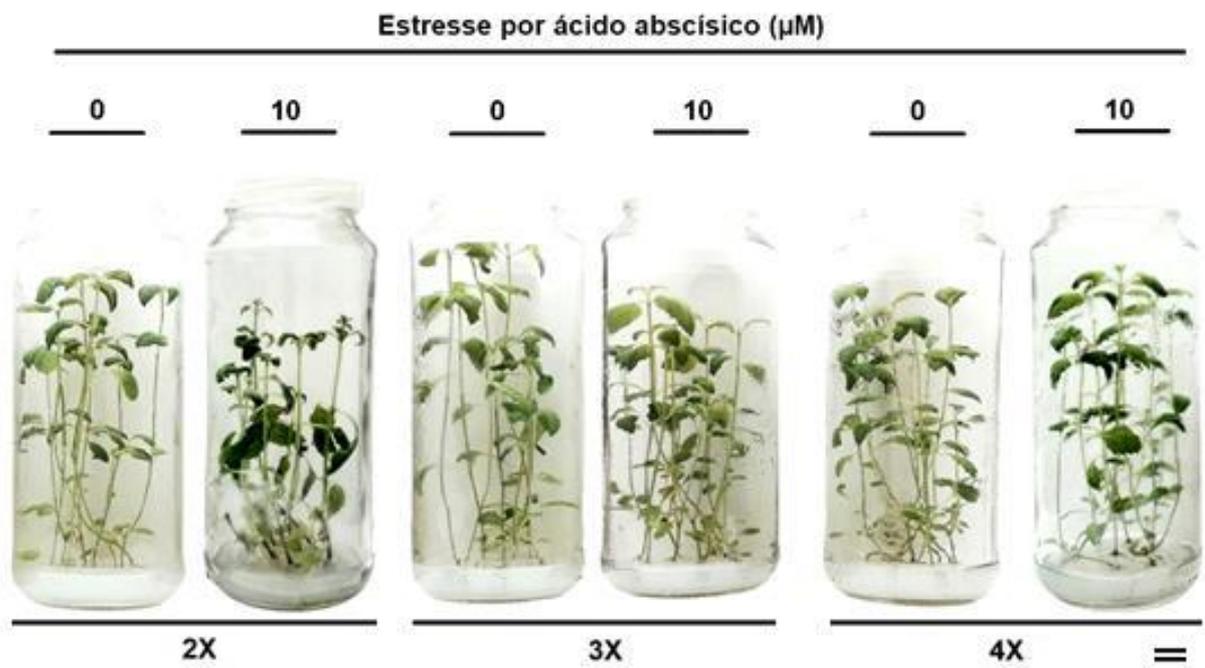


Figura 14- Acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 μM de ABA. Barra = 1cm.

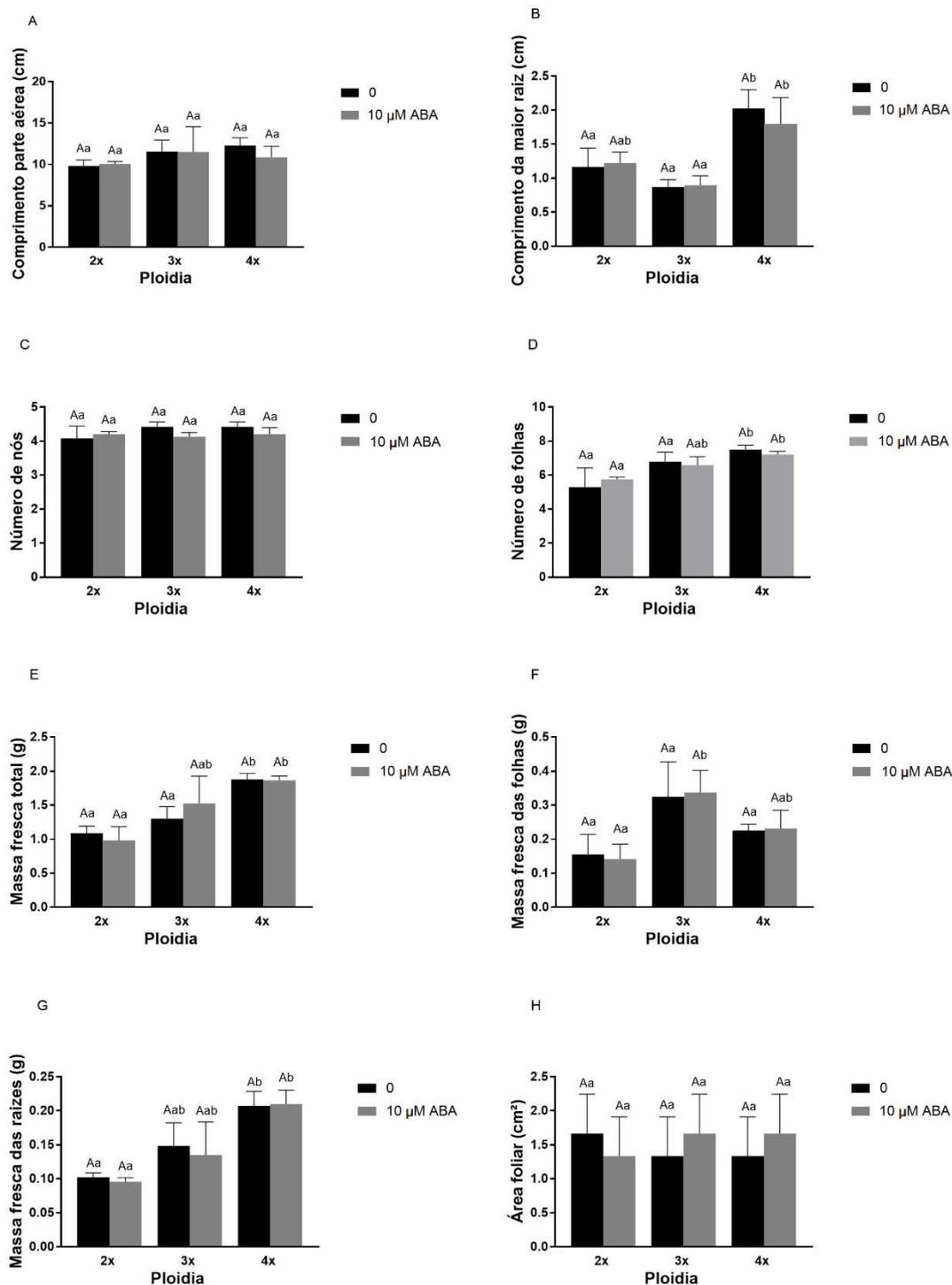


Figura 15- Variáveis de crescimento em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 μM de ABA. A: Comprimento da parte aérea (cm); B: Comprimento da maior raiz (cm); C: Número de nós; D: Número de folhas; E: Massa fresca total (g); F: Massa fresca das folhas (g); G: Massa fresca das raízes (g) e H: Área foliar (cm²). Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 10 μM de ABA; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey ($n=3$).

6.3.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS

Os acessos diploide e tetraploide apresentaram maior teor de prolina quando sob estresse por ABA (Figura 16 G). Contudo, os acessos diploide, triploide e tetraploide, não apresentaram diferenças significativas para as variáveis bioquímicas e fisiológicas analisadas (Figura 16).

O teor de prolina foi maior para o acesso diploide, quando comparado aos demais níveis de ploidia, na ausência do estresse e também maior quando comparado ao acesso triploide na presença de 10 μM de ABA (Figura 16 G).

O acesso tetraploide apresentou maior produção de peróxido de hidrogênio, quando comparado ao diploide sob 10 μM de ABA. Além disso, apresentou maior teor de ascorbato peroxidase, comparado ao triploide, a 0 e 10 μM de ABA, e também maior produção de peroxidase, comparado ao triploide sob estresse (Figura 16 A e C).

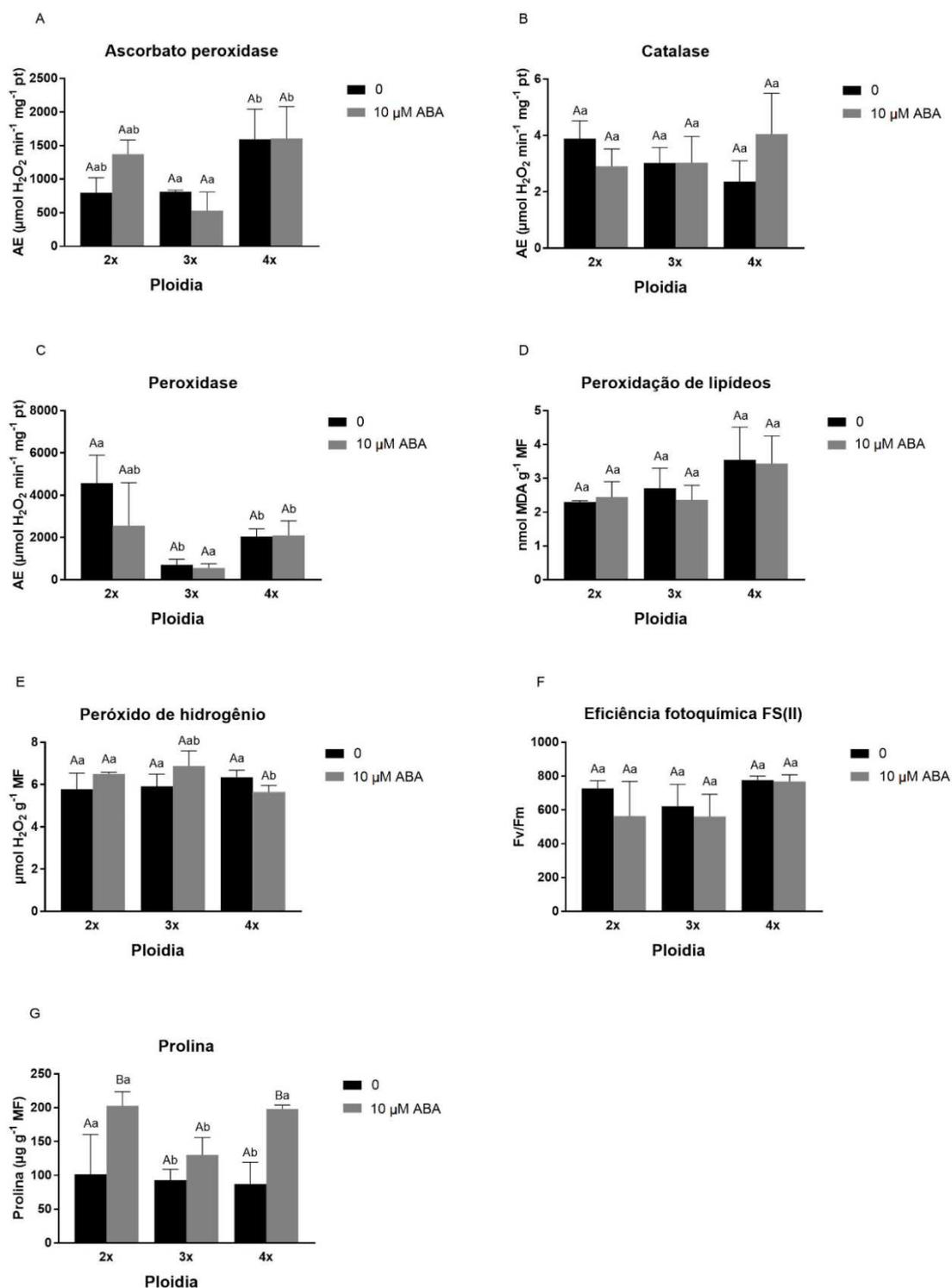


Figura 16- Análises bioquímicas e fisiológicas em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 μM de ABA. A: Ascorbato peroxidase; B: Catalase; C: Peroxidase; D: Peroxidação de lipídeos; E: Peróxido de hidrogênio; F: Eficiência fotoquímica do FS(II); G: Prolina. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 10 μM de ABA; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey ($n=3$).

6.3.3 EXPRESSÃO GÊNICA

Não houve diferença significativa para a expressão relativa aos genes *LIS1* e *GDS* sob estresse por ácido abscísico para ambos os níveis de ploidia (Figura 17).

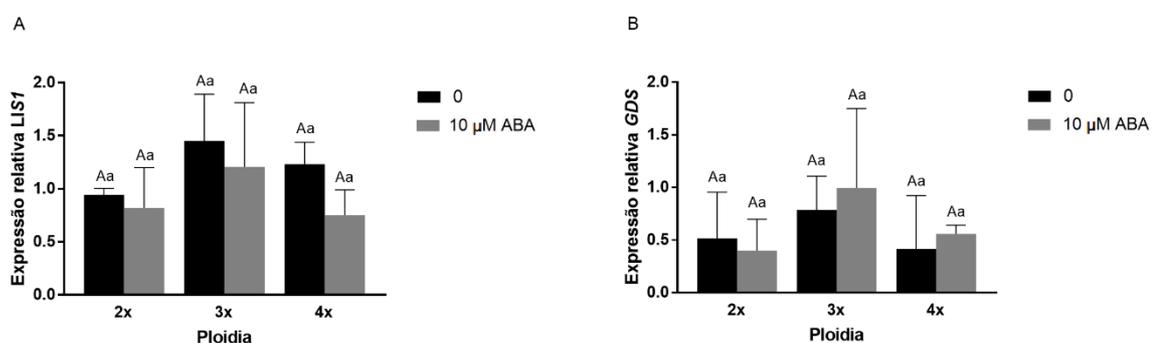


Figura 17- Expressão de genes relacionados à síntese de terpenos em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias in vitro em meio MS com 0 e 10 μM de ABA. A: *LIS1* (S-linalol sintase) e B: *GDS* (geraniol desidrogenase) O gene *CIT* (citocromo b) foi usado como controle endógeno. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 10 μM de ABA; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).

6.3.4 MICROEXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL

O acesso triploide apresentou maior produção de linalol sob estresse por ácido abscísico. Não se observou, por outro lado, diferenças significativas para os teores de citral nos acessos diploide e tetraploide, quando submetidos ao ABA (Figuras 18 e 19).

Além disso, o diploide apresentou maior teor de citral comparado ao tetraploide sob condições de estresse (Figura 18 B).

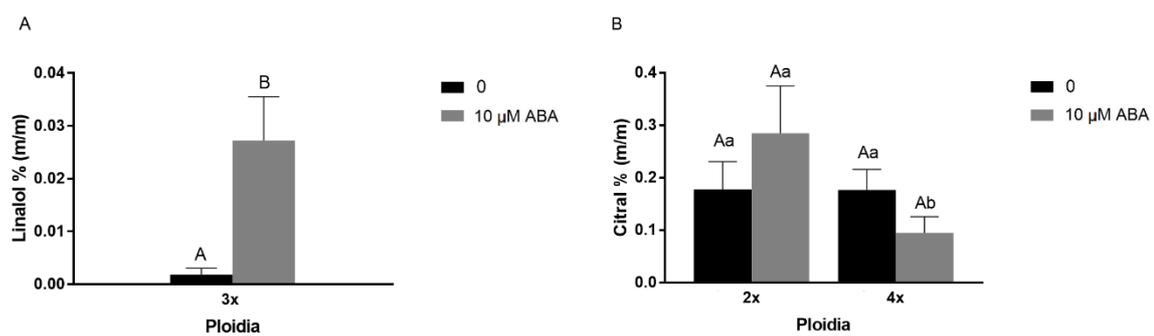


Figura 18- Componente majoritário do óleo essencial (% m/m) em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 μM de ABA. A: Linalol e B: Citral. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 10 μM de ABA; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).

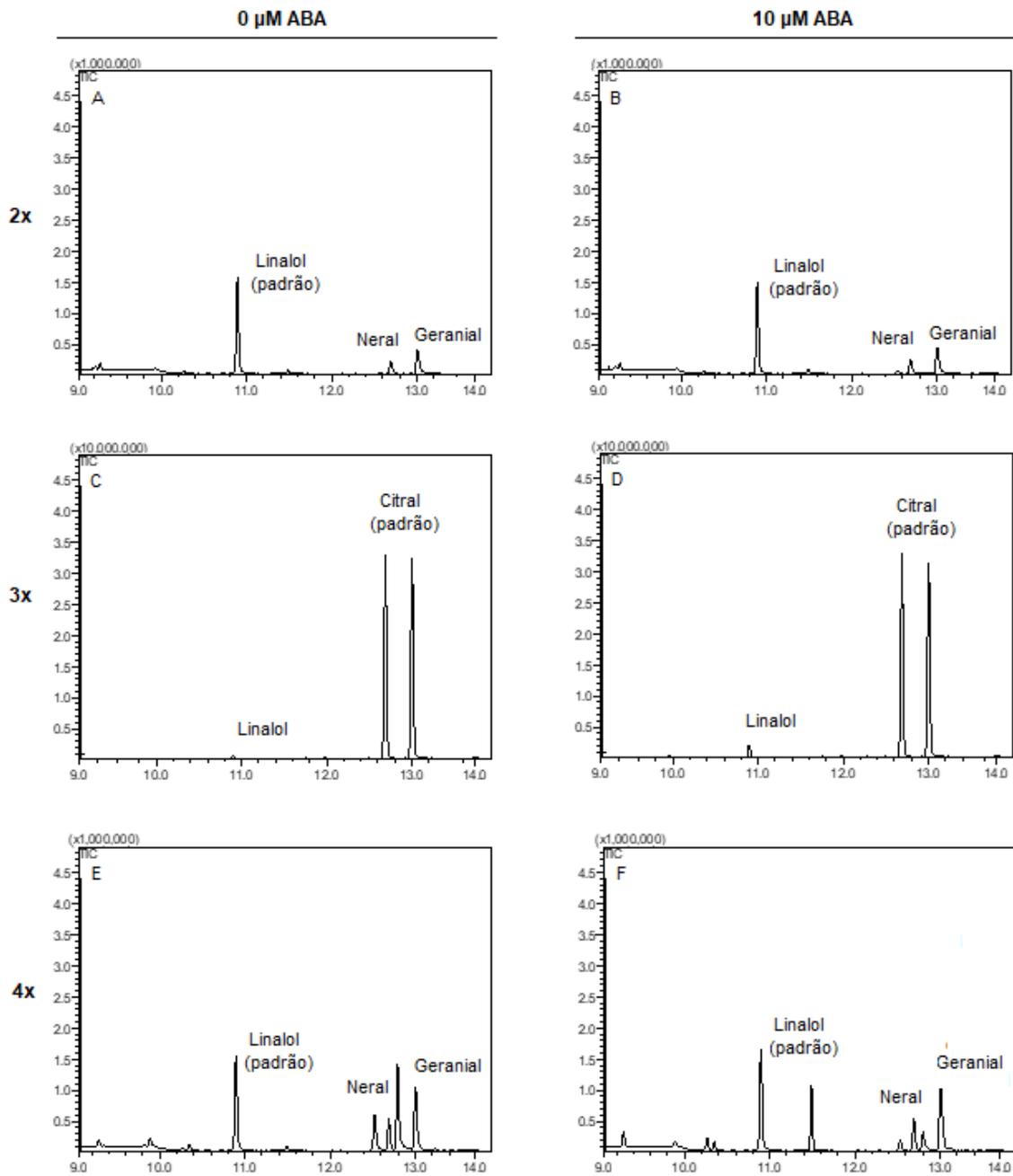


Figura 19- Perfil cromatográfico dos constituintes do óleo essencial em *L. alba*. 0 μM de ABA (A: diploide; C: triploide; E: tetraploide); 10 μM de ABA (B: diploide; D: triploide; F: tetraploide). Tempos de retenção: linalol (10,87), neral (12,68) e geranial (12,98).

