

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA APLICADA AO MANEJO E**  
**CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS**

**Jobber Condé Evangelista Freitas**

**Ecofisiologia em poliploides de *Lippia alba* sob diferentes regimes hídricos**

**Juiz de Fora**  
**2018**

**Jobber Condé Evangelista Freitas**

**Ecofisiologia em poliploides de *Lippia alba* sob diferentes regimes hídricos**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de mestre em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Pereira Peixoto

**Juiz de Fora**

**2018**

**Jobber Condé Evangelista Freitas**

**Ecofisiologia em poliploides de *Lippia alba* sob diferentes regimes hídricos**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de mestre em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2018.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Paulo Henrique Pereira Peixoto – Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Dr. Leônidas Paixão Passos - Coorientador  
Embrapa Gado de Leite

---

Dr. Leandro Elias Moraes  
Instituto Federal de Minas Gerais

---

Dr. Cristiano Ferrara de Resende  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Ao meu tio bisavô, Aristides, que sempre disse que eu seria doutor, dedico.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José e Maria Aparecida, e irmã, Mariana, por toda educação e ensinamentos, além do amor e carinho sempre presentes.

Ao meu namorado, Igor, por todo companheirismo, crescimento e carinho.

Ao Felipe Braga, por ter sido um grande amigo de todas as horas nestes últimos anos.

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFJF, Cristiano Resende, Felipe Dornellas e Vinícius Pacheco pela amizade e contribuição neste trabalho.

Ao meu orientador, Paulo Peixoto, pela confiança em executar este trabalho.

Aos meus amigos de graduação, Bruna, Luana, Natalia Fernandes, Natália Muniz, Rogério, Thiago e Victor, por todos os bons momentos de sempre, ainda que mais distantes nesses últimos anos.

Ao professor Richard Grazul e ao doutorando Lucas Duarte, do Departamento de Química da UFJF, por terem realizado as análises de óleos essenciais.

Ao professor Daniel Pimenta, por ter cedido o espaço em sua casa de vegetação.

Aos membros da banca por todas as correções que contribuíram significativamente com este trabalho.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal da Embrapa Gado de Leite, Leônidas, Jemima, Sebastião Evaristo e Lucas pela colaboração em minha vida pessoal e acadêmica.

Aos colegas do laboratório de genética da UFJF, Elyabe, Victória e Sirley por toda a ajuda quando necessária.

A todos os meus professores do PGECOL, principalmente à Simone Cardoso, pelas aulas de estatística e R.

A todos os graduandos que passaram pelo laboratório de Fisiologia Vegetal da UFJF, pelas ajudas, e colegas que a pós-graduação me trouxe, pelos bons momentos.

Aos meus cães, Sirius e Regulus por sempre terem me feito sorrir quando as dificuldades apareceram.

Ao grupo de Bolsistas da Capes, no Facebook, pelos momentos divertidíssimos.

Ao Lula e à Dilma, por tanto terem investido na educação deste país.

À CAPES pelo financiamento da bolsa e ao PGECOL e a UFJF, pela infraestrutura.

A todos que de alguma forma, direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Ao infinito e além!”*  
*- Buzz Lightyear (Toy Story).*

## RESUMO

*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br ex Britton & P. Wilson é uma planta arbustiva muito utilizada na medicina tradicional como analgésica e calmante, estando amplamente distribuída pela América do Sul. Há, também, o interesse comercial pela espécie, pois alguns cosméticos e chás industrializados utilizam-na em sua composição. Assim, torna-se clara a necessidade de se estudar como essa espécie responde a diferentes condições de cultivo, principalmente em relação à água, recurso escasso em muitas regiões e diretamente impactado pelas mudanças climáticas globais. O objetivo deste trabalho foi verificar como acessos autopoliploides diploide, tetraploide e hexaploide de *L. alba* respondem fisiologicamente à desidratação. Para tanto, em dois experimentos, foram avaliados parâmetros bioquímicos e metabólicos da fisiologia de plantas de *L. alba* cultivadas sob diferentes condições de irrigação. Em ambos os experimentos ficou demonstrado que o nível de poliploidia não influenciou na resposta fisiológica das plantas de *L. alba* ao estresse hídrico. O Experimento 1 contou com quatro tempos de desidratação contínua do solo após a suspensão da irrigação: 0; 5; 10 ou 15 dias. Os resultados dessa etapa indicaram que o quadro de estresse hídrico ocorreu apenas no tratamento de 15 dias sem irrigação. Além disso, a condutância estomática e a transpiração destacaram-se como as variáveis mais sensíveis e responsivas ao estresse, sendo a queda nas taxas fotossintéticas atribuída principalmente ao fechamento estomático. O Experimento 2 foi planejado e conduzido de acordo com os resultados do Experimento 1. Nesta etapa, plantas das mesmas ploidias do experimento anterior foram submetidas a 0 ou 15 dias de suspensão total da irrigação e reidratadas após o período de déficit hídrico. Passadas 24 horas da reidratação, as mesmas foram reavaliadas. Em adição, mais parâmetros fisiológicos foram avaliados durante o período de desidratação do Experimento 2. Os resultados demonstraram que os parâmetros de trocas gasosas possuem um alto poder de explicação da variação total dos dados em relação aos demais. Sobre a reidratação, ficou apurado que apenas 24 horas não foram o suficiente para que plantas de *L. alba* recuperassem o seu *status* hídrico e fisiológico ideais, embora algumas mudanças positivas, em menores escalas, começaram a serem percebidas. As análises de óleos permitiram inferir que o estresse hídrico não influencia no perfil qualitativo da produção destes compostos, que é fortemente regulado por fatores genéticos. Os resultados encontrados indicam que *L. alba* é uma espécie tolerante ao estresse hídrico, o que, provavelmente, é um dos principais fatores que contribuem para a sua alta dispersão em diferentes regiões.