6.4 RESULTADOS HORMÔNIO EXÓGENO: ÁCIDO SALICÍLICO

Os acessos de *Lippia alba* (diploide, triploide e tetraploide) foram submetidos a 10 μM de AS por 40 dias de cultivo *in vitro*. Como controle, os acessos foram também mantidos sem a adição de AS. Em seguida, utilizaram-se parâmetros morfofisiológicos, quantificação de óleo essencial e expressão de genes relacionados à via de monoterpenos para avaliar o efeito do estresse.

6.4.1 ANÁLISE DE CRESCIMENTO

Os acessos diploide, triploide e tetraploide (Figura 20) não apresentaram diferenças significativas para as variáveis de crescimento analisadas (Figura 21). Entretanto, o acesso tetraploide apresentou maior raiz que o acesso diploide e triploide, na ausência e presença de AS (Figura 21 B).

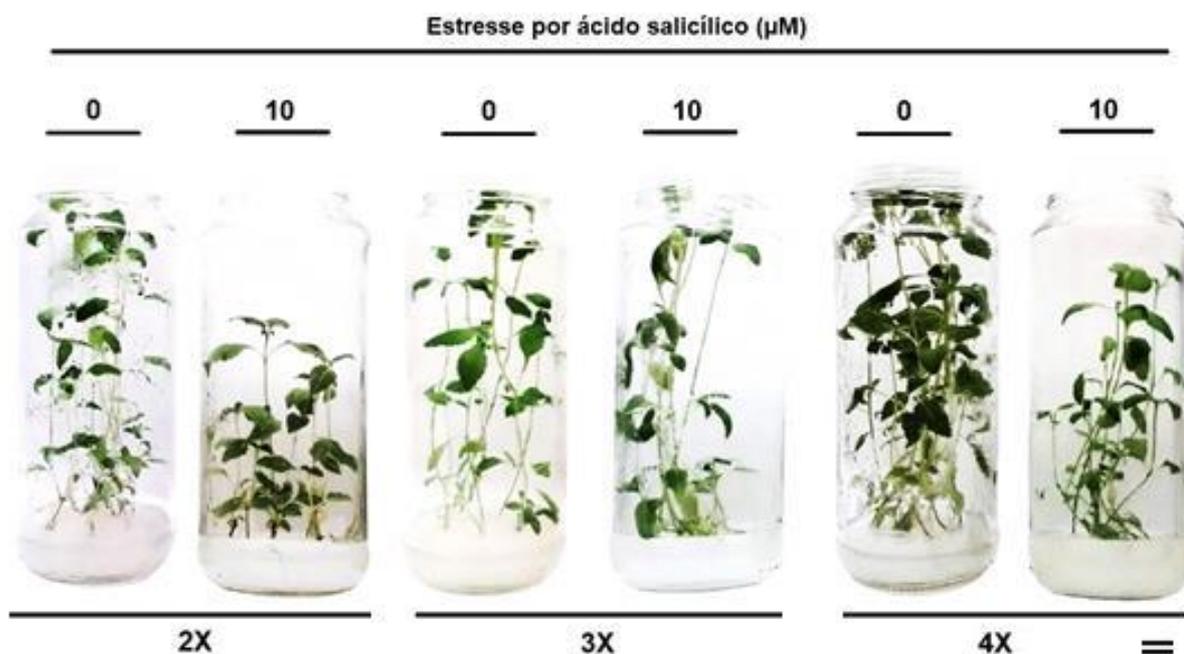


Figura 20- Acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 μM de AS. Barra = 1cm.

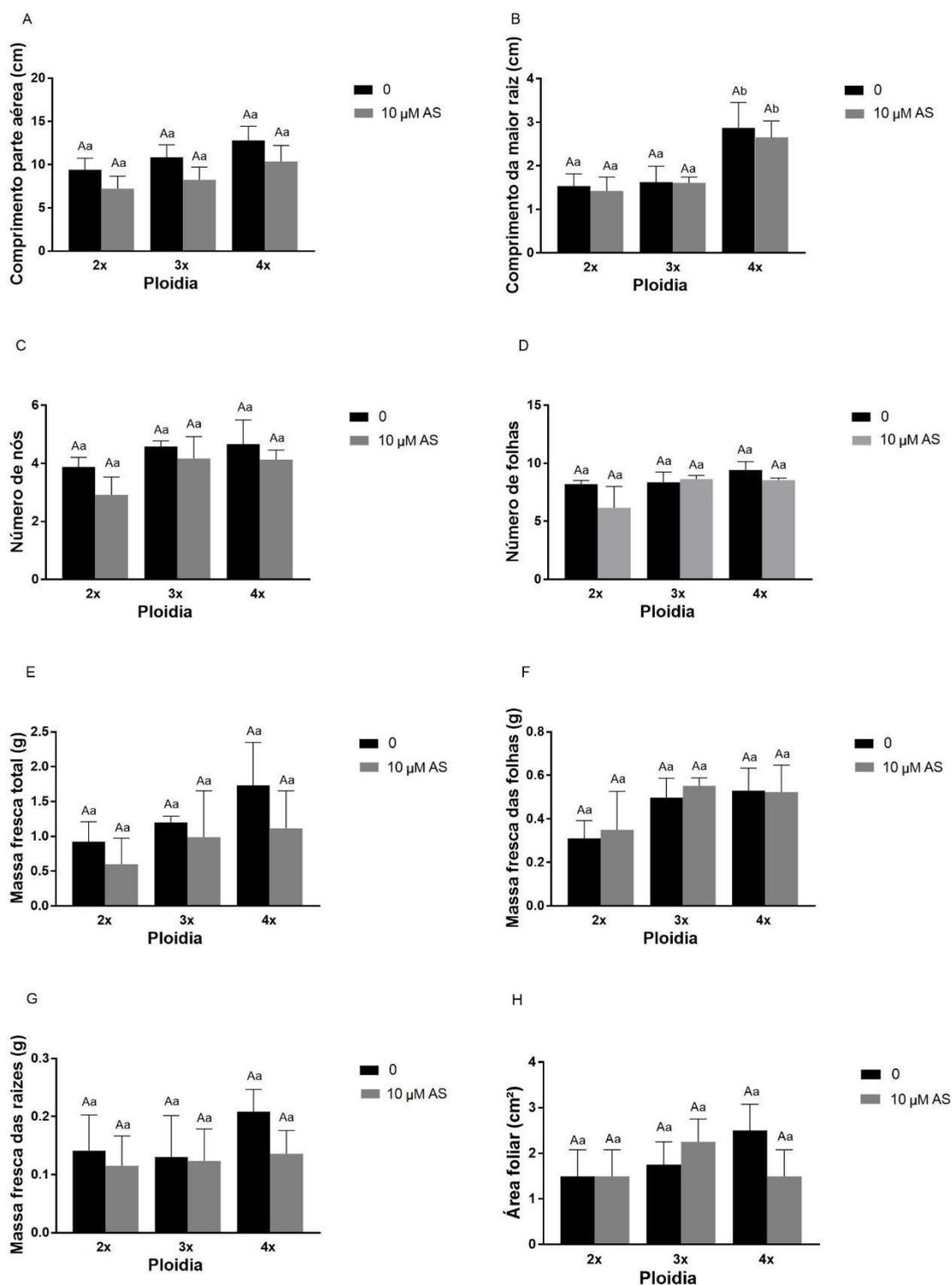


Figura 21- Variáveis de crescimento em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 μM de AS. A: Comprimento da parte aérea (cm); B: Comprimento da maior raiz (cm); C: Número de nós; D: Número de folhas; E: Massa fresca total (g); F: Massa fresca das folhas (g); G: Massa fresca das raízes (g) e H: Área foliar (cm²). Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 10 μM de AS; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey ($n=3$).

6.4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS

Os acessos diploide, triploide e tetraploide (exceto Figura 22 G) não apresentaram diferenças significativas para as variáveis analisadas (Figura 22) sob estresse. No entanto, o acesso diploide e triploide apresentaram maior teor de prolina quando comparado ao acesso tetraploide na ausência do estresse (Figura 22 G).

O acesso tetraploide apresentou maior teor de prolina sob estresse (Figura 22 G) e maior eficiência fotoquímica do fotossistema II quando comparado aos acessos diploide e triploide sob 0 e 10 μM de AS (Figura 22 E).

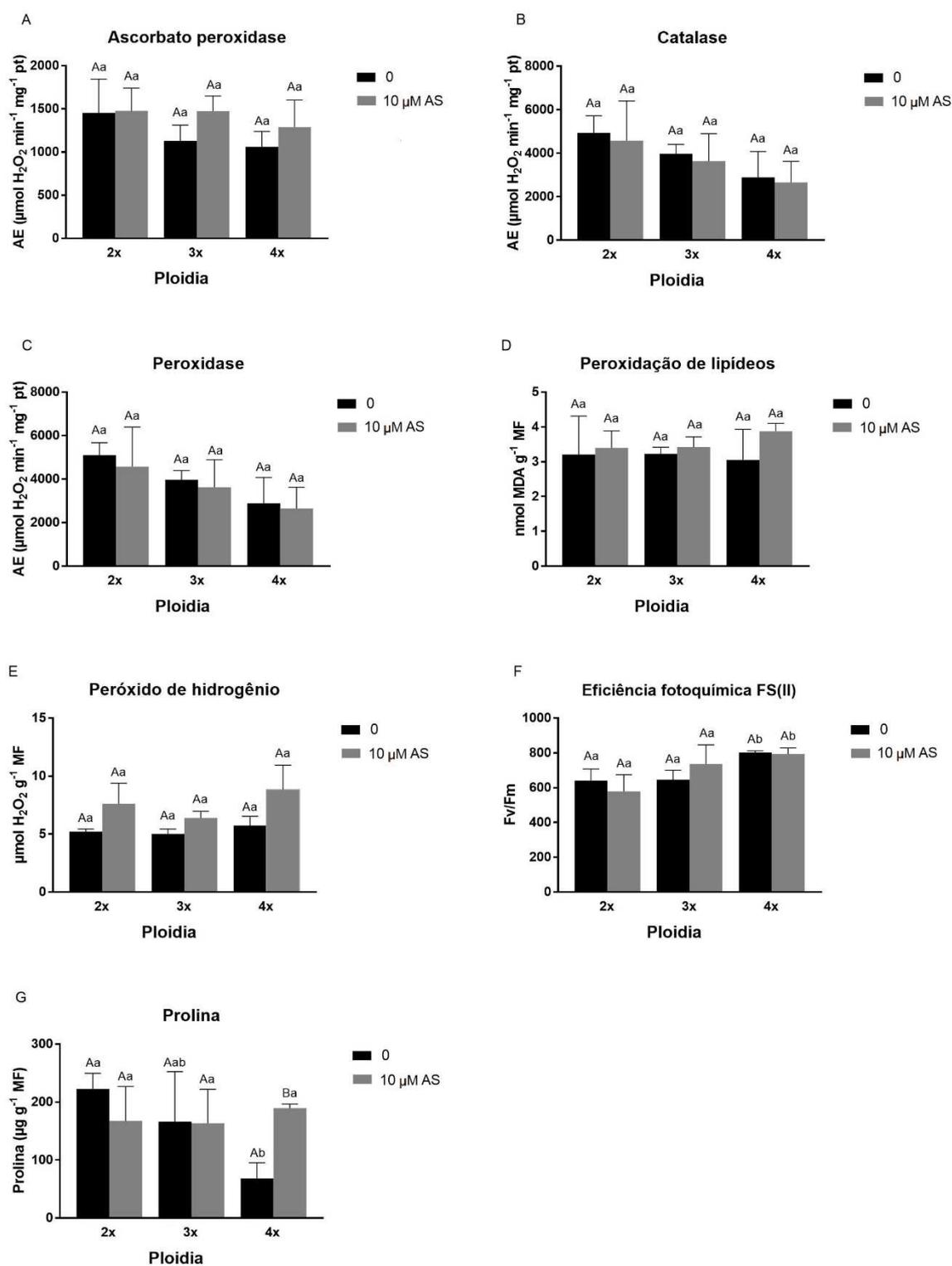


Figura 22- Análises bioquímicas e fisiológicas em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 μM de AS. A: Ascorbato peroxidase; B: Catalase; C: Peroxidase; D: Peroxidação de lipídeos; E: Peróxido de hidrogênio; F: Eficiência fotoquímica do FS(II); G: Prolina. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 10 μM de AS; minúscula: entre ploídias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey ($n=3$).

6.4.3 EXPRESSÃO GÊNICA

Para a expressão relativa ao gene *LIS1* os acessos diploide e triploide não apresentaram diferenças significativas. No entanto, o acesso tetraploide apresentou redução para a expressão de *LIS1* quando submetido ao estresse por AS (Figura 23 A). Não houve diferença significativa para a expressão relativa ao gene *GDS* para os acessos diploide, triploide e tetraploide (Figura 23 B).

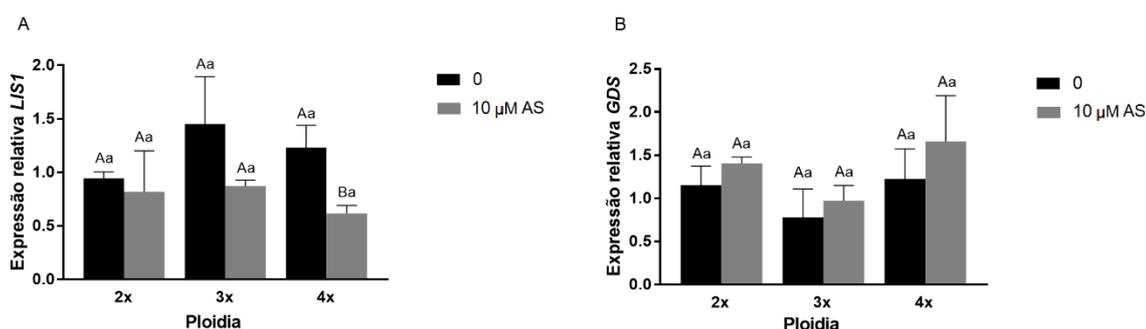


Figura 23- Expressão de genes relacionados à síntese de terpenos em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 µM de AS. A: *LIS1* (S-linalol sintase) e B: *GDS* (geraniol desidrogenase). O gene *CIT* (citocromo b) foi usado como controle endógeno. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 10 µM de AS; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).

6.4.4 MICROEXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL

O acesso triploide apresentou diferença significativa para o teor de linalol sob estresse por ácido salicílico (Figura 24 A e Figura 25 C e D). Entretanto, os acessos diploide e tetraploide, não revelaram diferenças para os teores de citral (Figuras 24 B e 25 A, B, D e E). Além disso, o acesso tetraploide, na ausência e presença de AS, apresentou maior teor de citral, quando comparado ao diploide (Figura 24 B).

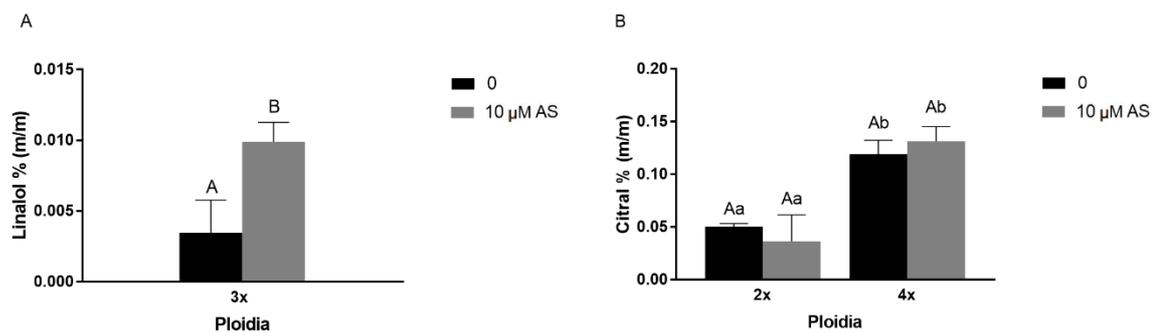


Figura 24- Componente majoritário do óleo essencial (% m/m) em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS com 0 e 10 μM de AS. A: Linalol e B: Citral. Letras iguais (maiúscula: entre 0 e 10 μM de AS; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).

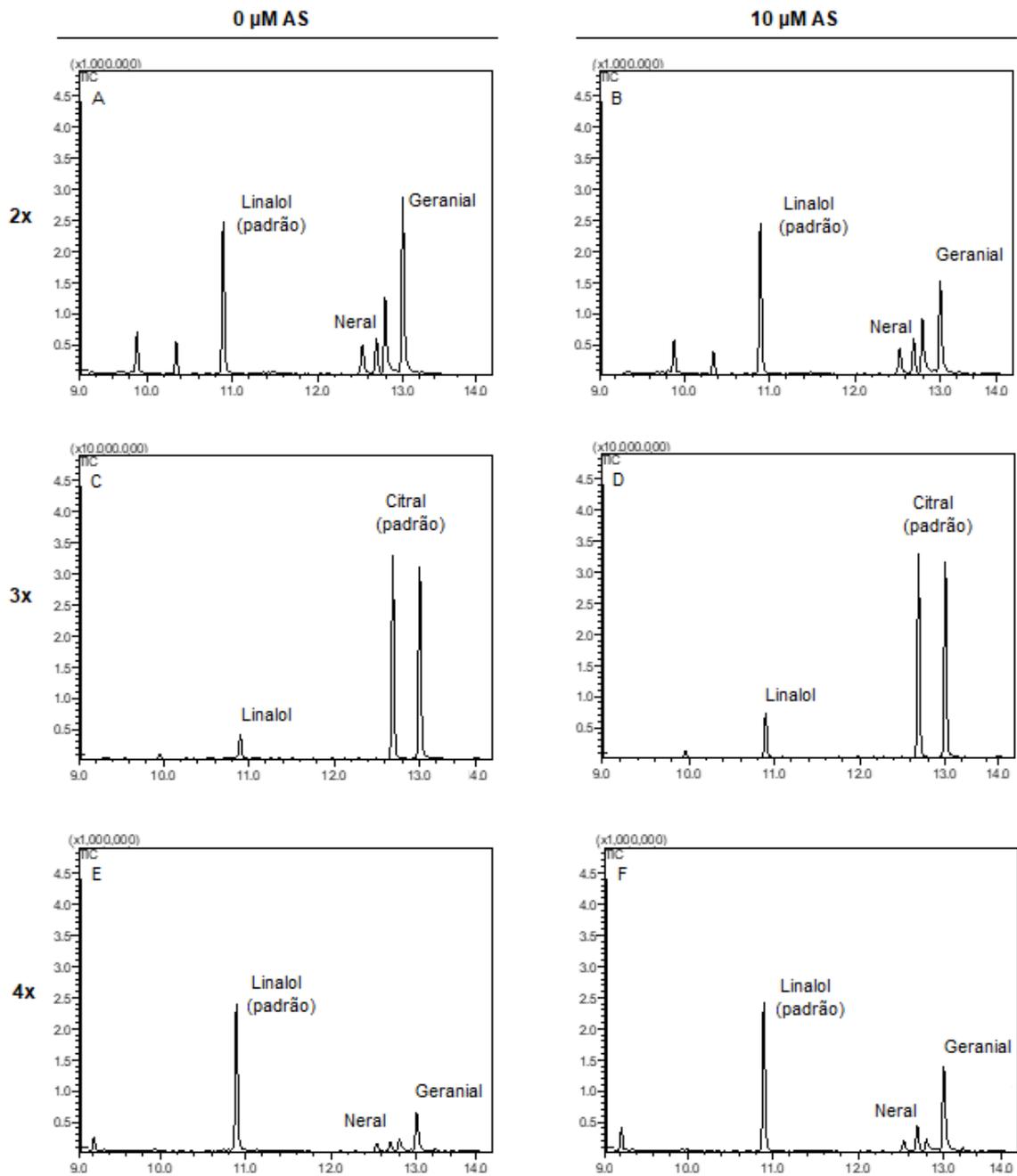


Figura 25- Perfil cromatográfico dos constituintes do óleo essencial em *L. alba*. 0 μM de AS (A: diploide; C: triploide; E: tetraploide); 10 μM de AS (B: diploide; D: triploide; F: tetraploide). Tempos de retenção: linalol (10,87), neral (12,68) e geranial (12,98).

6.5 RESULTADOS ESTRESSE POR FERIMENTO

Os acessos de *Lippia alba* (diploide, triploide e tetraploide) foram mantidos em sala de crescimento e submetidos a ferimento mecânico por 36 horas, completando 40 dias de cultivo *in vitro*. Como controle, os acessos foram mantidos sem ferimento. Em seguida, utilizaram-se parâmetros morfofisiológicos, quantificação de óleo essencial e expressão de genes relacionados à via de monoterpenos para avaliar o efeito do estresse.

6.5.1 ANÁLISE DE CRESCIMENTO

Os acessos diploide, triploide e tetraploide (Figura 26) não apresentaram diferenças significativas para as variáveis de crescimento analisadas comparando-se o material submetido ao ferimento com o controle (Figura 27).

Os poliploides apresentaram maior comprimento da maior raiz, número de folhas, massa fresca total e das raízes, com e sem ferimento (Figura 27 B, D, E e G). Os poliploides apresentaram ainda maior peso da massa total das folhas, quando comparados ao acesso diploide, quando o estresse por ferimento foi aplicado (Figura 27 F).

O acesso tetraploide, quando não submetido ao estresse por ferimento, apresentou maior comprimento da maior raiz e massa fresca total, quando comparado aos demais níveis de ploidia (Figura 27 B e E).

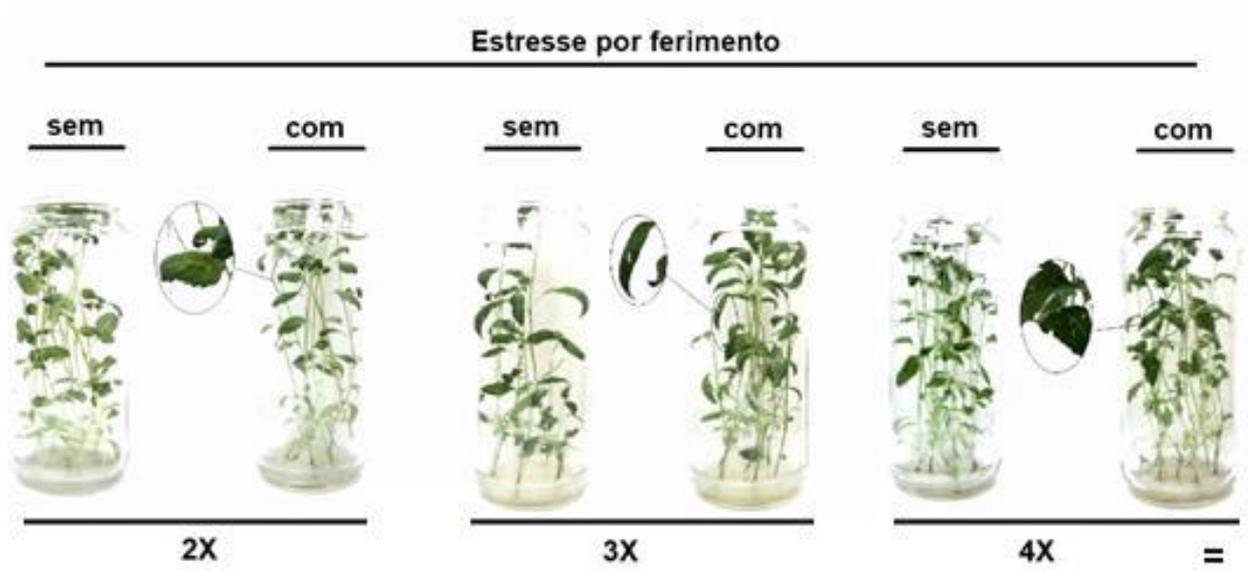


Figura 26- Acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS, sem e com ferimento. Barra = 1cm.

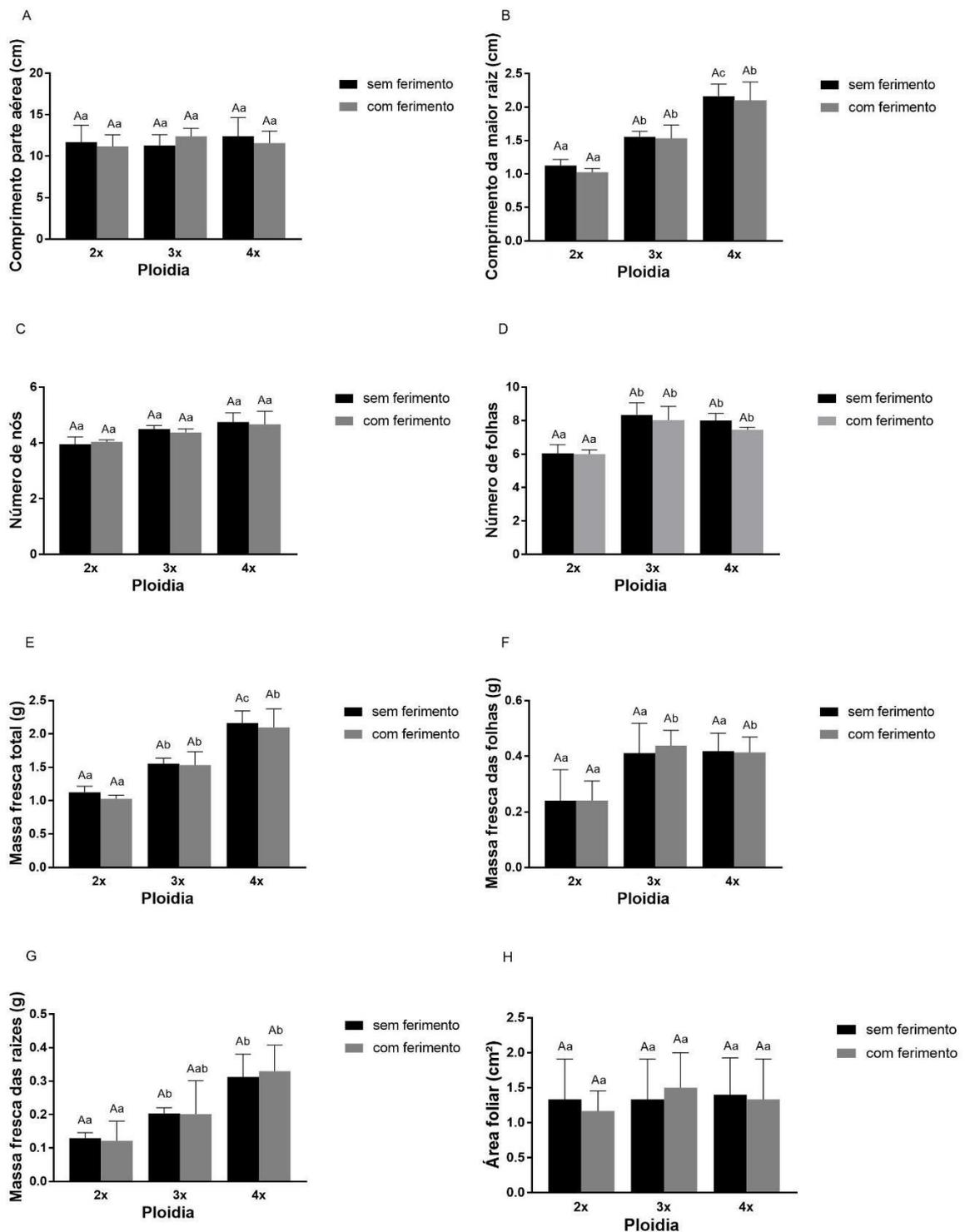


Figura 27- Variáveis de crescimento em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS sem e com fermento. A: Comprimento da parte aérea (cm); B: Comprimento da maior raiz (cm); C: Número de nós; D: Número de folhas; E: Massa fresca total (g); F: Massa fresca das folhas (g); G: Massa fresca das raízes (g) e H: Área foliar (cm²). Letras iguais (maiúscula: entre sem e com fermento; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey ($n=3$).

6.5.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS

Os acessos diploide e tetraploide não apresentaram diferenças significativas para as variáveis bioquímicas e fisiológicas analisadas comparando-se o material submetido ao fermento com o controle (Figura 28). Contudo, o acesso diploide apresentou maior eficiência fotoquímica do fotossistema II quando comparado aos demais níveis de ploidia na ausência do estresse (Figura 28 G). O acesso triploide apresentou redução da eficiência fotoquímica do fotossistema II (Figura 28 F).

Os poliploides apresentaram menor produção de ascorbato peroxidase e malondialdeído sem fermento e peróxido de hidrogênio, com fermento, quando comparados ao acesso diploide (Figura 28 A, D e E).

O acesso tetraploide apresentou maior produção de catalase e eficiência fotoquímica do fotossistema II, quando comparado aos demais níveis de ploidia, submetidos ao fermento (Figura 28 B e F).

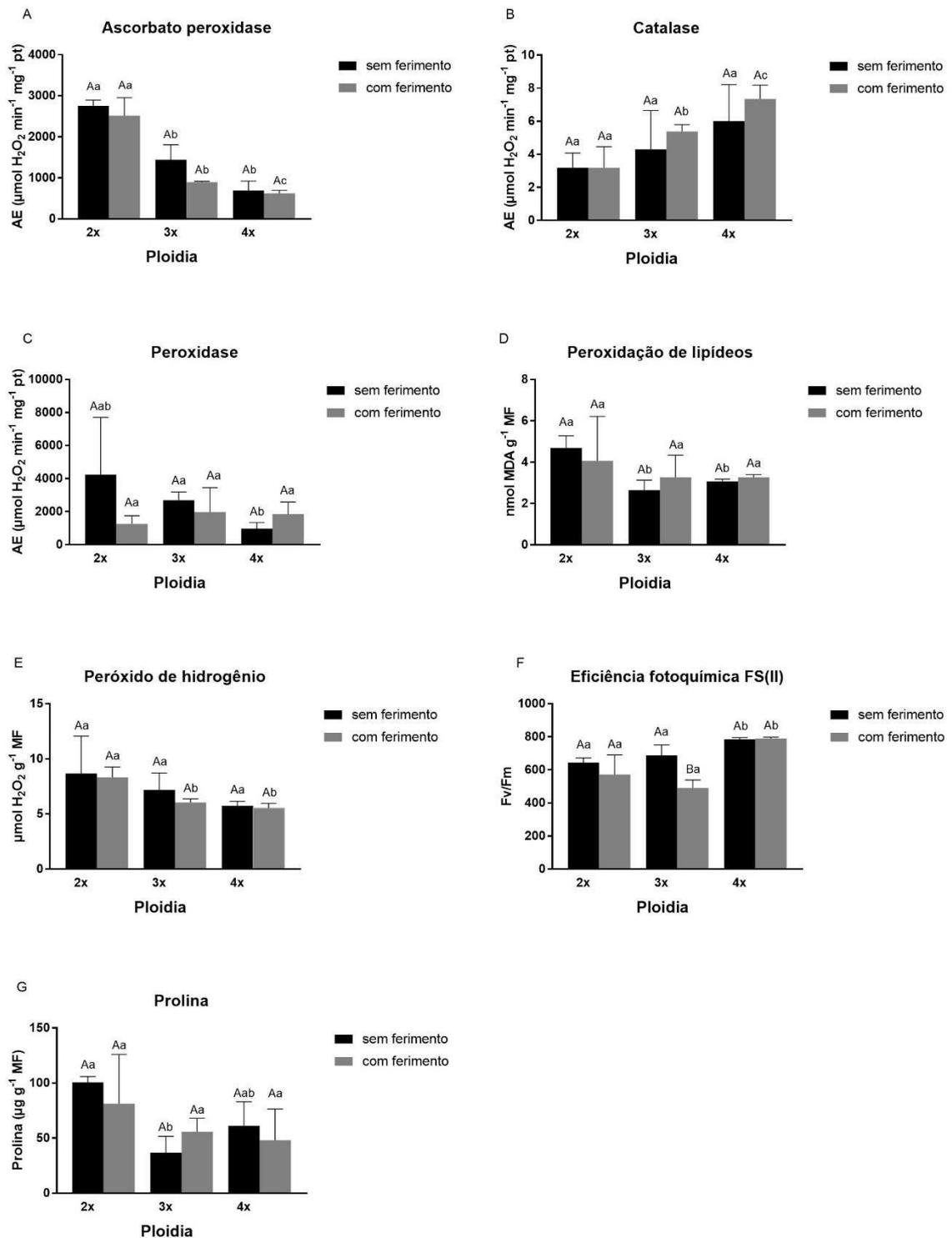


Figura 28- Análises bioquímicas e fisiológicas em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS sem e com fermento. A: Ascorbato peroxidase; B: Catalase; C: Peroxidase; D: Peroxidação de lipídeos; E: Peróxido de hidrogênio; F: Eficiência fotoquímica do FS(II); G: Prolina. Letras iguais (maiúscula: entre sem e com fermento; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey ($n=3$).

6.5.3 EXPRESSÃO GÊNICA

Não houve diferença significativa para a expressão relativa aos genes *LIS1* e *GDS* para todos os níveis de ploidia (Figura 29).

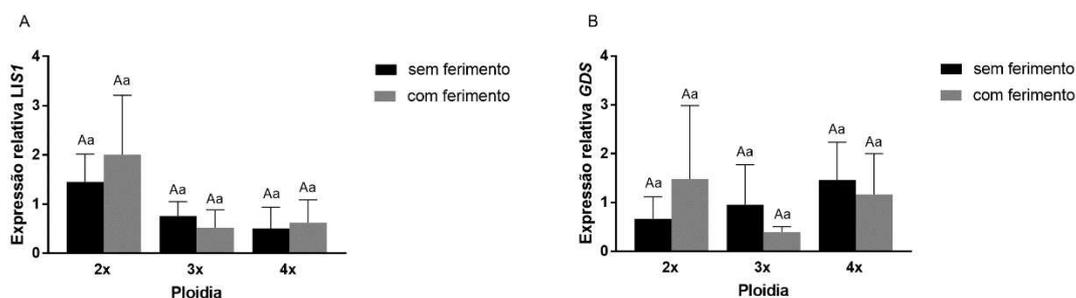


Figura 29- Expressão de genes relacionados à síntese de terpenos em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS sem e com ferimento. A: *LIS1* (S-linalol sintase) e B: *GDS* (geraniol desidrogenase) O gene *CIT* (citocromo b) foi usado como controle endógeno. Letras iguais (maiúscula: entre sem e com ferimento; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).

6.4.4 MICROEXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL

Os acessos não apresentaram diferenças significativas para os teores de linalol e citral analisados (Figuras 30 e 31).

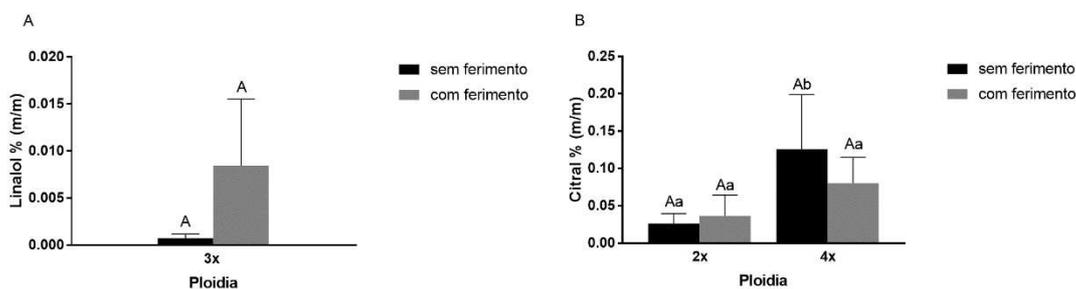


Figura 30- Componente majoritário do óleo essencial (% m/m) em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS sem e com ferimento. A: Linalol e B: Citral. Letras iguais (maiúscula: entre sem e com ferimento; minúscula: entre ploidias) acima da barra indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).