Palavras-chave: Estresse hídrico. Planta medicinal. Erva-cidreira.

## ABSTRACT

*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br ex Britton & P. Wilson is a shrub widely used in traditional medicine as an analgesic and soothing, with wide distribution throughout South America. There is also commercial interest in this species because some cosmetics and industrialized teas use it in its composition. Thus, it becomes clear the need to study how this species responds to different growing conditions, mainly in relation to water, a scarce resource in many regions and directly impacted by global climate change. This work aimed to verify how diploid, tetraploid and hexaploid autopolyploid accessions of *L. alba* respond physiologically to dehydration. For that, biochemical and metabolic parameters were evaluated in *L. alba* plants cultivated under different irrigation conditions in two experiments. In both it was shown that polyploidy level does not influence the physiological response of *L. alba* under water stress. Experiment 1 had four continuous soil dewatering times after watering suspension: 0; 5; 10 or 15 days. The results of this step indicated that the water stress situation occurred only in the 15 days treatment without irrigation. In addition, stomatal conductance and transpiration were the most sensitive and stress-responsive variables, and loss in photosynthetic rates was attributed mainly to stomatal closure. Experiment 2 was planned and conducted according to the results of Experiment 1. At this stage, plants of the same ploidy from previous experiment were submitted to 0 or 15 days of total irrigation suspension and rehydrated after the period of water deficit. After 24 hours of rehydration, they were reevaluated. Furthermore, more physiological parameters were evaluated during the dehydration period in Experiment 2. The results showed that parameters of gas exchange have a high power of explanation of the total data variation in relation to the others. On rehydration, it was found that only 24 hours are not enough for *L. alba* plants to irrigação in their water and physiological status, although some positive changes, on smaller scales, could begin to be perceived. The analysis of essential oils allowed us to infer that water stress does not influence qualitative profile production of these compounds, which is strongly regulated by genetic factors. The results indicate that *L. alba* is a tolerant species to water stress, which is probably one of the main factors that contribute to its high dispersion in different regions.

Keywords: Medicinal plant. Lemongrass. Water stress.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>3</b>
2.1 ÁREA EXPERIMENTAL E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS .....	3
2.2 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	4
2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS.....	5
<b>2.3.1 Experimento 1</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3.2 Experimento 2</b> .....	<b>5</b>
2.4 AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS .....	6
2.4.1 Conteúdo relativo de água e hidratação foliar.....	6
2.4.2 Conteúdo de prolina.....	6
2.4.3 Trocas gasosas .....	7
2.4.4 Fluorescência da <i>clorofila a</i> .....	7
2.4.5 Pigmentos fotossintéticos .....	8
2.4.6 Carboidratos solúveis totais (CST).....	8
2.4.7 Índice SPAD.....	8
2.4.8 Perfil de óleos essenciais por cromatografia gasosa (GC-MS).....	9
2.4.9 Proteínas, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POX).....	9
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	11
2.5.1 Análises univariadas .....	11
2.5.2 Análises multivariadas.....	11
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>12</b>
3.1 EXPERIMENTO 1 .....	12
3.1.1 Conteúdo relativo de água e hidratação foliar.....	13
3.1.2 Trocas gasosas .....	13
3.1.3 Conteúdo de prolina.....	15
3.1.4 Análise de componentes principais.....	16
3.2 EXPERIMENTO 2 .....	18
3.2.1 Trocas gasosas .....	18
3.2.3 Fluorescência da <i>clorofila a</i> .....	21
3.2.4 Pigmentos fotossintéticos .....	21

3.2.5 Carboidratos solúveis totais .....	22
3.2.6 Índice SPAD.....	23
3.2.7 Proteínas, catalase, superóxido dismutase e peroxidase .....	24
3.2.8 Análise de componentes principais .....	25
3.2.9 Reidratação .....	27
3.2.10 Óleos essenciais.....	28
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
4.1 EFEITO DO NÍVEL DE POLIPLOIDIA .....	31
4.2 EXPERIMENTO 1 .....	31
4.3 EXPERIMENTO 2.....	34
4.3.1 Etapa de indução do estresse hídrico.....	34
4.3.2 Etapa de reidratação.....	38
4.3.3 Perfil de óleos essenciais.....	39
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>42</b>



## 1 INTRODUÇÃO

*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br ex Britton & P. Wilson é uma planta arbustiva da família Verbenaceae, popularmente conhecida como erva-cidreira, falsa melissa e por outros sinônimos. Tais arbustos chegam a alcançar até dois metros de altura, com ramos finos e frágeis. Suas folhas são ricas em tricomas, possuem formato elíptico com as bordas serradas e de dimensões variadas, dispostas em filotaxia oposta cruzada. Suas flores são pequenas e, predominantemente, rosadas; dispostas em capítulos com eixos curtos (MATOS, 2007).