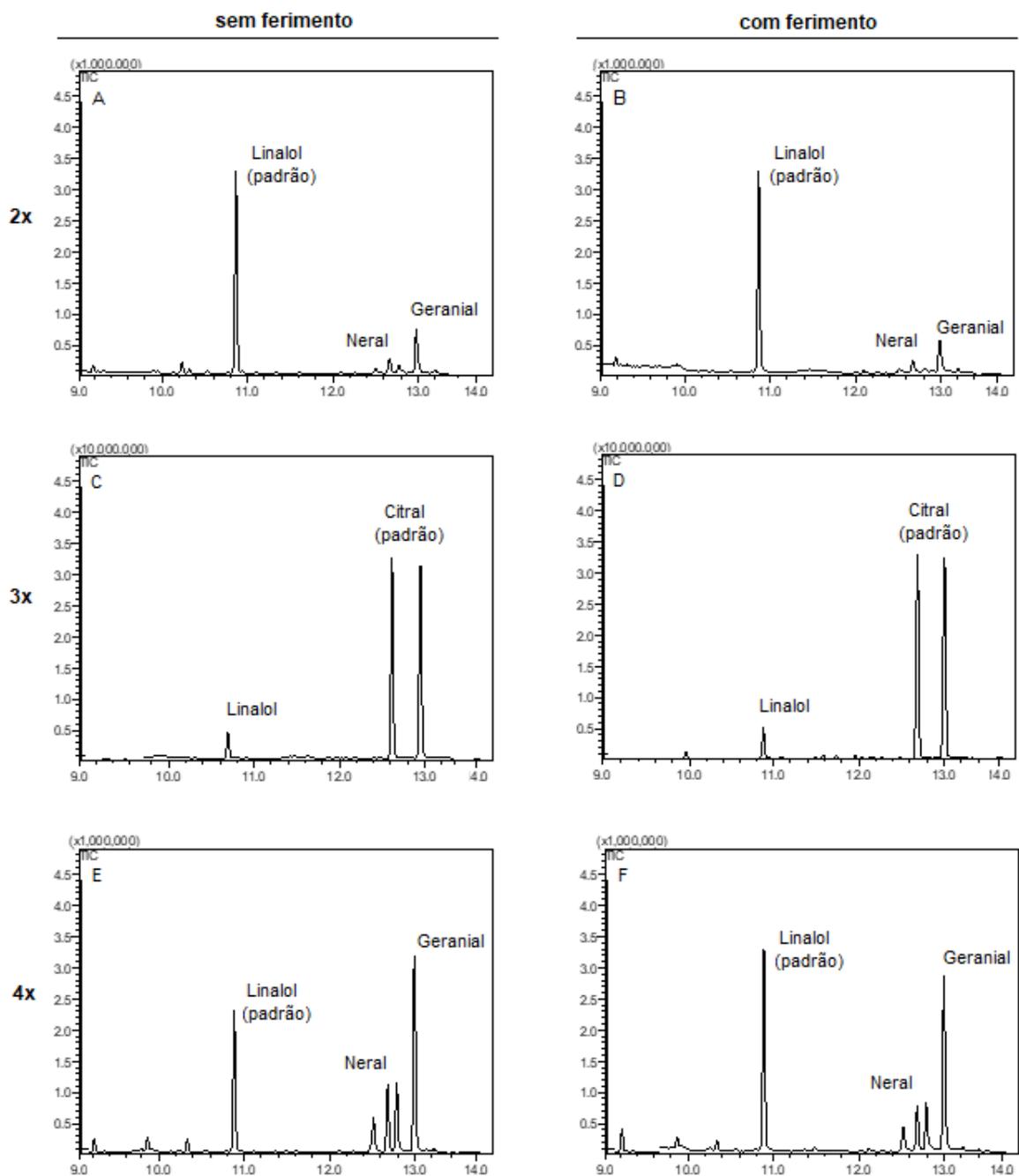


Figura 31- Perfil cromatográfico dos constituintes do óleo essencial em *L. alba*. Sem fermento (A: diploide; C: triploide; E: tetraploide); com fermento (B: diploide; D: triploide; F: tetraploide). Tempos de retenção: linalol (10,87), neral (12,68) e geranial (12,98).

6.6 RESULTADOS ESTRESSE TÉRMICO

Os acessos de *Lippia alba* (diploide, triploide e tetraploide) foram mantidos em sala de crescimento e submetidos a baixa temperatura (4°C) por 36 horas, completando 40 dias de cultivo *in vitro*. Como controle, os acessos foram mantidos na sala de crescimento (25°C). Em seguida, utilizaram-se parâmetros morfofisiológicos, quantificação de óleo essencial e expressão de genes relacionados à via de monoterpenos para avaliar o efeito do estresse.

6.6.1 ANÁLISE DE CRESCIMENTO

Os acessos diploide, triploide e tetraploide (Figura 32) não apresentaram diferenças significativas para as variáveis de crescimento analisadas (Figura 33).

Entretanto, o acesso triploide apresentou maior peso da massa fresca das folhas e massa fresca das raízes, quando comparado ao acesso diploide submetidos a 4°C (Figura 33 E e G).

O acesso tetraploide, apresentou maior comprimento da maior raiz, quando comparado aos acessos diploide e triploide, sob 25°C e 4°C (Figura 33 B). Além disso, também apresentou maior número de folhas, massa fresca total e massa fresca das raízes, quando comparado ao acesso diploide, sob 25°C e 4°C (Figura 33 D, E e G).

Os poliploides apresentaram maior massa fresca total (Figura 33 E), quando comparados ao acesso diploide, submetidos a baixa temperatura (4°C).

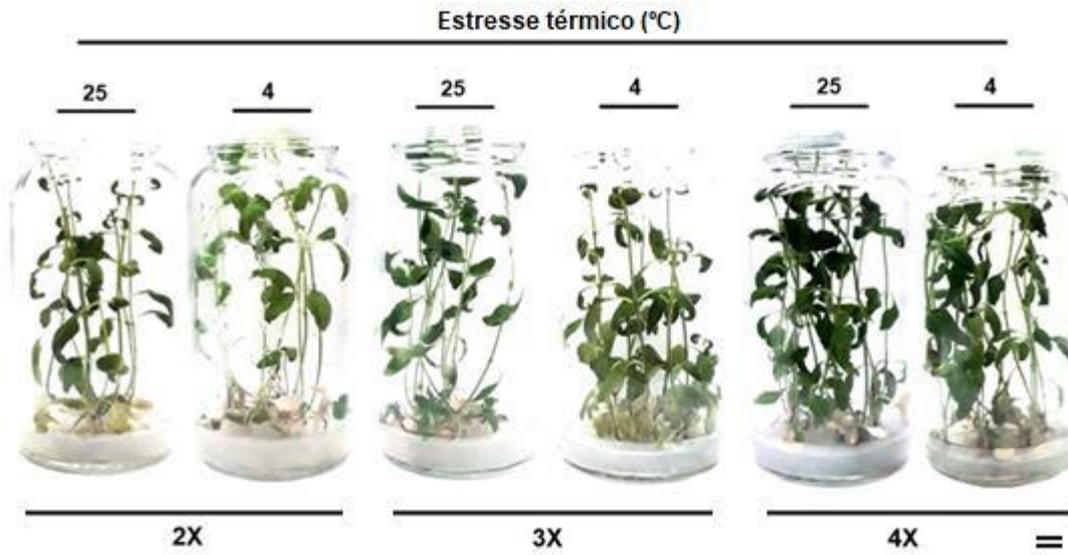


Figura 32- Acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS, sob 25°C e 4°C. Barra = 1cm.

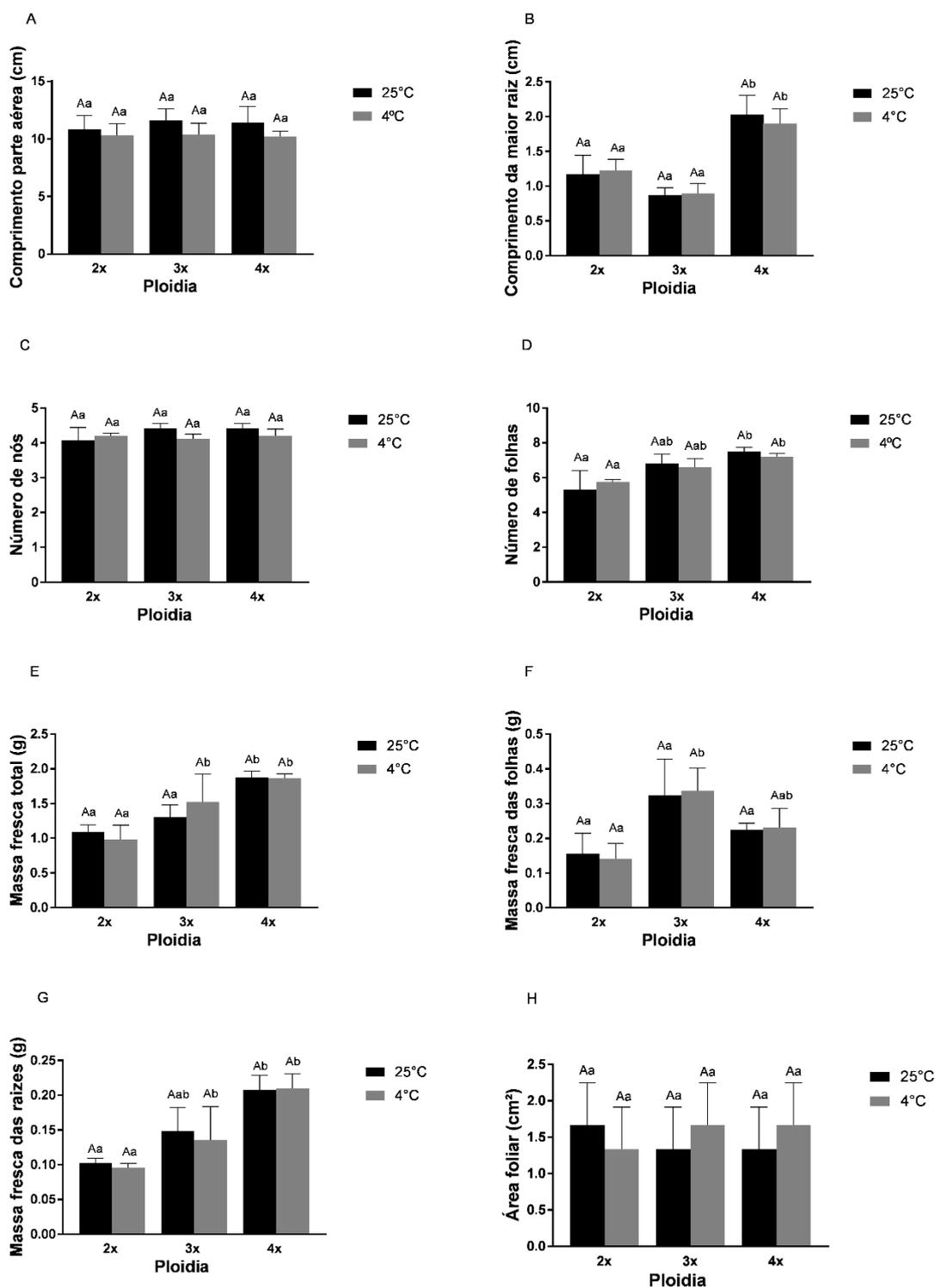


Figura 33- Variáveis de crescimento em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS sob 25°C e 4°C. A: Comprimento da parte aérea (cm); B: Comprimento da maior raiz (cm); C: Número de nós; D: Número de folhas; E: Massa fresca total (g); F: Massa fresca das folhas (g); G: Massa fresca das raízes (g) e H: Área foliar (cm²). Letras iguais (maiúscula: entre 25°C e 4°C; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey ($n=3$).

6.6.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS

O acesso diploide submetido a 4°C, revelou redução da eficiência fotoquímica do fotossistema II (Figura 34 F) apresentou maior produção de peroxidase comparado ao controle (25°C) e quando comparado aos poliploides (Figura 34 C). O teor de prolina foi maior no acesso diploide quando comparado aos demais níveis de ploidia na ausência e presença do estresse (Figura 34 G).

O acesso triploide apresentou maior produção de catalase, quando comparado ao acesso tetraploide, a 4°C (Figura 34 B).

O acesso tetraploide, sob 25°C e 4°C, apresentou maior eficiência fotoquímica do fotossistema II, quando comparado ao acesso diploide (Figura 34 F).

Os acessos poliploides não apresentaram diferenças significativas para as variáveis bioquímicas e fisiológicas analisadas, quando submetidos a 4°C (Figura 34). No entanto, observou-se maior eficiência fotoquímica do fotossistema II, quando comparados ao acesso diploide, submetidos a 4°C (Figura 34 F).

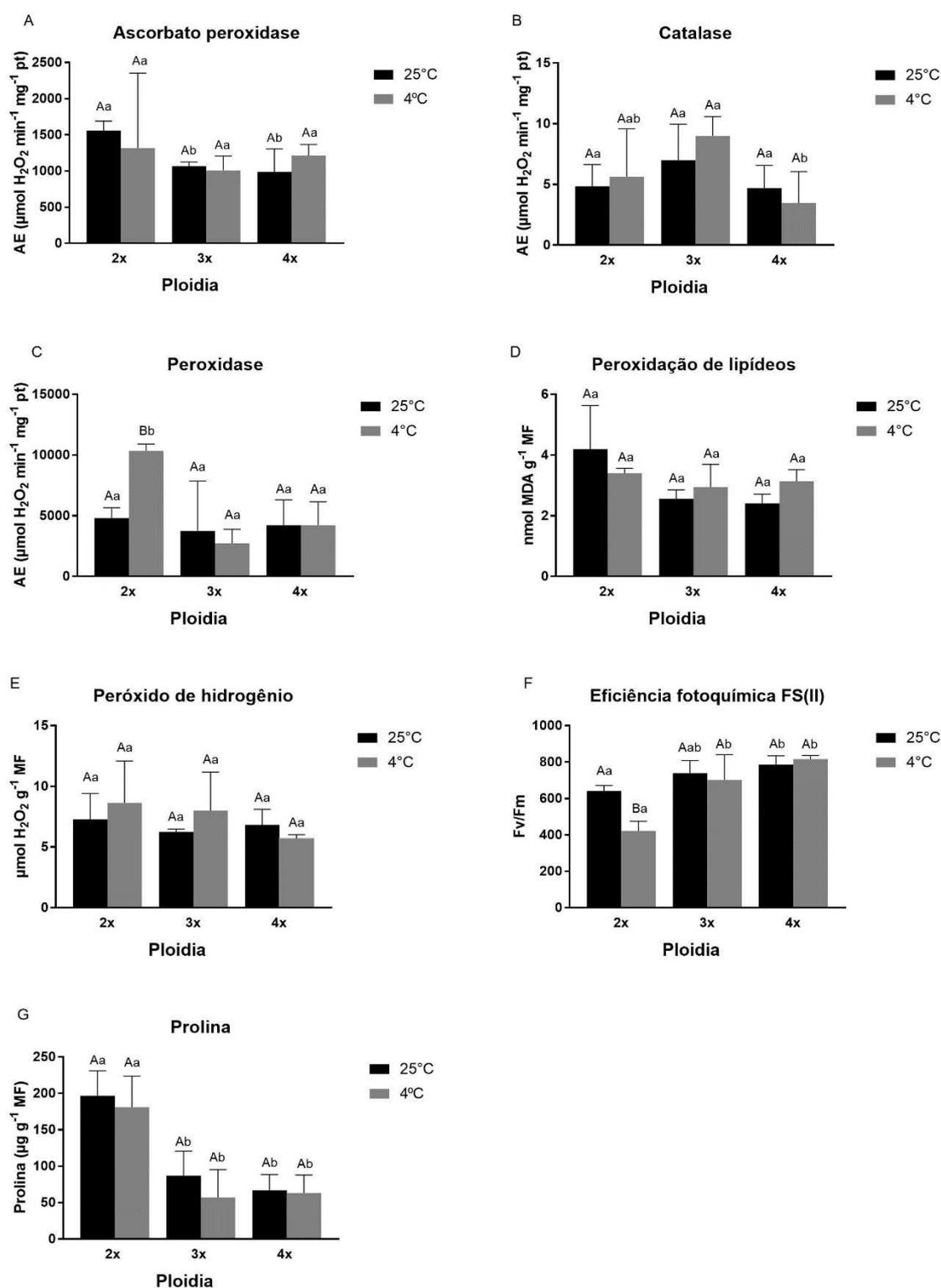


Figura 34- Análises bioquímicas e fisiológicas em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS sob 25°C e 4°C. A: Ascorbato peroxidase; B: Catalase; C: Peroxidase; D: Peroxidação de lipídeos; E: Peróxido de hidrogênio; F: Eficiência fotoquímica FS(II); G: Prolina. Letras iguais (maiúscula: entre 25°C e 4°C; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey ($n=3$).

6.6.3 EXPRESSÃO GÊNICA

Não houve diferença significativa para a expressão relativa aos genes *LIS1* e *GDS* para todos os níveis de ploidia (Figura 35). No entanto, a expressão relativa ao gene *GDS* no acesso tetraploide, mantido a 4°C, foi maior que acesso diploide também submetido ao estresse (Figura 35 B).

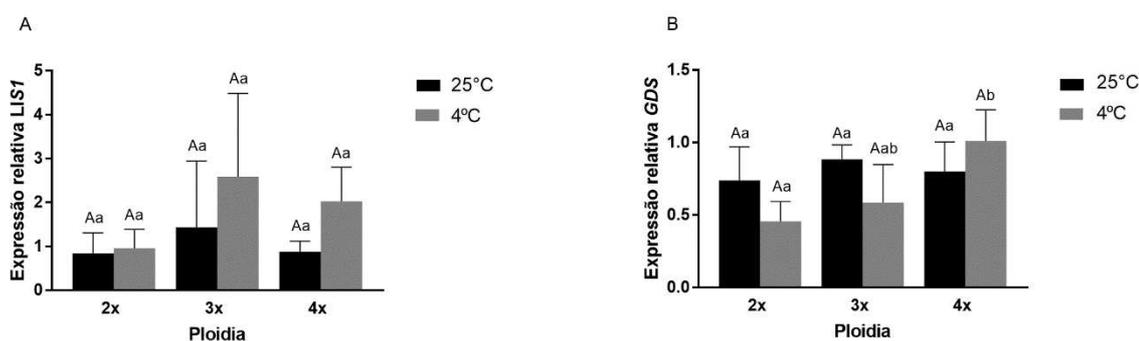


Figura 35- Expressão de genes relacionados à síntese de terpenos em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias in vitro em meio MS sob 25°C e 4°C. A: *LIS1* (S-linalol sintase) e B: *GDS* (geraniol desidrogenase) O gene *CIT* (citocromo b) foi usado como controle endógeno. Letras iguais (maiúscula: entre 25°C e 4°C; minúscula: entre ploidias) acima das barras indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).