A distribuição da espécie ocorre amplamente por toda a América do Sul e em partes da América Central. Esta vasta ocupação de diferentes tipos de ambientes é favorecida pela alta plasticidade fenotípica e variabilidade genômica da espécie, recentemente reconhecida como um complexo autoploidio composto por cinco números cromossômicos ( $2x=30$ ,  $2x=30+8$ ,  $3x=45$ ,  $4x=60$  e  $6x=90$ ) (REIS et al., 2014).

A poliploidia é um fenômeno em que os indivíduos possuem mais de dois conjuntos cromossômicos completos por núcleo celular (SATTLER; CARVALHO; CLARINDO, 2016). Em plantas, sabe-se que o processo de poliploidização é um fator importante sobre o processo evolutivo das angiospermas (SOLTIS; SOLTIS; TATE, 2003; SOLTIS et al., 2009, 2015; WENDEL, 2015) e que pode estar envolvido na ocupação/invasão de novos habitats (TE BEEST et al., 2012; SOLTIS et al., 2015; ALIX et al., 2017; VAN DE PEER; MIZRACHI; MARCHAL, 2017). Dentre os aspectos e características em que há a influência da poliploidia em vegetais, a fisiologia é, relativamente, pouco estudada (SOLTIS; SOLTIS, TATE, 2003; WENDEL, 2015; SOLTIS et al., 2016).

Estudos sobre poliploides vegetais de diferentes espécies relatam que a poliploidia é um fator que modula o fenótipo e as interações com o ambiente (CHEN, 2007). Atualmente sabe-se que o nível de poliploidia é um dos fatores que influenciam no perfil de produção de óleos essenciais em *L. alba*, sendo reconhecidos pelo menos 12 quimiotipos para esta espécie (NOGUEIRA et al., 2007; VICCINI et al., 2014). Devido à produção de óleos essenciais, plantas dessa espécie são aromáticas e utilizadas na medicina tradicional, em forma de chás ou de infusão, como fitoterápicos calmantes e analgésicas. Há, ainda, o interesse comercial em espécimes de *L. alba*, já que a mesma é utilizada na composição de cosméticos e chás industrializados.

Dentro de seu gênero, *L. alba* é a espécie mais estudada e relatada na literatura, incluindo aspectos ecológicos (VENÂNCIO et al., 2016), medicinais (DE FREITAS SOUZA et al., 2017; GARCÍA et al., 2017; CARVALHO et al., 2018), agrônômicos (LERMEN et al.,

2017; DOS SANTOS MARQUES et al., 2018) e de recursos genéticos (BRANDÃO et al., 2007; SOUSA et al., 2009; BATISTA et al., 2017). No âmbito medicinal, são descritos diferentes tipos de extratos de *L. alba* que possuem atividades antimicrobianas (ARA et al., 2009), citotóxicas (MESA-ARANGO et al., 2009), analgésicas (VIANA et al., 1998), calmantes (YAMAMOTO et al., 2008), anti-inflamatórias (HALDAR et al., 2012), dentre outras aplicações.

Visando a otimização da produção de plantas de *L. alba*, pesquisas agrônômicas com a espécie tiveram como objeto de estudo, principalmente, a propagação, condições de desenvolvimento e colheita, produção de óleos essenciais e avaliações biométricas (CASTRO; MING; MARQUES, 2002; EHLERT et al., 2002; TAVARES et al., 2004; MANICA-CATTANI et al., 2009; LIMA et al., 2015). Ecologicamente, sabe-se que *L. alba* atrai uma boa variedade de polinizadores durante o ano todo, uma vez que trata-se de uma espécie perene (VENÂNCIO et al., 2016). Além disso, pesquisas que visam a análise do desempenho ecofisiológico de *L. alba* têm surgido nos últimos tempos, abordando a assimilação de carbono, cultivo em diferentes condições de iluminação, nutrição e outros fatores ambientais (JANANI, 2011; BATISTA et al., 2017).

A água é um elemento fundamental para a manutenção da vida em toda a Biosfera. Para as plantas, ela é o principal fator que afeta seu crescimento e desenvolvimento, pois está intrinsecamente ligada ao processo de fotossíntese. Sem taxas positivas de fotossíntese líquida, não há como uma planta crescer. Com as aceleradas mudanças climáticas, a disponibilidade de água vem sendo modificada em diferentes ambientes (ALCAMO; FLÖRKE; MÄRKER, 2007). Lugares que, até então, nunca experimentaram seca estão passando por longos períodos de estiagem. E o contrário também vem ocorrendo: altos índices pluviométricos em ambientes com históricos de clima seco.

A vegetação de um determinado ambiente deve ser adaptada às condições do meio onde se encontra. Mudanças ambientais bruscas eliminam espécies que não possuem mecanismos para superar condições adversas (FITTER; HAY, 2002; JONES, 2014). Portanto, plantas em ambientes com baixa disponibilidade hídrica possuem mecanismos fisiológicos para superarem esse aspecto. A eficácia, ou não, das alterações realizadas terão sua eficiência de acordo com cada espécie e condições ambientais específicas.