6.6.4 MICROEXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL

Os acessos não apresentaram diferenças significativas para os teores de linalol e citral analisados, quando submetidos a 4°C (Figuras 36 e 37).

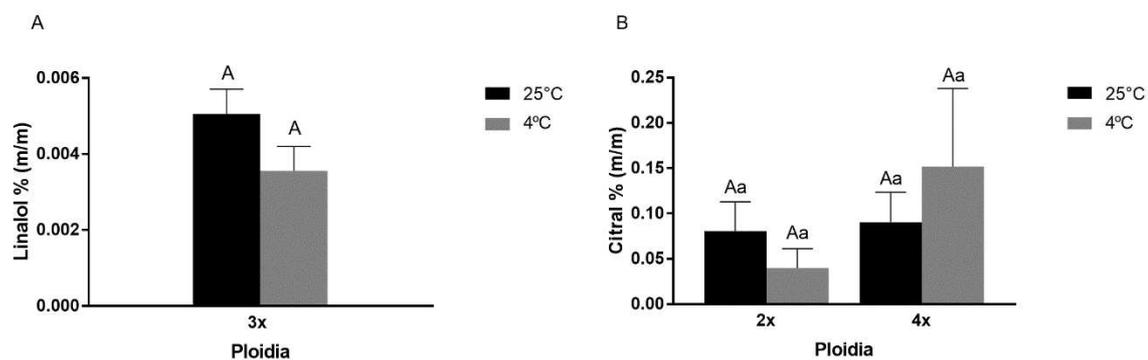


Figura 36- Componente majoritário do óleo essencial (% m/m) em acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) de *L. alba*, cultivados por 40 dias *in vitro* em meio MS sob 25°C e 4°C. A: Linalol e B: Citral. Letras iguais (maiúscula: entre 25°C e 4°C; minúscula: entre ploidias) acima da barra indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).

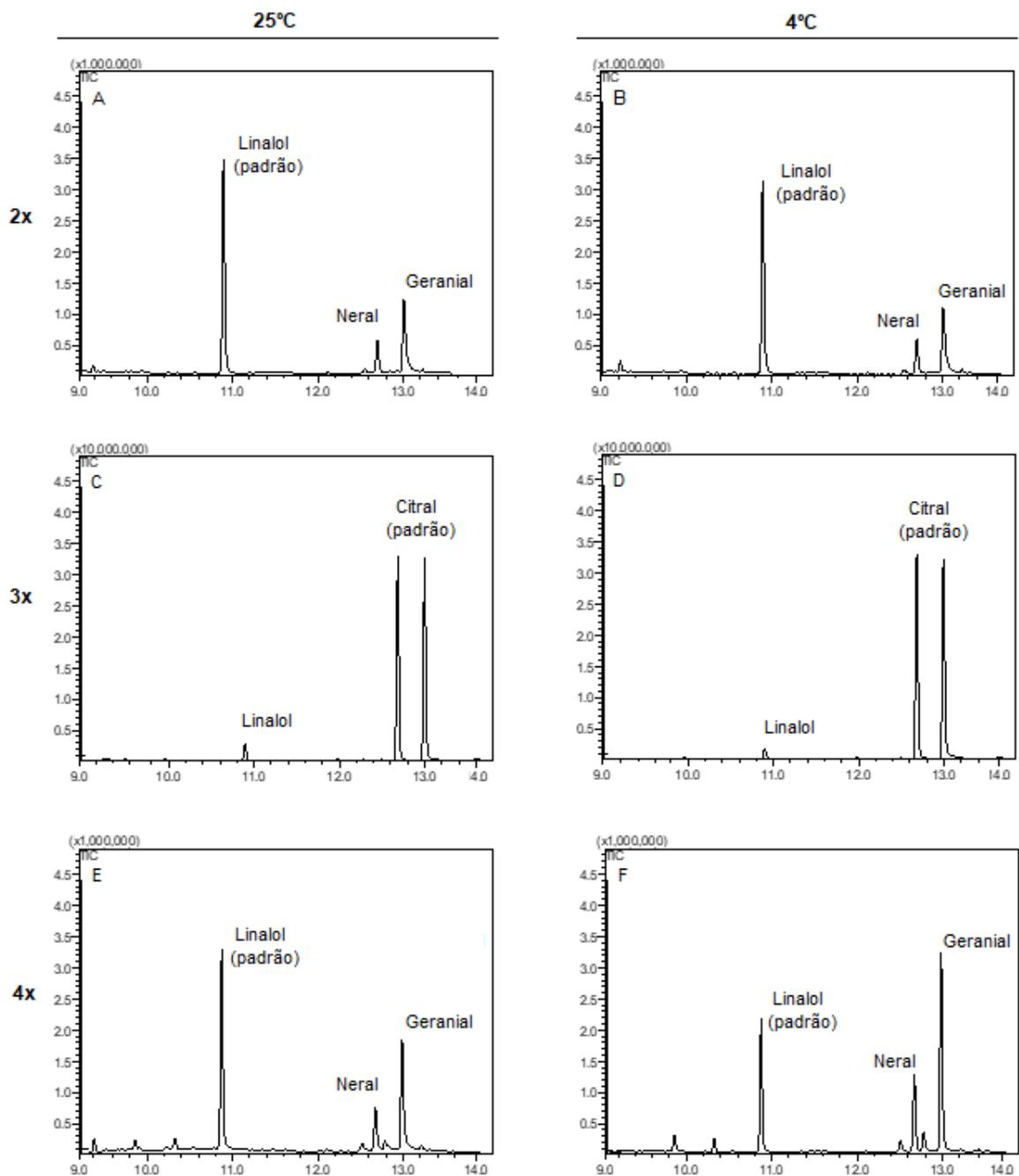


Figura 37- Perfil cromatográfico dos constituintes do óleo essencial em *L. alba*. 25°C (A: diploide; C: triploide; E: tetraploide); 4°C (B: diploide; D: triploide; F: tetraploide). Tempos de retenção: linalol (10,87), neral (12,68) e geranial (12,98).

7 RESULTADOS GENES DE REFERÊNCIA

Foram avaliados genes de referência para o acesso diploide (controle e tratado, em triplicata biológica) sob seis estresses e a análise se deu através dos programas BestKeeper, GeNorm, NormFinder e RefFinder.

7.1 BestKeeper

Pela ferramenta BestKeeper (Tabela 3), classificou-se o gene de referência mais recomendado para os estresses salino e hídrico como *NADH*. O gene *CIT* mostrou-se mais estável para os estresses por hormônios exógenos enquanto *TUB* e *RNApol* foram melhor avaliados para fermento e estresse térmico, tendo como base o melhor coeficiente de variação e desvio padrão.

O gene menos recomendado para os estresses salino e por ácido salicílico foi o *ELONG*. O gene *G6i* mostrou-se mais estável para os estresses hídrico e por ácido abscísico. Os genes *CIT* e *TUB* foram menos recomendados para fermento e estresse térmico, respectivamente, tendo como base o maior coeficiente de variação e desvio padrão.

Tabela 3- Valores de estabilidade da expressão de seis genes de referência candidatos em *L. alba* (2x) cultivado *in vitro*, sob estresses salino (0 e 60 mM NaCl); hídrico (0 e 1% PEG); hormônios exógenos (0 e 10 µM de ABA e AS); com e sem fermento e térmico (25°C e 4°C) pela ferramenta BestKeeper.

Estresses	Classificação					
	1	2	3	4	5	6
Salino	<i>NADH</i>	<i>CIT</i>	<i>G6i</i>	<i>TUB</i>	<i>RNApol</i>	<i>ELONG</i>
	1,93 ± 0,45	2,46 ± 0,42	4,25 ± 1,21	5,26 ± 1,46	7,56 ± 1,53	11,25 ± 3,24
Hídrico	<i>NADH</i>	<i>TUB</i>	<i>RNApol</i>	<i>ELONG</i>	<i>CIT</i>	<i>G6i</i>
	2,68 ± 0,55	2,12 ± 0,56	3,47 ± 0,67	3,23 ± 0,75	3,64 ± 0,79	3,63 ± 0,97
Ácido abscísico	<i>CIT</i>	<i>NADH</i>	<i>TUB</i>	<i>RNApol</i>	<i>ELONG</i>	<i>G6i</i>
	2,90 ± 0,79	4,00 ± 1,05	3,32 ± 1,06	4,62 ± 1,14	5,31 ± 1,52	5,53 ± 1,66
Ácido salicílico	<i>CIT</i>	<i>NADH</i>	<i>RNApol</i>	<i>G6i</i>	<i>TUB</i>	<i>ELONG</i>
	3,72 ± 0,87	4,73 ± 1,07	5,15 ± 1,08	4,62 ± 1,27	6,54 ± 1,71	12,86 ± 3,06
Ferimento	<i>TUB</i>	<i>NADH</i>	<i>ELONG</i>	<i>RNApol</i>	<i>G6i</i>	<i>CIT</i>
	2,76 ± 0,78	4,53 ± 1,03	4,56 ± 1,21	5,74 ± 1,23	5,73 ± 1,60	9,18 ± 2,16
Térmico	<i>RNApol</i>	<i>NADH</i>	<i>CIT</i>	<i>G6i</i>	<i>ELONG</i>	<i>TUB</i>
	1,09 ± 0,21	0,87 ± 0,21	1,43 ± 0,36	1,28 ± 0,37	1,97 ± 0,52	3,16 ± 0,91

* CV: coeficiente de variação; DP: desvio padrão.

7.2 GeNorm

Por meio da ferramenta Genorm (Tabela 4), estipulou-se o gene de referência *NADH* como o mais estável para os estresses salino, hormônios exógenos, fermento e térmico. Para o estresse hídrico, o gene recomendado foi o *TUB*. Ambas as recomendações foram baseadas no menor valor de estabilidade ($M < 1,5$).

O gene menos recomendado para os estresses salino e por ácido salicílico foi o *ELONG*, enquanto o gene *CIT* mostrou-se menos estável para os estresses hídrico e por fermento. O gene *G6i* foi menos recomendado para estresse por ácido abscísico e *TUB* para estresse térmico, tendo como base o valor ($M < 1,5$).

Tabela 4- Valores de estabilidade da expressão (M) de seis genes de referência candidatos em *L. alba* (2x) cultivado *in vitro*, sob estresses salino (0 e 60 mM NaCl); hídrico (0 e 1% PEG); hormônios exógenos (0 e 10 μ M de ABA e AS); com e sem fermento e térmico (25°C e 4°C) pela ferramenta GeNorm.

Estresses	Classificação					
	1	2	3	4	5	6
Salino	<i>NADH</i> 0,097	<i>CIT</i> 0,106	<i>G6i</i> 0,108	<i>TUB</i> 0,113	<i>RNApol</i> 0,147	<i>ELONG</i> 0,173
Hídrico	<i>TUB</i> 0,043	<i>NADH</i> 0,045	<i>RNApol</i> 0,047	<i>ELONG</i> 0,051	<i>G6i</i> 0,064	<i>CIT</i> 0,074
Ácido abscísico	<i>NADH</i> 0,054	<i>CIT</i> 0,063	<i>RNApol</i> 0,067	<i>TUB</i> 0,074	<i>ELONG</i> 0,075	<i>G6i</i> 0,098
Ácido salicílico	<i>NADH</i> 0,085	<i>TUB</i> 0,089	<i>G6i</i> 0,092	<i>CIT</i> 0,098	<i>RNApol</i> 0,107	<i>ELONG</i> 0,160
Ferimento	<i>NADH</i> 0,092	<i>TUB</i> 0,098	<i>RNApol</i> 0,104	<i>G6i</i> 0,125	<i>ELONG</i> 0,142	<i>CIT</i> 0,182
Térmico	<i>NADH</i> 0,032	<i>RNApol</i> 0,032	<i>CIT</i> 0,034	<i>G6i</i> 0,038	<i>ELONG</i> 0,048	<i>TUB</i> 0,056

7.3 NormFinder

Pela ferramenta NormFinder (Tabela 5), classificou-se o gene de referência *NADH* como o gene mais recomendado para os estresses salino, hormônios exógenos, fermento e térmico. Já o gene *TUB* teve melhor avaliação para o estresse hídrico, baseando-se nos menores valores de estabilidade calculados.

A melhor combinação de dois genes foi *NADH* e *TUB* para os estresses salino (0,009), hídrico (0,006), ácido salicílico (0,011) e fermento (0,008). Para o estresse por ácido abscísico os genes *CIT* e *NADH* (0,008) foram a melhor combinação e, para o estresse térmico os genes *NADH* e *RNApol* (0,005).

O gene menos recomendado para os estresses salino e por ácido salicílico foi o *ELONG*. O gene *CIT* apresentou maior variação para os estresses hídrico e fermento. O gene *G6i* foi o menos estável para estresse por ácido abscísico e o gene *TUB* para o estresse térmico.

Tabela 5- Valores de estabilidade da expressão de seis genes de referência candidatos em *L. alba* (2x) cultivado *in vitro*, sob estresses salino (0 e 60 mM NaCl); hídrico (0 e 1% PEG); hormônios exógenos (0 e 10 µM de ABA e AS); com e sem fermento e térmico (25°C e 4°C) pela ferramenta NormFinder.

Estresses	Classificação					
	1	2	3	4	5	6
Salino	<i>NADH</i> 0,009	<i>G6i</i> 0,015	<i>TUB</i> 0,016	<i>CIT</i> 0,017	<i>RNApol</i> 0,035	<i>ELONG</i> 0,037
Hídrico	<i>TUB</i> 0,008	<i>NADH</i> 0,010	<i>RNApol</i> 0,014	<i>ELONG</i> 0,017	<i>G6i</i> 0,020	<i>CIT</i> 0,022
Ácido abscísico	<i>NADH</i> 0,004	<i>CIT</i> 0,014	<i>RNApol</i> 0,021	<i>TUB</i> 0,025	<i>ELONG</i> 0,027	<i>G6i</i> 0,031
Ácido salicílico	<i>NADH</i> 0,017	<i>TUB</i> 0,021	<i>G6i</i> 0,032	<i>RNApol</i> 0,042	<i>CIT</i> 0,045	<i>ELONG</i> 0,071
Ferimento	<i>NADH</i> 0,021	<i>TUB</i> 0,022	<i>RNApol</i> 0,034	<i>G6i</i> 0,051	<i>ELONG</i> 0,053	<i>CIT</i> 0,061
Térmico	<i>NADH</i> 0,006	<i>RNApol</i> 0,006	<i>CIT</i> 0,009	<i>G6i</i> 0,010	<i>ELONG</i> 0,017	<i>TUB</i> 0,019

7.4 RefFinder

A ferramenta RefFinder (Tabela 6), possui quatro algoritmos de análise (BestKeeper, GeNorm, NormFinder e ΔCT), cuja classificação geral evidenciou o gene de referência *NADH* como o gene mais recomendado para os estresses salino, hormônios exógenos, fermento e térmico. O gene *TUB* foi o mais estável para o estresse hídrico, baseando-se na média de todos os valores de estabilidade calculados.

Os genes menos recomendados de acordo com a classificação geral da ferramenta, foram: *ELONG* para os estresse salino e por ácido salicílico; *CIT* para os estresses hídrico e fermento; *G6i* para estresse por ácido abscísico e o gene *TUB* para estresse térmico.

Tabela 6- Valores de estabilidade da expressão de seis genes de referência candidatos em *L. alba* (2x) cultivado *in vitro*, sob estresses salino (0 e 60 mM NaCl); hídrico (0 e 1% PEG); hormônios exógenos (0 e 10 µM de ABA e AS); com e sem fermento e térmico (25°C e 4°C) e recomendação geral, pela ferramenta RefFinder.

Método	Classificação					
	1	2	3	4	5	6
Estresse salino						
BestKeeper	<i>NADH</i>	<i>CIT</i>	<i>G6i</i>	<i>TUB</i>	<i>ELONG</i>	<i>RNApol</i>
GeNorm	<i>CIT</i>	<i>NADH</i>	<i>G6i</i>	<i>RNApol</i>	<i>TUB</i>	<i>ELONG</i>
Normfinder	<i>NADH</i>	<i>TUB</i>	<i>G6i</i>	<i>CIT</i>	<i>RNApol</i>	<i>ELONG</i>
ΔCT	<i>NADH</i>	<i>CIT</i>	<i>G6i</i>	<i>TUB</i>	<i>RNApol</i>	<i>ELONG</i>
Recomendação	<i>NADH</i>	<i>CIT</i>	<i>G6i</i>	<i>TUB</i>	<i>RNApol</i>	<i>ELONG</i>
Estresse hídrico						
BestKeeper	<i>TUB</i>	<i>NADH</i>	<i>RNApol</i>	<i>CIT</i>	<i>ELONG</i>	<i>G6i</i>
GeNorm	<i>RNApol</i>	<i>TUB</i>	<i>ELONG</i>	<i>NADH</i>	<i>G6i</i>	<i>CIT</i>
Normfinder	<i>NADH</i>	<i>TUB</i>	<i>RNApol</i>	<i>ELONG</i>	<i>G6i</i>	<i>CIT</i>
ΔCT	<i>NADH</i>	<i>TUB</i>	<i>RNApol</i>	<i>ELONG</i>	<i>G6i</i>	<i>CIT</i>
Recomendação	<i>TUB</i>	<i>NADH</i>	<i>RNApol</i>	<i>ELONG</i>	<i>G6i</i>	<i>CIT</i>
Estresse por ácido abscísico						
BestKeeper	<i>NADH</i>	<i>RNApol</i>	<i>CIT</i>	<i>TUB</i>	<i>ELONG</i>	<i>G6i</i>
GeNorm	<i>CIT</i>	<i>NADH</i>	<i>TUB</i>	<i>RNApol</i>	<i>ELONG</i>	<i>G6i</i>
Normfinder	<i>NADH</i>	<i>CIT</i>	<i>RNApol</i>	<i>TUB</i>	<i>ELONG</i>	<i>G6i</i>
ΔCT	<i>NADH</i>	<i>CIT</i>	<i>RNApol</i>	<i>TUB</i>	<i>ELONG</i>	<i>G6i</i>
Recomendação	<i>NADH</i>	<i>CIT</i>	<i>RNApol</i>	<i>TUB</i>	<i>ELONG</i>	<i>G6i</i>
Estresse por ácido salicílico						
BestKeeper	<i>CIT</i>	<i>RNApol</i>	<i>NADH</i>	<i>G6i</i>	<i>TUB</i>	<i>ELONG</i>
GeNorm	<i>CIT</i>	<i>RNApol</i>	<i>NADH</i>	<i>G6i</i>	<i>TUB</i>	<i>ELONG</i>
Normfinder	<i>NADH</i>	<i>TUB</i>	<i>G6i</i>	<i>RNApol</i>	<i>CIT</i>	<i>ELONG</i>
ΔCT	<i>NADH</i>	<i>G6i</i>	<i>RNApol</i>	<i>TUB</i>	<i>CIT</i>	<i>ELONG</i>
Recomendação	<i>NADH</i>	<i>RNApol</i>	<i>CIT</i>	<i>G6i</i>	<i>TUB</i>	<i>ELONG</i>
Estresse por fermento						
BestKeeper	<i>TUB</i>	<i>NADH</i>	<i>RNApol</i>	<i>ELONG</i>	<i>G6i</i>	<i>CIT</i>
GeNorm	<i>NADH</i>	<i>RNApol</i>	<i>TUB</i>	<i>G6i</i>	<i>ELONG</i>	<i>CIT</i>
Normfinder	<i>NADH</i>	<i>TUB</i>	<i>RNApol</i>	<i>G6i</i>	<i>ELONG</i>	<i>CIT</i>
ΔCT	<i>NADH</i>	<i>RNApol</i>	<i>TUB</i>	<i>G6i</i>	<i>ELONG</i>	<i>CIT</i>
Recomendação	<i>NADH</i>	<i>RNApol</i>	<i>TUB</i>	<i>G6i</i>	<i>ELONG</i>	<i>CIT</i>
Estresse térmico						
BestKeeper	<i>RNApol</i>	<i>NADH</i>	<i>ELONG</i>	<i>G6i</i>	<i>CIT</i>	<i>TUB</i>
GeNorm	<i>CIT</i>	<i>NADH</i>	<i>RNApol</i>	<i>G6i</i>	<i>ELONG</i>	<i>TUB</i>
Normfinder	<i>NADH</i>	<i>RNApol</i>	<i>CIT</i>	<i>G6i</i>	<i>ELONG</i>	<i>TUB</i>
ΔCT	<i>NADH</i>	<i>RNApol</i>	<i>CIT</i>	<i>G6i</i>	<i>ELONG</i>	<i>TUB</i>
Recomendação	<i>NADH</i>	<i>RNApol</i>	<i>CIT</i>	<i>G6i</i>	<i>ELONG</i>	<i>TUB</i>

8 EXPRESSÃO GÊNICA GENES DE REFERÊNCIA

A expressão relativa ao gene *TUB*, não apresentou variações entre os acessos diploides normalizados com *NADH* e *ELONG*, sob estresse salino. No entanto, a expressão relativa ao gene *TUB* na ausência de NaCl foi maior, quando a normalização foi realizada com o gene *ELONG* (Figura 38 A). Para o estresse hídrico, a expressão relativa ao gene *RNApol*, não apresentou variações entre os acessos diploides normalizados com *TUB* e *CIT*. No entanto, a expressão relativa ao gene *RNApol*, para ambos os tratamentos (0 e 1% PEG) foi maior quando normalizado com *CIT* (Figura 38 B).

Sob estresse por ácido abscísico, a expressão relativa ao gene *TUB*, não apresentou variações entre os acessos diploides normalizados com *NADH* e *G6i*, sob efeito do ácido abscísico. No entanto, a expressão relativa do gene *TUB* na ausência de ABA foi maior, quando foi realizada a normalização com o gene *NADH* (Figura 38 C). A expressão relativa ao gene *G6i*, não apresentou variações entre os acessos diploides normalizados com *NADH* e *ELONG* sob estresse com ácido salicílico (Figura 38 D).

Sob estresse por ferimento, a expressão relativa ao gene *RNApol*, não apresentou variações entre os acessos diploides normalizados com *NADH* e *CIT* (Figura 38 E). A expressão relativa ao gene *G6i*, não apresentou variações entre os acessos diploides normalizados com *NADH* e *TUB*, quando sob estresse térmico (Figura 38 F).

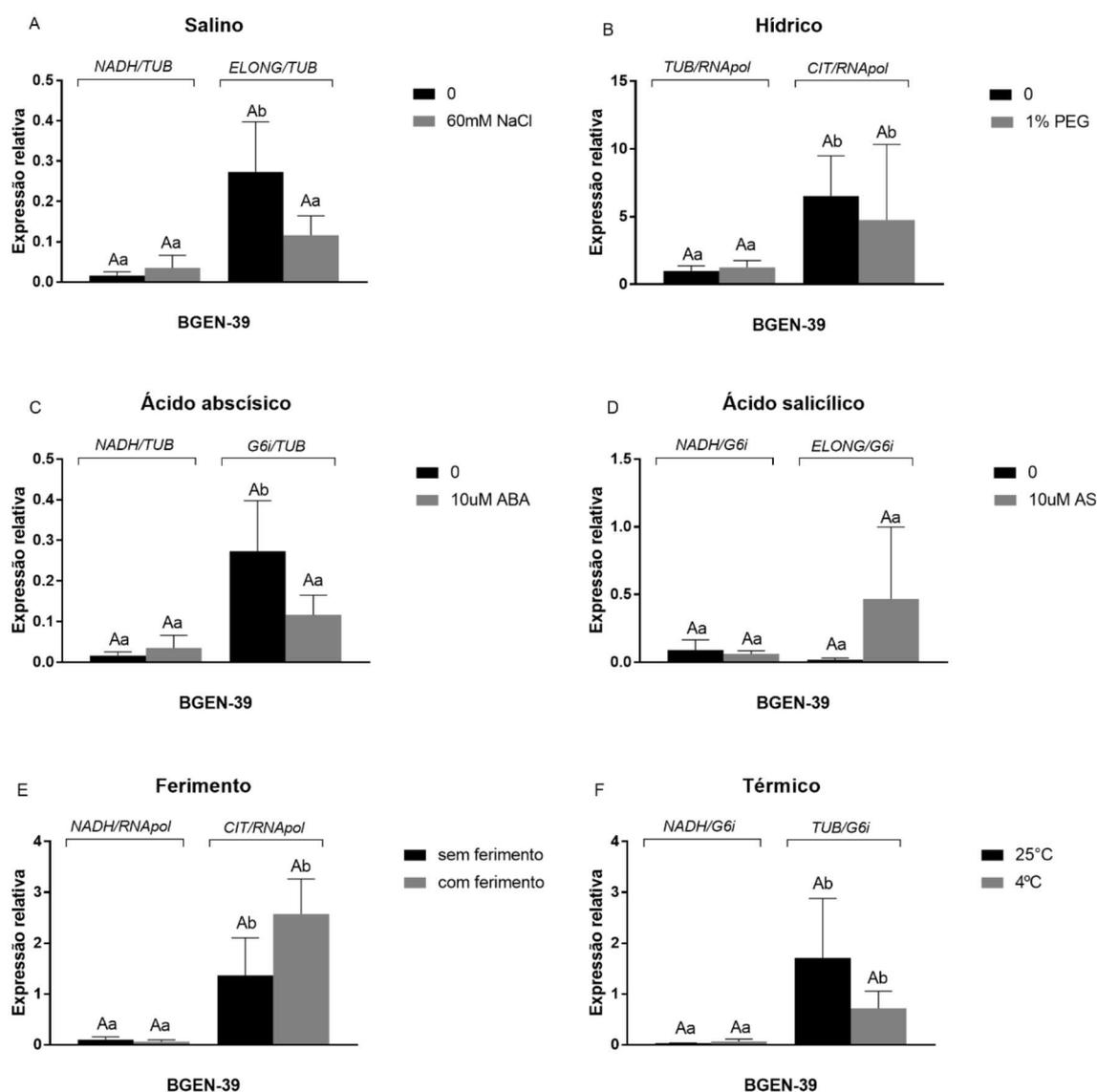


Figura 38- Expressão relativa aos genes *TUB* (salino e ABA); *RNApol* (hídrico e ferimento) e *G6i* (AS e térmico) em *L. alba* (2x-BGEN-39), cultivada por 40 dias *in vitro*. Os genes *NADH* e *ELONG* (salino e AS); *TUB* e *CIT* (hídrico); *NADH* e *G6i* (ABA); *NADH* e *CIT* (ferimento) e *NADH* e *TUB* (térmico) foram tomados como genes referência separadamente. Letras iguais (maiúscula: entre mesma ploidia; minúscula: entre ploidias) acima da barra indicam diferença não significativa a 5% ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student ($n=3$).

9 DISCUSSÃO

Estresses abióticos promovem alterações no desenvolvimento e rendimento das plantas, principalmente devido à sua condição sésbil (GONG et al., 2020). Os estresses salino e hídrico provocaram diminuição do comprimento da parte

aérea, do número de folhas e da massa fresca das folhas para o acesso diploide. Além disso, o estresse hídrico também reduziu o comprimento da parte aérea para os poliploides.

Resultados semelhantes foram encontrados para *L. alba* cultivada *in vitro* sob estresse salino, como a redução da massa fresca total e do comprimento da parte aérea (CASTRO et al., 2020) e diferentes concentrações de PEG (1, 2 e 3%), também mostrou redução da massa fresca total e da área foliar (CASTRO et al., 2020a). *Lippia gracilis* também apresentou redução de biomassa quando foram irrigadas com água contendo diferentes concentrações de sal (91,59 e 122,12 mM NaCl) (OLIVEIRA et al., 2019). Em tomilho cultivado *in vitro*, sob concentração de 8% de PEG, também houve diminuição do tamanho da parte aérea e da raiz (RAZAVIZADEH et al., 2019), corroborando os resultados encontrados. Níveis elevados de sais solúveis, principalmente o cloreto de sódio, provocam redução do desenvolvimento vegetal devido ao estresse oxidativo causado pelo desbalanço iônico e/ou osmótico (SCHOSSLER et al., 2012; MOUSAVI et al., 2019).

Sob estresse hídrico houve também uma redução da área foliar para o acesso diploide; do número de nós, de folhas e área foliar para o acesso triploide e também redução da massa fresca das folhas para os acessos poliploides. Sabe-se que o polietilenoglicol (PEG), pode causar efeito inibitório no desenvolvimento em geral das plantas, devido à limitação hídrica e estresse osmótico causado pela diminuição da pressão de turgor celular. Assim, as raízes fornecem menos água para a parte aérea, principalmente para as folhas, resultando em menor crescimento, expansão foliar e limitação fotossintética (RAZAVIZADEH et al., 2019).

Sob estresse salino, também houve consequente diminuição do números de nós para o acesso diploide e aumento no comprimento da maior raiz para o acesso triploide. Em tomates, o crescimento das raízes sob estresse salino (100 mM NaCl), foi associado a respostas induzidas por auxina e redes regulatórias de genes (MERCHAN et al., 2007) e em poliploide de *Brassica napus*, o aumento de 20% da área de superfície radicular pode ter ocorrido, para uma melhor absorção de água e nutrientes, permitindo a adaptação da planta sob condições de estresse salino (100 mM NaCl) (ARIF et al., 2019).

A salinidade pode modificar a anatomia radicular e influenciar a modulação da razão raiz/parte aérea, podendo ser uma resposta relacionada a fatores associados

ao efeito osmótico (HSIAO, XU, 2000; FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2014; ACOSTA-MOTOS et al., 2017). Assim, uma maior proporção de raízes sob estresse salino é uma forma de reter íons tóxicos neste órgão, controlando sua translocação para a parte aérea (CASSANITI et al., 2009).

Os estresses por ABA, AS, ferimento e térmico, não promoveram diferenças significativas dentro dos níveis de ploidia. Para ABA e AS, sugere-se aumentar a concentração e também realizar estudos em correlação a estresses abióticos, promovendo tolerância, participando da regulação de processos fisiológicos como a síntese de proteínas, transpiração e fotossíntese (MUTLU et al., 2016; KHALIL et al., 2018).

Segundo Sato et al., (2001), a aplicação exógena de ABA pode estar envolvida no controle do desenvolvimento. Os autores observaram, em mandioca, redução do comprimento da parte aérea, tamanho e número das raízes, perda de folhas iniciais e menor número de folhas, na presença de ABA, sob diferentes concentrações de ácido abscísico (0,1, 1 e 10 mg/L) e Cultura de raízes de *Salvia miltiorrhiza* sob concentrações de 2% PEG e 200 μ M de ABA, reduziram significativamente o crescimento e aumentaram a produção de tanshinona, oriunda do metabolismo secundário (YANG et al., 2012).

A aplicação foliar de AS (10^{-5} M) em *Catharanthus roseus* reduziu o efeito prejudicial da salinidade no crescimento das plantas (50, 100 e 150 mM de NaCl) (IDREES et al., 2011). Para erva-doce em condições de campo (HASHMI et al., 2012), o crescimento da parte aérea e raízes, além do peso fresco das plantas foi aumentado, quando borrifado com solução contendo 100 μ M de AS exógeno nas folhas, associando seus efeitos regulatórios na divisão celular.

Já para ferimento e térmico, sugere-se aumentar o tempo de exposição aos estresses. O ferimento em *Arabidopsis thaliana* foi aplicado a cada 12 horas, durante um total de quatro dias e oito feridas por planta. Observaram que após o ferimento, houve realocação de jasmonato endógeno através do floema, provocando alteração nas raízes (SCHULZE et al., 2019). Plantas de *Stevia rebaudiana* foram cultivadas *in vitro* e incubadas a 5°C durante o período de 30 dias, aumentando a massa e a área foliares (HAJIHASHEMI et al., 2018).

Para a maioria das variáveis de crescimento analisadas de todos os estresses abióticos aplicados e entre os níveis de ploidia, os acessos poliploides,

principalmente o tetraploide, evidenciaram maior vigor e tolerância quando comparados ao acesso diploide, na ausência e/ou presença dos estresses. Sabe-se que as plantas poliploides podem apresentar uma maior tolerância, tendo mais sucesso do que seus parentais diploides na colonização e perpetuação em novos ambientes, sendo eles antropizados ou que apresentem estresses bióticos e/ou abióticos. (STEBBINS, 1971; SOLTIS e SOLTIS, 2000; SOLTIS et al., 2010; IANNICELLI et al., 2020). Assim, a duplicação genômica promove vantagem adaptativa e efeito de tamponamento genético (SOLTIS et al., 2010; RAMSEY, 2011; BEEST ET AL., 2012; HOLLISTER, 2014; SHMEIT et al., 2020). Autopoliploides podem apresentar maior vigor quando comparados aos diploides, devido ao aumento do material genético nas células e, como consequência, o tamanho dos órgãos e de toda a planta pode ser aumentado (LAVANIA, 2013; IANNICELLI et al., 2020).

Em poliploides de citrus sob 50 mM de NaCl (SALEH et al., 2008) e sorgo sob 150 mM NaCl (CECCARELLI et al., 2006), foi observada maior tolerância a altas concentrações de sal, como resposta adaptativa ao estresse. Tu et al. (2014) observaram em arroz cultivado *in vitro* que o tetraploide apresentou um crescimento da raiz mais rápido e maior que o diploide, sugerindo que a poliploidia pode influenciar no aumento da tolerância ao estresse salino (150 mM NaCl). Em poliploides induzidos de *Coccinia palmata* e *Lagenaria sphaerica* com limitação hídrica de rega, apresentaram maior resistência à seca em comparação com as plantas diploides parentais (NTULI e ZOBOLO, 2008).

Além de influenciar no crescimento, estresses abióticos desencadeiam uma resposta por EROs que danificam as células. Para evitar os danos causados pela interação dos mesmos com o DNA, proteínas e lipídios, promovem sinalização e produção de componentes enzimáticos como a catalase, peroxidase, entre outros (KAUR e ASTHIR, 2015; CHOUDHURY et al., 2017) e não enzimáticos, como o aminoácido prolina, com alto poder redutor, podendo também manter a homeostase celular da água (osmoprotetor) (MORENO-GALVÁN et al, 2020).

O estresse salino provocou aumento da produção de ascorbato peroxidase e peróxido de hidrogênio para o acesso diploide. Além disso, para o mesmo acesso, os estresses salino e hídrico promoveram aumento de catalase e salino e térmico provocaram aumento de peroxidase, evidenciando que as enzimas antioxidantes

desempenham importante papel no controle do estresse oxidativo e adaptação aos estresses para o acesso diploide, sugerindo plasticidade fisiológica.

O cloreto de sódio acumulado, leva a uma diminuição da atividade dos estômatos e da cadeia transportadora de elétrons, causando excesso de espécies reativas de oxigênio (SHELKE et al., 2019). Em soja a 100 mM NaCl (SHELKE et al., 2019) e grão-de-bico (25, 50 e 100 mM NaCl) (RASOOL et al., 2013), também houve aumento da atividade de enzimas antioxidantes, sugerindo presença de estresse oxidativo e tentativa de controle para o mesmo. Já o estresse hídrico por PEG, resulta em alterações osmóticas e limitação hídrica, proporcionando a formação de EROs. Razavizadeh et al., (2019), também observaram aumento na produção de enzimas antioxidantes em tomilho sob estresse hídrico (4%).

Os mecanismos de defesa contra o estresse térmico (baixas temperaturas) são complexos, no entanto, sabe-se que um dos principais é o sistema antioxidante (MUTLU et al., 2016). Em cevada, também foi observado aumento da atividade de POX sob estresse por baixas temperaturas (7/5°C) (MUTLU et al., 2016) e em fava a 2°C (ZHOU et al., 2018) e Stevia a 5°C (HAJIHASHEMI et al., 2018), observou-se o mesmo, corroborando com os resultados encontrados a 4°C.

Os estresses salino, hídrico e ferimento, diminuíram a eficiência fotoquímica do fotossistema II no acesso triploide. A acumulação de EROs pode levar ao estresse oxidativo no processo fotossintético (RAZAVIZADEH et al., 2019). Além disso, para o acesso diploide também houve redução da eficiência fotoquímica do fotossistema II sob estresse térmico.