Estudos de melhoramento em vegetais ocorrem, praticamente, desde que o homem começou a praticar a agricultura. Ter uma boa produção do que se planta, independentemente das condições ambientais, é o que se espera. Em linhas gerais, diferentes variedades de uma espécie são testadas de acordo com uma característica de interesse. Aquelas que apresentarem

os melhores resultados, são selecionadas e cruzadas para se ter indivíduos melhorados. Nos estudos de melhoramento de vegetais baseados em tolerância ao estresse hídrico, tem-se buscado produzir variedades que possam ser cultivadas em condições de restrição hídrica. Para tanto, conhecimentos fisiológicos e ecofisiológicos são, na grande maioria dos casos, fundamentais para que o processo de melhoramento de uma espécie possa ser estabelecido.

Embasado no que foi apresentado nos parágrafos anteriores, torna-se clara a necessidade de estudar-se como *L. alba* responde a diferentes condições de cultivo, principalmente em relação a diferentes regimes hídricos. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta fisiológica ao déficit hídrico, em intensidades variadas, em três acessos de *L. alba* com diferentes níveis de ploidia.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 ÁREA EXPERIMENTAL E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS

O primeiro experimento foi montado e conduzido em casa de vegetação não-climatizada coberta com teto de policarbonato e aberta nas laterais, localizada na Estação Experimental de Cultivo e Manutenção de Plantas do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora, em Juiz de Fora/MG (21°46'48.9"S 43°22'25.6"W, 970 m de altitude), entre 24/04/2017 e 12/05/2017, totalizando 18 dias. De acordo com a Classificação de Köppen, Juiz de Fora possui clima Cwa (mesotérmico), com verão chuvoso e quente, e inverno mais frio e seco. No período experimental, a temperatura variou de 14 a 20 °C, com média de 17 °C; e a umidade relativa do ar variou de 73 a 97%, com média de 86%.

O segundo experimento foi realizado no mesmo local, entre os dias 26/08/2017 e 12/09/2017, totalizando 18 dias. Neste período experimental, a temperatura variou de 14 a 20 °C, com média de 18 °C; e a umidade relativa do ar variou de 49 a 86%, com média de 67%.

Os dados climatológicos foram retirados do site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) (<http://www.inmet.gov.br/portal/>), sendo que essa base de dados é alimentada diretamente por uma estação climatológica existente na própria UFJF.

Todas as análises não-destrutivas e coletas de materiais a serem analisados em laboratório ocorreram entre às 08:00 e 11:00 horas de cada dia de trabalho.

## 2.2 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Nas análises, foram avaliados os acessos BGEN-88, BGEN-47 e BGEN-42 de *L. alba*, com níveis de ploidia correspondentes ao diploide, tetraploide e hexaploide, respectivamente. As plantas foram obtidas do banco de germoplasma da espécie, que é mantido pelo Laboratório de Genética e Biotecnologia (Departamento de Biologia), no Instituto de Ciências Biológicas da UFJF.

Os espécimes utilizados foram obtidos por propagação vegetativa, através de estaqueamento. Estacas caulinares de cada acesso, oriundas de clones, foram selecionadas por possuírem as seguintes características: semi-lenhosas, 25 cm de comprimento, três gemas axilares e diâmetro uniforme. Os explantes foram tratados durante 24 horas com solução de ácido indol-3-butírico (AIB) na concentração de 0,29 mmol, utilizando-se o método da imersão lenta. O uso do AIB garantiu um bom e expressivo enraizamento em curto prazo. Após esta etapa, as estacas foram plantadas em vasos com capacidade volumétrica de 9 L (de dimensões 31x23x19 cm), alocando-se uma planta por vaso. O substrato utilizado era composto por terra:areia:esterco bovino curtido, na proporção 3:2:1 (v/v/v). Durante o estágio juvenil, o material vegetal foi cultivado em casa de vegetação, sendo posteriormente cultivado a pleno sol, com irrigação constante em ambas as fases. Assim, garantiu-se sua umidade contínua e não houve qualquer estresse hídrico nestes períodos.

Os espécimes, já adultos, foram mantidos em casa de vegetação onde os experimentos viriam a ocorrer. Diariamente, os mesmos foram irrigados até alcançarem nível de umidade do solo próximo à capacidade de campo. Esta fase durou 15 dias e fez-se necessária para que as plantas se aclimassem ao novo ambiente.

Foram utilizadas folhas completamente expandidas pertencentes ao 4º ou 5º nó (contados a partir do ápice do maior ramo) e em bom estado fitossanitário (dentro do que se foi possível, devido aos efeitos do estresse hídrico), de cada parcela, para a realização das análises fisiológicas e bioquímicas. Para as análises de caráter destrutivo, as folhas foram coletadas e imediatamente armazenadas em sacos plásticos identificados, dentro de uma caixa de isopor com gelo, visando minimizar as atividades metabólicas das amostras. Feita a coleta, o material foi imediatamente transportado até o Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica da UFJF e lá os sacos plásticos contendo os materiais vegetais foram armazenados em um *freezer* (-20 °C).

## 2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS

### 2.3.1 Experimento 1

O delineamento utilizado foi em esquema fatorial 3x4, em blocos completamente casualizados e com quatro repetições por tratamento. O primeiro fator foi composto pelos três níveis de ploidia das plantas utilizadas (diploide, tetraploide ou hexaploide) e o segundo pelos quatro tempos de suspensão da irrigação aos quais as parcelas experimentais foram submetidas (0; 5; 10 ou 15 dias). No total, 48 parcelas (vasos) foram utilizadas.

Para que se fosse possível realizar as análises de trocas gasosas, o experimento foi organizado em quatro blocos, com divisões temporais entre si. Os períodos de estresse hídrico começaram em dias diferentes e terminaram ao mesmo tempo, de modo que a coleta de dados foi realizada apenas uma vez para cada um dos blocos. Além das trocas gasosas, foram analisados indicadores do *status* hídrico e acúmulo de prolina nas folhas.

### 2.3.2 Experimento 2

O Experimento 2 foi planejado de acordo com os resultados do Experimento 1, visando otimizar a condução do estudo. O delineamento utilizado foi em esquema fatorial 3x2, em blocos completamente casualizados e com três repetições. O primeiro fator foi composto pelos três níveis de ploidia das plantas utilizadas (diploide, tetraploide ou hexaploide) dos mesmos acessos citados anteriormente e o segundo pelos dois tempos de suspensão da irrigação aos quais as parcelas experimentais foram submetidas (0 ou 15 dias). No total, 18 parcelas (vasos) foram utilizadas.

Para que se fosse possível realizar as análises de trocas gasosas, o experimento foi organizado em três blocos, com divisões temporais entre si. Os períodos de estresse hídrico começaram em dias diferentes e terminaram ao mesmo tempo, de modo que a coleta de dados foi feita apenas uma vez para cada um dos blocos. Além das trocas gasosas, foram analisados a fluorescência da *clorofila a*, pigmentos fotossintéticos, carboidratos, índice SPAD, proteínas, atividades de enzimas antioxidantes e perfil de óleos essenciais.

Também se realizou uma etapa de reidratação após a imposição do déficit hídrico por 15 dias. As medições de trocas gasosas e fluorescência da *clorofila a* foram escolhidos como parâmetros a serem repetidos e as novas análises foram realizadas após 24 horas da reidratação.

## 2.4 AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS

### 2.4.1 Conteúdo relativo de água e hidratação foliar

Foram retirados três discos foliares de 0,89 cm<sup>2</sup> de cada folha e pesados, para obter-se a massa fresca (MF). Em seguida, os discos foliares foram inoculados em tubos de ensaio pequenos contendo água destilada, visando à saturação dos mesmos. Os tubos foram tampados delicadamente com gaze, de modo que os discos foliares ficassem completamente submersos. Após 24 horas, os discos foram suavemente secados (para a retirada do excesso de água) e pesados novamente, para a obtenção da massa túrgida (MT). A massa seca (MS) foi determinada após os discos foliares serem secos em estufa de circulação de ar forçada a 70 °C por 48 horas.

O conteúdo relativo de água (CRA) foi calculado com base na equação 1:

$$CRA = \left( \frac{MF-MS}{MT-MS} \right) \times 100 \quad (1)$$

O grau de hidratação foliar (HF) foi calculado com base na equação 2:

$$HF = \left( \frac{MF-MS}{MF} \right) \times 100 \quad (2)$$

### 2.4.2 Conteúdo de prolina

A quantificação do teor de prolina deu-se pelo método de Bates e colaboradores (1973), porém modificado. Do mesmo conjunto de folhas coletadas para as análises de CRA e HF, foram retirados três discos foliares de 0,89 cm<sup>2</sup> para a determinação do conteúdo de prolina nos vegetais com massa de 1,7±0,02 g. Os discos foram congelados com nitrogênio líquido e, logo em seguida, macerados manualmente e homogeneizados em 10 mL de ácido sulfossalicílico a 3% (p/v). Com o auxílio de funis, os extratos foram filtrados com papel filtro Whatman n° 2, sendo armazenados em tubos de ensaios vedados.

Para se dar início à reação de formação de cromóforos, foram adicionados em tubos de ensaio rosqueáveis: 1 mL de extrato filtrado, 1 mL de ácido sulfossalicílico a 3% (p/v), 2 mL de solução de ninidrina ácida (1,25 g de ninidrina; 30 mL de ácido acético; 20 mL de ácido

fosfórico 6 M) e 2 mL de ácido acético. Os tubos contendo as amostras foram incubados a 100 °C durante uma hora e, então, colocados em banho de gelo após este período, visando à paralisação da reação. A extração do cromóforo formado ocorreu adicionando-se 2 mL de tolueno aos tubos, com imediata agitação em vórtex. Em seguida, os tubos repousaram por um período de 30 min.

Após a separação de fases, o tolueno contendo o cromóforo foi aspirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e sua absorvância foi lida em espectrofotômetro a 520 nm. Os conteúdos de prolina nas amostras foram determinados por intermédio da curva de calibração. Todas as leituras ocorreram em triplicatas e os resultados foram expressos em miligramas de prolina por grama de massa fresca ( $\text{mg g}^{-1}$  de matéria fresca).