A diminuição da eficiência fotoquímica do FSII é um indicativo de estresse (ACOSTA-MOTOS et al., 2017). Plantas de rúcula a 100 mmol/L NaCl (HNILIČKOVÁ et al., 2017) e arroz a 50, 100, 150 mM NaCl (TSAI et al., 2019) sob estresse salino, também apresentaram diminuição da eficiência fotoquímica do FSII. Plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas em estufa, foram regadas com 15% de PEG-6000 e foram realizadas análises da eficiência fotoquímica do fotossistema II, onde observaram diminuição sob estresse (GURURANI et al., 2017). Sabe-se que a ferida, como fator de estresse, leva à produção de radicais livres e pode afetar a eficiência fotossintética (LUKASZUK et al., 2017; LI et al., 2018). O ferimento mecânico em *Arabidopsis thaliana*, também causou diminuição da razão Fv/Fm (LUKASZUK et al., 2017). Em *Stevia rebaudiana*, a 5 ± 1°C por 30 dias, houve diminuição do rendimento

quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm) em todas as cultivares (HAJIHASHEMI et al., 2018).

Para os demais estresses e níveis de ploidia, onde não há efeito significativo observado, sugere-se tolerância para os processos bioquímicos e fisiológicos. Como exemplo, os estresses por ABA e AS aplicados, que para testar os efeitos de hormônios exógenos em *L. alba in vitro*, sugere-se aumentar a concentração dos mesmos. No entanto, o ácido salicílico, foi capaz de ativar a síntese de enzimas antioxidantes, sendo eficaz no ajuste osmótico, como foi observado em arroz cultivado em hidroponia e solo (0.5 e 1 mmol/L de AS) por Sohag et al., (2020) e trigo cultivado em vasos, sob 5 e 10 mM de AS pulverizados (SAHU e SABAT, 2011). Em *Triticum aestivum* cultivado em vasos, concentrações de ABA (0,5 e 1,0 mM) e SA (1,0 e 2,0 mM) foram pulverizadas, sendo que ambas aumentaram as atividades de ascorbato peroxidase, catalase, entre outros, em comparação com plantas controle não pulverizadas (AGARWAL et al., 2005).

O acúmulo de prolina é uma resposta de ajuste osmótico e redutor, mantendo as estruturas subcelulares seguras da oxidação, que pode ocorrer com o acúmulo de radicais livres devido à aplicação de estresse (MORENO-GALVÁN et al., 2020). Os estresses hídrico e ABA promoveram o aumento de prolina para todos os níveis de ploidia. Além disso, o estresse por AS, aumentou o teor de prolina para o acesso tetraploide. Para ambos os resultados, sugere-se algum nível de ajuste osmótico ou aumento de EROs. Sabe-se que o PEG induz estresse osmótico e, portanto, aumenta o teor de prolina (osmoprotetor) (RAZAVIZADEH et al., 2019). Em feijão-caupi (ZEGAUI et al., 2017) e *Salvia nemerosa* (BAYAT e MOGHADAM, 2019) o estresse hídrico por interrupção de rega provocou aumento do teor de prolina.

De maneira geral, ambos os estresses aplicados promoveram menor teor de prolina para os poliploides quando comparados ao acesso diploide, na ausência de estresse, sugerindo maior tolerância, o mesmo ocorreu para poliploides sob os estresses hídrico (Fv/Fm), ABA (APX, POD e peróxido de hidrogênio), ferimento (APX, peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio) e térmico (APX), em que apresentaram menor produção das variáveis analisadas, quando comparados aos acesso diploide.

Isso pode evidenciar, mais uma vez, que os poliploides têm seu metabolismo menos influenciado por estresses abióticos. A duplicação genômica não leva necessariamente ao aumento da produção de metabólitos idênticos aos

presentes no diploide. Sabe-se que poliploides podem apresentar maior diversidade de enzimas e outros metabólitos, quando comparados ao diploide, devido à mudanças complexas em rotas bioquímicas e fisiológicas (LÓPEZ-PUJOL et al., 2004; BADUEL et al., 2018; IANNICELLI et al., 2020).

A peroxidação lipídica não apresentou alteração sob todos os estresses aplicados, o que pode ser consequência da maior atividade antioxidante, protegendo a membrana celular (GOLKAR e TAGHIZADEH, 2018).

O metabolismo secundário também pode apresentar modulação (LUCHO et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019). O acesso diploide apresentou aumento da expressão relativa a *LIS1* e *GDS* como resposta ao estresse salino. O acesso triploide apresentou aumento da expressão gênica relativa de *LIS1* sob estresse hídrico, assim, o PEG permitiu aumentar a produção de linalol frente à restrição hídrica. BATISTA et al., (2016), observaram aumento da expressão relativa de geraniol em acessos diploide e triploide de *L. alba*. Além disso, observaram aumento de linalol/nerolidol em acesso triploide de *L. alba*, quando estressados por diferentes concentrações de CO₂.

O acesso tetraploide evidenciou uma redução na expressão relativa ao gene *LIS1* sob estresse hídrico e por ácido salicílico. Como o acesso tetraploide produz majoritariamente o composto citral, esses resultados evidenciam que a produção de linalol pelo mesmo, não foi alterada pelas condições de cultivo, mantendo-se em níveis baixos mesmo sob estresse. Em *Ginkgo biloba*, solução borrifada com diferentes concentrações de AS (0.5, 1, e 2 mmol/L), promoveram modulação da expressão de genes envolvidos na via biossintética de terpeno-lactona, aumentando sua produção (YE et al., 2020).

No entanto, para o gene *GDS* sob estresse térmico, o acesso tetraploide apresentou maior expressão quando comparado ao acesso diploide. Os poliploides podem apresentar complexidade de redes regulatórias de genes sob variações ambientais (IANNICELLI et al., 2020) e modulação de óleo essencial (SHAKYA et al., 2019), tornando difícil a interpretação de relações diretas entre a expressão de genes e os componentes do metabolismo secundário (LAVANIA et al., 2012).

Sabe-se que em condições não estressantes, as plantas produzem óleos essenciais constitutivamente (BATISTA et al., 2017a) em pequenas quantidades, corroborando os dados encontrados quando o estresse não foi aplicado no presente

trabalho e também quando não foi possível observar diferenças significativas para os níveis de ploidia sob os estresses salino (triploide e tetraploide para os genes *LIS1* e *GDS*), hídrico (diploide para o gene *LIS1* e todos os níveis de ploidia para o gene *GDS*), ácido abscísico (todos os níveis de ploidia para os genes *LIS1* e *GDS*), ácido salicílico (diploide e triploide para o gene *LIS1* e todos os níveis de ploidia para o gene *GDS*), fermento (todos os níveis de ploidia para os genes *LIS1* e *GDS*), térmico (todos os níveis de ploidia para os genes *LIS1* e *GDS*).

Outros estudos também identificaram baixos níveis de expressão gênica relacionados à biossíntese de terpenos quando as amostras não estavam sob estresse (LIU et al., 2017; NIE et al., 2018). Apesar de ocorrer duplicação genômica nos poliploides, não significa que a expressão dos genes é necessariamente maior, devido à complexidade de redes regulatórias, às mudanças epigenéticas e à compensação de dosagem gênica (IANNICELLI et al., 2020).

A biossíntese de terpenos está sob controle genético e ambiental, sendo regulados por diferentes fatores de transcrição que afetam o fluxo metabólico (BROECK et al., 2017; GUERRIERO et al., 2018; NIE et al., 2018; VALIFARD et al., 2018; SHAKYA et al., 2019). Os estresses salino, hídrico e hormônios exógenos (ABA e AS), provocaram alterações no perfil majoritário do óleo essencial no acesso triploide de *L. alba*, promovendo aumento do teor de linalol, evidenciando a possibilidade de se modular de forma induzida a produção desse composto. O aumento sob estresse hídrico, foi corroborado pela expressão relativa ao gene *LIS1*, sugerindo que o acesso triploide produziu e acumulou linalol como resposta a um longo período de restrição hídrica (40 dias) e apresentou maior plasticidade genética e química.

O aumento de linalol já foi relatado em estudos anteriores para a espécie, sob estresse salino (60 mM de NaCl) (CASTRO et al., 2020b), déficit hídrico (1, 2 e 3% de PEG-4000) (CASTRO et al., 2020a) e fotoperíodo (CASTRO et al., 2019). Além disso, também foi encontrado aumento no teor de linalol sob estresse salino para tomilho (ZRIG et al., 2019).

Sob 200 μ M de ABA exógeno, para *Salvia* (YANG, SHENG, DUAN, 2012), houve aumento na biossíntese de tanshinonas. Acredita-se que as vias MVA e MEP, as mesmas vias de produção de terpenos, como o linalol, estejam envolvidas na biossíntese desse composto. Em *Ajowan*, 50 μ M de ácido abscísico exógeno, aumentou o teor de óleo essencial produzido (GHASSEMI-GOLEZANI, GHASSEMI,

SALMASI, 2018). Aplicando diferentes concentrações de AS com borrifador (2.5, 5, 10 e 20 mM), em *Lippia citriodora* (2.5, 5, 10 e 20 mM), ocorreu aumento do teor de alguns compostos e reduziram o teor de outros, revelando a possibilidade de modular a constituição de seu óleo essencial utilizando esse hormônio exógeno (NOURAFKAN et al., 2014).

No entanto, para todos os níveis de ploidia (estresses por ferimento e térmico) e acessos diploide e tetraploide (estresses salino, hídrico, ABA e AS), não houve diferença significativa nos teores de linalol. Além disso, o teor de citral permaneceu o mesmo para todos os níveis de ploidia sob os estresses aplicados, sugerindo os mesmos não promoveram acúmulo do composto em suas folhas. Dessa forma, o aumento da expressão relativa aos genes *LIS1* e *GDS* sob estresse salino, não alterou o teor de citral para o acesso diploide. Sabe-se que a expressão de genes pode não estar diretamente relacionada ao teor do componente majoritário do metabolismo secundário (LAVANIA et al., 2012), corroborando os resultados encontrados onde não houve relação observada entre o gene *LIS1* e teor de linalol e o gene *GDS* e teor de citral.

Na presença de estresse por ABA, foi possível observar maior produção de citral para o acesso diploide quando comparado ao tetraploide, sugerindo que o diploide foi mais reativo ao estresse. Já sob estresse por AS, o acesso tetraploide apresentou maior produção de citral quando comparado ao acesso diploide. Sugere-se assim, que o estresse promoveu alterações no teor de citral quando comparados os níveis de ploidia.

No entanto, na ausência dos estresses por AS, hídrico e ferimento, foi possível observar maior produção de citral pelo acesso tetraploide quando comparado ao diploide. Sabe-se que modulações nos perfis metabólicos de plantas poliploides, pode ser resultado de alterações nas rotas de biossíntese dos compostos voláteis (FASANO et al., 2016), devido ao aumento de vigor, crescimento e duplicação genômica (LAVANIA et al., 2012; IANNICELLI et al., 2016, 2020; SHMEIT et al., 2020).

Como os monoterpenos são sintetizados em plastídeos, sua produção pode competir com a fotossíntese e o desenvolvimento (BATISTA et al., 2016b), corroborando os dados anteriores, no presente trabalho, nos quais os acessos diploide e triploide aumentaram a biossíntese de monoterpenos, com redução do

crescimento e diminuição da eficiência fotoquímica do FSII, sob os estresses salino e hídrico, respectivamente.

Estudos recentes sugerem o uso de genes de referência em condições experimentais diferentes. São genes que atuam de modo constitutivo, capazes de manter sua expressão estável e importantes para a acurácia da expressão gênica por RT-qPCR (SHUKLA et al., 2019; WANG et al., 2018a; ZHANG et al., 2019; ZHANG et al., 2020). Deste modo, foram avaliados seis diferentes genes candidatos por quatro ferramentas (BestKeeper, NormFinder, geNorm, e RefFinder) com algoritmos diferentes de análise. Em *L. alba*, espécie medicinal e com potencial econômico devido à produção majoritária de linalol e citral, observou-se modulação na expressão gênica relacionada à via biossintética destes monoterpênicos sob estresses abióticos (BATISTA et al., 2016a, 2017b; CASTRO et al., 2019, 2020a, 2020b), como também observado, no presente trabalho (ver capítulo anterior).

O gene para a enzima *NADH* desidrogenase, foi identificado como o gene mais estável, em geral, pelos algoritmos de análise e, portanto, o mais recomendado para uso como gene de referência sob os estresse salino, hormônios exógenos (ABA e AS), ferimento e térmico. O gene *NADH*, participa da via cíclica da cadeia de transporte de elétrons em torno do fotossistema I em diferentes espécies de plantas (STORTI et al., 2020). Este gene, também foi considerado um dos mais apropriados como gene de referência para o dendezeiro sob estresse biótico (KWAN et al., 2016).

O gene *TUB* (α -tubulina), codifica uma proteína associada ao retículo endoplasmático e foi o gene considerado mais estável sob estresse hídrico com uso de polietilenoglicol (PEG-4000) para o acesso diploide de *L. alba*. O gene α *TUB* (α -tubulina), também foi considerado um dos mais apropriados como gene de referência para a cana-de-açúcar sob restrição hídrica (SILVA et al., 2014). Considerando-se a classificação geral das ferramentas utilizadas, este gene foi diferente daquele recomendado para os demais estresses avaliados para quais o gene *NADH* mostrou-se mais estável. Dessa forma, corrobora-se a informação de que um gene expresso sob uma condição experimental, pode não ser expresso da mesma forma sob outra (BATISTA et al., 2019a).

O gene *CIT* foi considerado o gene menos recomendado sob os estresses hídrico e por ácido abscísico para o acesso diploide de *L. alba*, de acordo com a classificação geral. Para o pinhão chinês, esse gene também foi considerado menos

estável sob estresse hídrico, utilizando PEG-6000 (CHEN et al., 2019). Por outro lado, o gene *CIT* foi o mais recomendado para analisar comparativamente três níveis de ploidia em *L. alba*, diploide, triploide e tetraploide, podendo ser utilizado para a análise da expressão gênica das vias biossintéticas de monoterpenos de ambos os níveis de ploidia por RT-qPCR (LOPES, 2019). Este resultado foi corroborado também, pelas análises anteriores da expressão de genes relacionados à via de biossíntese de monoterpenos no presente trabalho, quando se comparou as três ploidias sob diferentes estresses abióticos. Além disso, o gene *CIT* está entre os três primeiros genes na classificação para os estresses salino (BestKeeper e GeNorm) e térmico (Bestkeeper, GeNorm e NormFinder), apresentando níveis aceitáveis para uso.

Os genes *ELONG*; *G6i* e *TUB*, foram considerados menos estáveis para os estresses salino e ácido salicílico; ácido abscísico e térmico, respectivamente, de acordo com a classificação geral das ferramentas de análise. Dessa forma, esses genes podem mascarar a expressão de genes-alvo em função da modulação das vias biossintéticas sob diferentes condições ambientais (BATISTA et al., 2019a; LIU et al., 2020).

Além de *NADH* ser o gene de referência mais recomendado sob a maioria dos fatores abióticos testados para o estresse salino, hormônios exógenos (ABA e AS), fermento e térmico, aplicados *in vitro*, a análise de expressão relativa corrobora estes resultados, pois, com exceção ao estresse por ácido salicílico, houve diferença de expressão relativa do gene-alvo quando normalizado pelo gene mais estável e o gene menos estável. O mesmo ocorreu quando a expressão relativa ao gene *RNApol* foi normalizada com gene mais recomendado (*TUB*) e o menos estável (*CIT*), para o estresse hídrico. Sugere-se assim, utilizar o gene *NADH* (estresse salino, hormônios exógenos, fermento e térmico) e o gene *TUB* (estresse hídrico) para normalizar a expressão gênica em diploides de *L. alba*. Destaca-se que o gene menos recomendado, pode não evidenciar uma expressão eficiente, podendo mascarar e causar variação na expressão de genes-alvo (BATISTA et al., 2019b; LIU et al., 2020).

Este é o primeiro estudo de genes de referência para diploide de *L. alba* sob diferentes condições de estresse abiótico. Assim, o conhecimento gerado neste trabalho será útil para posteriores estudos de expressão gênica por RT-qPCR para a espécie em resposta à fatores ambientais.

10 CONCLUSÕES

- Observou-se variações provocadas pelos diferentes estresses, para os três níveis de ploidia de *Lippia alba*. O estresse salino e o estresse hídrico, provocaram maior plasticidade morfológica, genética e química, quando comparados aos demais estresses abióticos.
- As respostas aos estresses abióticos evidenciaram que, os poliploides, de forma geral, apresentaram maior vigor e tolerância, quando comparados ao acesso diploide, possivelmente devido ao efeito de tamponamento genético.
- Os resultados em conjunto demonstraram que, estresses abióticos são capazes de influenciar na morfofisiologia e expressão gênica, assim como modular a produção de óleos essenciais em *Lippia alba*, contribuindo para o conhecimento da via biossintética de monoterpenos e, abrindo novas possibilidades de uso e melhoramento da espécie.
- Na tentativa de contribuir para otimizar futuros estudos da expressão de genes de interesse comercial em *L. alba*, dentre os genes de referência candidatos para as condições de estresses abióticos aos quais o acesso diploide foi submetido, o gene *NADH* foi considerado o mais recomendado para os estresses salino, hormônios exógenos (ABA e AS), ferimento e térmico. O gene *TUB*, apresentou maior estabilidade sob estresse hídrico. Assim, ambos os genes proporcionarão uma resposta mais acurada para a expressão de genes-alvo com a técnica de RT-qPCR em *Lippia alba*.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, p. 5245–5250, 2004.

BATISTA, D. S.; DE CASTRO, K. M.; DA SILVA, A. R.; TEIXEIRA, M. L.; SALES, T. A.; SOARES, L. I.; CARDOSO, M.; SANTOS, M.; VICCINI, L. F.; OTONI, W. C. Light quality affects in vitro growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**. v.52, p. 276-282. 2016a.

BATISTA, D. S.; DE CASTRO, K. M.; KOEHLER, A. D.; PORTO, B. N.; DA SILVA, A. R.; DE SOUZA, V. C.; TEIXEIRA, M. L.; CARDOSO, M.; SANTOS, M.; VICCINI, L. F.; OTONI, W. C. 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**, v.128, p.357-358. 2016b.

BATISTA, D. S.; DE CASTRO, K. M.; RIBEIRO, D. M.; CAIXETA, E. T.; DE OLIVEIRA SANTOS, M.; VICCINI, L. F.; OTONI, W. C. Ethylene responses and ACC oxidase gene expression in *Lippia alba* (Verbenaceae) chemotypes with varying ploidy levels. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 53, n. 3, p. 278–284, 2017.