### 2.4.3 Trocas gasosas

Como já mencionado, as medidas de trocas gasosas foram realizadas entre 8:00 e 11:00 horas, utilizando-se um analisador de gases a infravermelho (IRGA) LI-6400-XT (Li-Cor Bioscience, Lincoln, Nebraska, USA), sob fluxo luminoso fotossintético (FLF) de  $1000 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com 15% de luz azul, a 25 °C e sob concentração fixa de  $400 \mu\text{mol}$  de  $\text{CO}_2$ . Tais medidas foram realizadas em uma folha por planta, escolhidas de acordo com os mesmos critérios de seleção para as análises do CRA e HF.

Foram mensuradas a taxa de assimilação líquida de carbono ( $A$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ), a transpiração ( $E$ ) e a concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ). A eficiência no uso da água (EUA) foi calculada em duas formas: a eficiência instantânea no uso da água foi calculada pela razão  $A E^{-1}$ , e a eficiência intrínseca no uso da água pela razão  $A g_s^{-1}$ . A eficiência de carboxilação foi obtida pela razão  $A C_i^{-1}$ .

### 2.4.4 Fluorescência da *clorofila a*

A fluorescência da *clorofila a* foi avaliada em uma folha não destacada de cada planta. Para tal, foi utilizado um fluorômetro portátil *Handy PEA* (Hansatech Instruments, UK). Antes das medições, as folhas foram aclimatadas ao escuro por 30 minutos, utilizando-se cliques foliares apropriados. Desta avaliação, a variável utilizada foi o rendimento quântico potencial máximo do fotossistema II ( $F_v F_m^{-1}$ ).

#### 2.4.5 Pigmentos fotossintéticos

No preparo das amostras, em condições de baixa luminosidade, seis discos de área 0,55 cm<sup>2</sup> foram retirados de cada folha/parcela e macerados com o auxílio de nitrogênio líquido adicionando-se uma pitada de MgCl<sub>2</sub>. O material macerado foi homogeneizado em 10 mL de acetona 80% (v/v) e filtrado em papel filtro. Os extratos de cada parcela foram completados para o volume de 25 mL em balões volumétricos. Em seguida, ocorreram as leituras em espectrofotômetro: 663 nm para *clorofila a*, 646 nm para *clorofila b* e 470 nm para carotenoides. A determinação das *clorofilas a* e *b* e dos carotenoides totais foi realizada de acordo com os cálculos propostos por Lichtenthaler (1987) e os resultados foram expressos com base na massa (mg g<sup>-1</sup> de matéria fresca).

#### 2.4.6 Carboidratos solúveis totais (CST)

Aproximadamente 100 mg de massa foliar fresca foram macerados com o auxílio de nitrogênio líquido, sendo o material obtido homogeneizado em 5 mL de água destilada. Para a extração dos CST, os extratos de cada parcela foram acondicionados em tubos rosqueáveis de 10 mL e incubados a 100 °C durante 30 minutos. Quando os tubos resfriaram, os extratos foram centrifugados a 1000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. Para a determinação dos CST de acordo com o método de Albalasmeh; Berhe e Ghezzehei (2013), o sobrenadante foi retirado e diluído para a concentração 1:50. Em seguida, ocorreram as leituras em espectrofotômetro a 315 nm, sendo que os conteúdos de CST nas amostras foram determinados por intermédio da curva de calibração. Ao final, dados obtidos foram expressos em miligrama de açúcares por grama de matéria fresca (mg g<sup>-1</sup> de matéria fresca).

#### 2.4.7 Índice SPAD

O índice SPAD foi determinado com o auxílio do clorofilômetro portátil *SPAD-502* (Konica Minolta, Japão). Para tanto, foram tomados seis pontos de cada folha para a obtenção da média de cada uma das parcelas. Estes seis pontos coincidiram com os pontos de onde foram retiradas amostras para a realização das análises de pigmentos fotossintetizantes (*clorofila a*, *clorofila b* e carotenoides).

#### 2.4.8 Perfil de óleos essenciais por cromatografia gasosa (GC-MS)

A metodologia para a análise de óleos essenciais seguiu de forma similar ao descrito no trabalho de Julião (2017), com algumas modificações. As amostras foliares (uma folha de cada planta, pesando aproximadamente 300 mg) foram pesadas em um frasco de vidro e em seguida 500 µL de metanol destilado foram adicionados ao mesmo frasco. Cada amostra foi macerada com um bastão de vidro e 1 mL de hexano foi adicionado. Os frascos foram tampados e então as amostras foram levadas ao banho ultrassônico, onde foram deixadas por 1 hora. Algumas amostras se mostraram com o aspecto mais seco, podendo ser devido a evaporação do hexano. A fim de padronizar o processo, mais 500 µL de Hexano grau GC foi adicionado a todos os frascos. Por fim, foi adicionado uma pequena porção de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro a cada frasco para remoção de água e foi feita uma filtração usando algodão diretamente no *vial* de análise, os quais foram diretamente levados ao cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (GCMS-QP2010 Plus; Shimadzu).

Foi utilizada uma coluna Rtx-5MS<sup>®</sup> (Restek) de 30 m x 0,25 mm. A programação da temperatura do forno começou numa temperatura inicial de 70 °C, mantida por 3 min, seguida por um aumento de 6 °C min<sup>-1</sup> até 300 °C. O injetor foi operado no modo *split* (1:10), à temperatura de 240 °C, a interface e o detector de massas operaram a 300 °C. Utilizou-se hélio como gás de arraste, com fluxo de 1,53 mL min<sup>-1</sup>. Uma mistura padrão de hidrocarbonetos lineares (C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>; C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>: ... C<sub>25</sub>H<sub>52</sub> e C<sub>26</sub>H<sub>54</sub>) foi injetada nas mesmas condições das amostras. A identificação dos constituintes foi realizada comparando-se os espectros de massa obtidos com os do banco de dados da NIST 9.0 (correlação > 97%) e confirmado pelo seu índice de retenção (Índice de Kováts) calculado para cada constituinte e comparado aos dados na literatura (ADAMS, 2007). As concentrações de cada um dos compostos (expressas em porcentagem) foram calculadas de acordo com as áreas dos picos dos resultados.

#### 2.4.9 Proteínas, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POX)

Aproximadamente 300 mg de matéria foliar fresca de cada parcela foi macerada com o auxílio de nitrogênio líquido. Foram adicionados 20 mg de polivinilpolipirrolidona antes da homogeneização, que foi realizada com 10 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 6,8), acrescido por ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM e fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM (Peixoto et al., 1999).

A determinação das proteínas ocorreu de acordo com o método de Lowry e colaboradores (1951). Para tanto, foram utilizados os reagentes: **A**, constituído de 0,5% (p/v) de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  em 1% (p/v) de citrato de sódio e **B**: composto de 2% (p/v) de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  em  $\text{NaOH}$  0,1 N. O reagente **C** foi preparado pela mistura da proporção de 50:1 (v/v) dos reagentes **B** e **A**, respectivamente. O reagente **D** foi constituído do reagente Folin-Ciocalteu, diluído a 50% (v/v) em água destilada. Em seguida ao preparo dos reagentes, 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto foram acrescidos de 2,5 mL do reagente **C**. Houve agitação suave e deixou-se a mistura em repouso por 10 min à temperatura ambiente. Após esse período, foi feita a adição de 0,25 mL do reagente **D**, com agitação em vórtex, seguida de repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Logo após, cada amostra foi lida em um espectrofotômetro a 735 nm, sendo o teor de proteínas determinado por intermédio de curva de calibração, utilizando BSA (albumina de soro bovino) 1  $\text{mg mL}^{-1}$  como padrão.

A atividade da enzima peroxidase foi analisada pelo método de Kar e Mishra (1976), com coeficiente de extinção molar de 2,47  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (CHANCE; MAEHLI, 1955). Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto foram adicionadas a 4,9 mL de uma mistura de reação contendo: tampão de fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8 + pirogalol 20 mM +  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 mM. Após incubação da solução por um minuto a 25°C, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5% (v/v), sendo a absorbância da solução, então, lida em espectrofotômetro a 420 nm, contra o controle, no qual a enzima foi previamente inativada pela adição de 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5% (v/v). A atividade foi estimada pela determinação da quantidade de purpurogalina formada.

A catalase teve sua atividade avaliada conforme o trabalho de Havir e McHale (1987), com o coeficiente de extinção molar de 36  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ , sugerido por Anderson; Prasad e Stewart (1995). Para tanto, houve a adição de 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de  $\text{H}_2\text{O}_2$  12,5 mM em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, a 30 °C (Havir & McHale, 1987). A atividade enzimática foi determinada pela estimativa do consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , considerando o decréscimo na absorbância a 240 nm.

A atividade da superóxido dismutase foi determinada conforme Del Longo e colaboradores (1993), sendo uma unidade de SOD corresponde à quantidade de enzima que promove 50% de inibição na fotorredução do azul de *p*-nitro tetrazólio (NBT) (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). À mistura de reação constituída de metionina 13 mM, NBT 75  $\mu\text{M}$ , EDTA 100 nM e riboflavina 2  $\mu\text{M}$ , em tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto. A reação foi conduzida a 25 °C numa câmara de reação

sob a iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. A reação foi iniciada pela ligação da lâmpada fluorescente e, após 4 minutos, interrompida pelo desligamento da mesma. A produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT, foi medida pela determinação do incremento na absorbância a 560 nm, subtraído do controle, no qual a mistura de reação foi mantida no escuro.

Os dados foram expressos de acordo com a atividade específica de cada enzima.

## 2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software livre RStudio, na versão 1.1.383; com os pacotes ScottKnott, Cowplot, car, vegan, factoextra, rgl e ggplot2 (R CORE TEAM, 2013).

### 2.5.1 Análises univariadas

Cada variável mensurada foi submetida aos testes de homogeneidade das variâncias (Teste de Levene) e de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) dos resíduos da Análise de Variância de dois fatores (*Two-way Anova*). Aquelas que não atenderam aos pressupostos foram transformadas em  $\ln(x)$  e esta transformação foi suficiente para normalizar todos os casos. Para as variáveis com diferenças significativas de médias entre as populações ( $p\text{-valor} < 0,05$ ) do Experimento 1, foi aplicado o Teste de Scott-Knott. Para o Experimento 2 foi aplicado o Teste t a 5% de probabilidade.