BATISTA, D. S.; MOREIRA, V. S.; FELIPE, S. H. S.; FORTINI, E. A.; SILVA, T. D.; CHAGAS, K.; LOUBACK, E.; ROMANEL, E.; COSTA, M. G. C.; OTONI, W. C. Reference gene selection for qRT-PCR in Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] as affected by various abiotic factors. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.138, n. 1, p.97-107, 2019.

BRUNNER, A. M.; YAKOVLEV, I. A.; STRAUSS, S. H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. **BMC Plant Biology**, v. 4, p. 1–7, 2004.

BUH GAŠPARIČ, M.; TENGS, T.; LA PAZ, J. L.; HOLST-JENSEN, A.; PLA, M.; ESTEVE, T.; ŽEL, J.; GRUDEN, K. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 6, p. 2023–2029, 2010.

CASTRO, K. M.; BATISTA, D. S.; SILVA, T. D.; FORTINI, E. A.; FELIPE, S. H. S.; FERNANDES, A. M.; SOUSA, R. M. J.; NASCIMENTO, L. S. Q.; CAMPOS, V. R.; GRAZUL, R. M.; VICCINI, L. F.; OTONI, W. C. Water deficit modulates growth, morphology, and the essential oil profile in *Lippia alba* L. (Verbenaceae) grown in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 141, p.55-65, 2020a.

CASTRO, K. M.; BATISTA, D. S.; SILVA, T. D.; FORTINI, E. A.; FELIPE, S. H. S.; FERNANDES, A. M.; DE JESUS SOUSA, R. M.; DE QUEIROZ NASCIMENTO, L. S.; CAMPOS, V. R.; VICCINI, L. F.; GRAZUL, R. M.; OTONI, W. C. Salinity modulates growth, morphology, and essential oil profile in *Lippia alba* L. (Verbenaceae) grown in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 140, p-593-603, 2020b.

CARMONA, F.; ANGELUCCI, M. A.; SALES, D. S.; CHIARATTI, T. M.; HONORATO, F. B.; BIANCHI, R. V.; PEREIRA, A. M. S. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown hydroethanolic extract of the leaves is effective in the treatment of migraine in women. **Phytomedicine**, v. 20, n. 10, p. 947–950, 2013.

CHENG, Z.; LEI, N.; LI, S.; LIAO, W.; SHEN, J.; PENG, M. The regulatory effects of MeTCP4 on cold stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*: A transcriptome analysis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 138, p. 9–16, 2019.

CHIES, C.; BRANCO, C.; SCOLA, G.; AGOSTINI, F.; GOWER, A.; SALVADOR, M. Antioxidant effect of *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown. **Antioxidants**, v. 2, n. 4, p. 194–205, 2013.

CONDE, R.; CORRÊA, V. S. C.; CARMONA, F.; CONTINI, S. H. T.; PEREIRA, A. M. S. Chemical composition and therapeutic effects of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown leaves hydro-alcoholic extract in patients with migraine. **Phytomedicine**, v. 18, n. 14, p. 1197–1201, 2011.

DAI, F.; ZHAO, X.; TANG, C.; WANG, Z.; KUANG, Z.; LI, Z.; HUANG, J.; LUO, G. Identification and validation of reference genes for qRT-PCR analysis in mulberry (*Morus alba* L.). **PLOS ONE**, v. 13, n. 3, p. 1–14, 2018.

DHEDA, K.; HUGGETT, J. F.; BUSTIN, S. A.; JOHNSON, M. A.; ROOK, G.; ZUMLA, A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. **BioTechniques**, v. 37, n. 1, p. 112–119, 2004.

GAO, W.; XU, F.; GUO, D.; ZHAO, J.; LIU, J.; GUO, Y.; SINGH, P. K.; MA, X.; LONG, L.; BOTELLA, J. R.; SONG, C. Calcium-dependent protein kinases in cotton: insights into early plant responses to salt stress. **Plant Biology**. p. 1–15, 2018.

GOIDIN, D.; MAMESSIER, A.; STAQUET, M. J.; SCHMITT, D.; BERTHIER-VERGNES, O. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β -actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. **Analytical Biochemistry**, v. 295, n. 1, p. 17–21, 2001.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 2, p. 211–222, 2008.

HONG, S. Y.; SEO, P. J.; YANG, M. S.; XIANG, F.; PARK, C. M. Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. **BMC Plant Biology**, v. 8, p. 1–11, 2008.

JULIÃO, S. A.; RIBEIRO, C. V.; LOPES, J. M. L.; MATOS, E. M.; REIS, A. C.; PEIXOTO, P. H. P.; MACHADO, M. A.; AZEVEDO, A. L. S.; GRAZUL, R. M.; CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F. Induction of synthetic polyploids and assessment of genomic stability in *Lippia alba*. **Frontiers in Plant Science**. v. 11, n. 292, p.1-11, 2020.

KANAGENDRAN, A.; PAZOUKI, L.; NIINEMETS, Ü. Differential regulation of volatile emission from *Eucalyptus globulus* leaves upon single and combined ozone and wounding treatments through recovery and relationships with ozone uptake. **Environmental and Experimental Botany**, v. 145, n. June 2017, p. 21–38, 2018.

KWAN, Y. M.; MEON, S.; HO, C. L.; WONG, M. Y. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in *Ganoderma*-infected oil palm (*Elaeis guineensis*) seedlings. **Australasian Plant Pathology**, v. 45, n. 3, p. 261–268, 2016.

LIU, D.; HUANG, X.; LIN, Y.; WANG, X.; YAN, Z.; WANG, Q.; DING, J.; GU, T.; LI, Y. Identification of reference genes for transcript normalization in various tissue types and seedlings subjected to different abiotic stresses of woodland strawberry *Fragaria vesca*. **Scientia Horticulturae**, v. 261, p. 108840, 2020.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOPES, J. M. L. Poliploidia em *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae): Origem e consequências na expressão gênica. TESE (doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Juiz de Fora. 173f. 2019.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v. 15, p. 473-497, 1962.

NARANCIO, R.; JOHN, U.; MASON, J.; SPANGENBERG, G. Selection of optimal reference genes for quantitative RT-PCR transcript abundance analysis in white clover (*Trifolium repens* L.). **Functional Plant Biology**, v. 45, p-737-744, 2018.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. Lippia: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201–214, 2001a.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, M. E.; VILLAR, ngel. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Farmaco**, v. 56, n. 5–7, p. 501–504, 2001b.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. Determination of most stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity : BestKeeper. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 509–515, 2004.

RADONIĆ, A.; THULKE, S.; MACKAY, I. M.; LANDT, O.; SIEGERT, W.; NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, n. 4, p. 856–862, 2004.

REIS, A. C.; SOUSA, S. M.; VALE, A. A.; PIERRE, P. M. O.; FRANCO, A. L.; CAMPOS, J. M. S.; VIEIRA, R. F.; VICCINI, L. F. *Lippia alba* (Verbenaceae): A new tropical autoploid complex? **American Journal of Botany**, v. 101, n. 6, p. 1002–1012, 2014.

REZENDE, R. A. L. S.; RODRIGUES, F. A.; SOARES, J. D. R.; SILVEIRA, H. R. de O.; PASQUAL, M.; DIAS, G. de M. G. Salt stress and exogenous silicon influence physiological and anatomical features of in vitro-grown cape gooseberry. **Ciência Rural**, v. 48, n. 1, p. 1–9, 2018.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; DE AZEVEDO, J. L. F.; DIAS, L. L. C.; DO RÊGO, M. M.; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 3, p. 413–422, 2012.

SHELKE, D. B.; NIKALJE, G. C.; CHAMBHARE, M. R.; ZAWARE, B. N.; PENNA, S. Na⁺ and Cl⁻ induce differential physiological, biochemical responses and metabolite modulations *in vitro* in contrasting salt-tolerant soybean genotypes. **3Biotech** v. 9, n. 91, p. 1-15, 2019.

SHUKLA, P.; REDDY, R. A.; PONNUVEL, K. M.; ROHELA, G. K.; SHABNAM, A. A.; GHOSH, M. K.; MISHRA, R. K. Selection of suitable reference genes for quantitative real-time PCR gene expression analysis in Mulberry (*Morus alba* L.) under different abiotic stresses. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 2, p. 1809–1817, 2019.

SILVA, R. L. D. O.; SILVA, M. D.; FERREIRA NETO, J. R. C.; NARDI, C. H. De; CHABREGAS, S. M.; BURNQUIST, W. L.; KAHL, G.; BENKO-ISEPPON, A. M.; KIDO, E. A. Validation of novel reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR in drought-stressed sugarcane. **Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-12, 2014.

SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 97 n.13 p.7051-7. 2000.

SOUZA, V. C. Análise do transcriptoma de *Lippia alba* (Mill.) n.e.br. (verbenaceae) por RNASeq visando a identificação de enzimas terpeno sintases. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Juiz de Fora. 80f. 2016.

STORTI, M.; PUGGIONI, M. P.; SEGALLA, A.; MOROSINOTTO, T.; ALBORESI, A. The activity of chloroplast NADH dehydrogenase-like complex influences the photosynthetic activity of the moss *Physcomitrella patens*. **bioRxiv**, v. 5, n. 13908, p. 1-24, 2020.

TAVARES, I. B.; MOMENTÉ, V. G.; NASCIMENTO, I. R. do. *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agrônômicos. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 4, p. 204–220, 2011.

VANDESOMPELE, J.; PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; ROY, N. V.; PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 2–12, 2002.

VANGUILDER, H. D.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**. v. 44, n. 5, p. 619–626, 2008.

VICCINI, L. F.; SILVEIRA, R. S.; VALE, A. A.; CAMPOS, J. M. S.; REIS, A. C.; SANTOS, M. O.; CAMPOS, V. R.; CARPANEZ, A. G.; GRAZUL, R. M. Citral and linalool content has been correlated to DNA content in *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 14–19, 2014.

VIVES-PERIS, V.; MARMANEU, D.; GÓMEZ-CADENAS, A.; PÉREZ-CLEMENTE, R. M. Characterization of Citrus WRKY transcription factors and their responses to phytohormones and abiotic stresses. **Biologia Plantarum**, v. 62, n. 1, p. 33–44, 2018.

WANG, B.; DU, H.; YAO, Z.; REN, C.; MA, L. Validation of reference genes for accurate normalization of gene expression with quantitative real-time PCR in *Haloxylon ammodendron* under different abiotic stresses. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. June, p. 455–463, 2018a.

XIE, F.; XIAO, P.; CHEN, D.; XU, L.; ZHANG, B. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Molecular Biology**, v. 80, n. 1, p. 75–84, 2012.

ZHANG, Y. F.; WEN, Z. B.; WANG, Y.; WANG, Y. L.; FENG, Y. Suitable reference genes for real-time quantitative PCR in *Salsola laricifolia* under five abiotic stresses. **Biologia Plantarum**, v. 63, n. 1, p. 380–387, 2019.

ZHANG, Z.; LI, C.; ZHANG, J.; CHEN, F.; GONG, Y.; LI, Y.; SU, Y.; WEI, Y.; ZHAO, Y. Selection of the reference gene for expression normalization in *Papaver somniferum* L. Under abiotic stress and hormone treatment. **Genes**, v. 11, n. 2, p. 1-13, 2020.

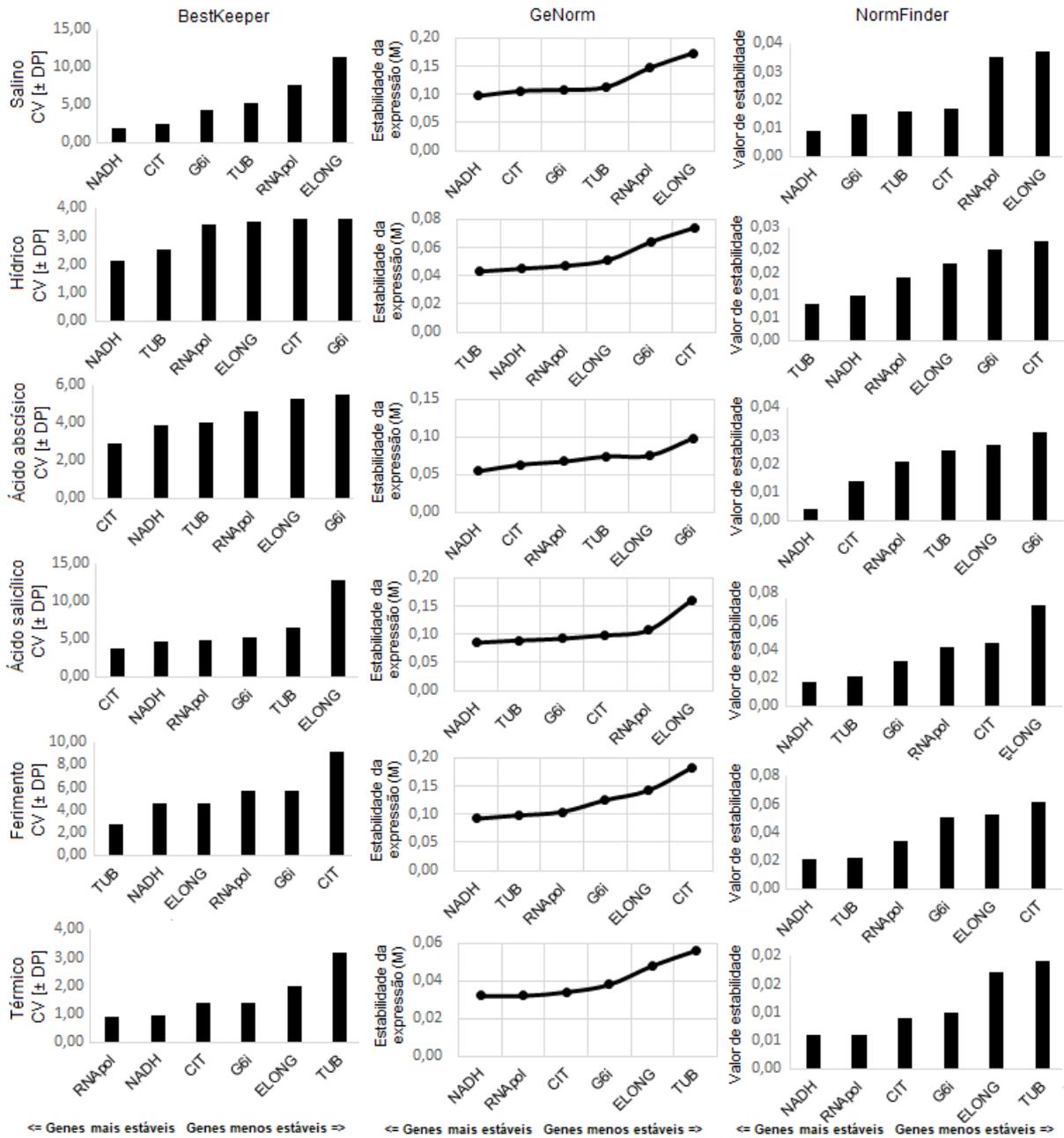
APÊNDICE A – Quadro comparativo

Quadro 1- Quadro comparativo para os estresses salino, estresse hídrico, hormônios exógenos (ABA e AS), fermento e temperatura (4°C), entre os tratamentos dos acessos diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x) e entre ploidias (2x e 3x; 2x e 4x) de *L. alba*, cultivada *in vitro* por 40 dias. +: diferença; -: ausência de diferença.

Salino (60 mMNaCl)	2x	3x	4x	2x vs 3x	2x vs 4x
Crescimento	+	+	-	+	+
Enzimas	+	-	-	-	-
Razão Fv/Fm	+	+	-	-	+
Prolina	-	-	-	+	-
Expressão gênica <i>LIS1</i>	+	-	-	+	+
Expressão gênica <i>GDS</i>	+	-	-	-	-
Teor de linalol	-	+	-	-	-
Teor de citral	-	-	-	-	-
Estresse hídrico (1% PEG)	2x	3x	4x	2x vs 3x	2x vs 4x
Crescimento	+	+	+	+	+
Enzimas	+	-	-	-	-
Razão Fv/Fm	-	+	-	-	+
Prolina	+	+	+	+	+
Expressão gênica <i>LIS1</i>	-	+	-	-	+
Expressão gênica <i>GDS</i>	-	-	-	-	-
Teor de linalol	-	+	-	-	-
Teor de citral	-	-	-	-	+
Ácido abscísico (10 µM)	2x	3x	4x	2x vs 3x	2x vs 4x
Crescimento	-	-	-	+	+
Enzimas	-	-	-	+	+
Razão Fv/Fm	-	-	-	-	-
Prolina	+	-	+	+	+
Expressão gênica <i>LIS1</i>	-	-	-	-	-
Expressão gênica <i>GDS</i>	-	-	-	-	-
Teor de linalol	-	+	-	-	-
Teor de citral	-	-	-	-	+
Ácido salicílico (10 µM)	2x	3x	4x	2x vs 3x	2x vs 4x
Crescimento	-	-	-	-	+
Enzimas	-	-	-	-	-
Razão Fv/Fm	-	-	-	-	+
Prolina	-	-	+	-	+
Expressão gênica <i>LIS1</i>	-	-	+	-	-
Expressão gênica <i>GDS</i>	-	-	-	-	-
Teor de linalol	-	+	-	-	-
Teor de citral	-	-	-	-	+
Ferimento	2x	3x	4x	2x vs 3x	2x vs 4x
Crescimento	-	-	-	+	+
Enzimas	-	-	-	+	+
Razão Fv/Fm	-	+	-	-	+
Prolina	-	-	-	+	-

Expressão gênica <i>LIS1</i>	-	-	-	-	-
Expressão gênica <i>GDS</i>	-	-	-	-	-
Teor de linalol	-	-	-	-	-
Teor de citral	-	-	-	-	+
Temperatura (4°C)	2x	3x	4x	2x vs 3x	2x vs 4x
Crescimento	-	-	-	+	+
Enzimas	+	-	-	+	+
Razão Fv/Fm	+	-	-	+	+
Prolina	-	-	-	+	+
Expressão gênica <i>LIS1</i>	-	-	-	-	-
Expressão gênica <i>GDS</i>	-	-	-	-	+
Teor de linalol	-	-	-	-	-
Teor de citral	-	-	-	-	-

APÊNDICE B – Gráficos BestKeeper, GeNorm, NormFinder



APÊNDICE C – Gráficos RefFinder