Na etapa de reidratação das plantas, primeiramente as médias das variáveis analisadas foram comparadas pelo Teste t Pareado a 5% de probabilidade, visando o estabelecimento do contraste de antes e após a reidratação. Aquelas que apresentaram diferenças significativas foram comparadas com os resultados do grupo controle pelo Teste t a 5% de probabilidade.

O Teste de Scott-Knott também foi empregado sobre os resultados das análises de óleos essenciais, nas mesmas condições já descritas para o Experimento 1.

### 2.5.2 Análises multivariadas

Os dados obtidos nos experimentos 1 e 2 foram submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA) com uma matriz de correlação para a verificação das respostas fisiológicas como um todo (em termos de variância) e para a identificação das principais variáveis utilizadas

no estudo, além do agrupamento das parcelas de cada tratamento. A PCA também foi empregado para a visualização do estado fisiológico das plantas após a reidratação.

Para as análises dos resultados dos óleos essenciais obtidas por cromatografia gasosa, os dados também foram submetidos à PCA (mas com 3 eixos) e à análise de agrupamento (*cluster analysis*), utilizando-se o algoritmo UPGMA e utilizando a distância de Gower como índice de similaridade.

### 3 RESULTADOS

Morfologicamente, o déficit hídrico aos 15 dias de suspensão da irrigação pareceu afetar mais severamente as plantas de acordo com o aumento do nível de ploidia, em ambos os experimentos. Ou seja, as plantas diploides aparentaram estar menos murchas e as hexaploides mais murchas, ao passo que as tetraploides exibiram um padrão de murcha intermediário. No entanto, os resultados das variáveis analisadas estatisticamente não apresentaram os mesmos padrões, já que o incremento no nível de ploidia não foi um fator que interferiu em suas variações.

#### 3.1 EXPERIMENTO 1

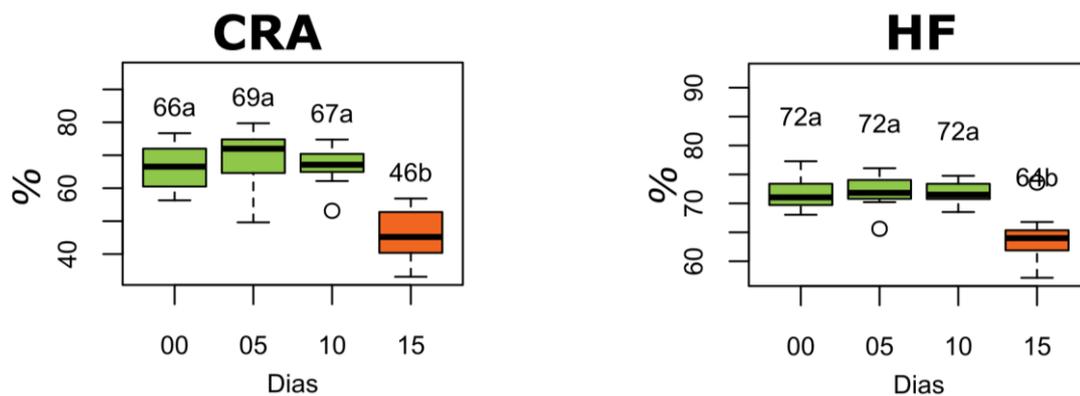
Para nenhuma das variáveis estudadas houve significância dos blocos em relação aos resultados das análises estatísticas, confirmando a eficácia do *design* experimental empregado. Em nenhum dos casos houve interação entre os fatores ploidia e tempo de desidratação. Somente para o fator tempo de suspensão da irrigação houve diferenças significativas entre os tratamentos. Com exceção da variável  $A E^{-1}$ , todas as demais apresentaram diferenças significativas somente entre o tratamento de 15 dias de desidratação contínua e os outros tempos de suspensão da irrigação. Além disso, para cada variável, os valores das médias dos tratamentos que não diferiram entre si ficaram muito próximos.

Como entre os tratamentos de 10 e 15 dias de limitação hídrica há um intervalo de cinco dias, não há como se determinar exatamente em qual dia houve o início do estresse. Todavia, é possível afirmar que, nas condições estudadas, 10 dias de desidratação do solo não foram suficientes para que a capacidade de campo caísse a um nível que afetasse significativamente os parâmetros fisiológicos e metabólicos estudados nas plantas de *L. alba* utilizadas neste trabalho.

### 3.1.1 Conteúdo relativo de água e hidratação foliar

Como apresentado nos gráficos da Figura 1, as plantas que ficaram sob 15 dias de desidratação apresentaram, em relação aos controles, queda de 12% e 43%, em média, no CRA e HF, respectivamente.

**Figura 1** – *Boxplots* que representam o comportamento das variáveis fisiológicas conteúdo relativo de água (CRA) e hidratação foliar (HF) estudadas em plantas de *Lippia alba* sob 0; 5; 10 ou 15 dias de suspensão da irrigação. Círculos representam os *outliers*.\*

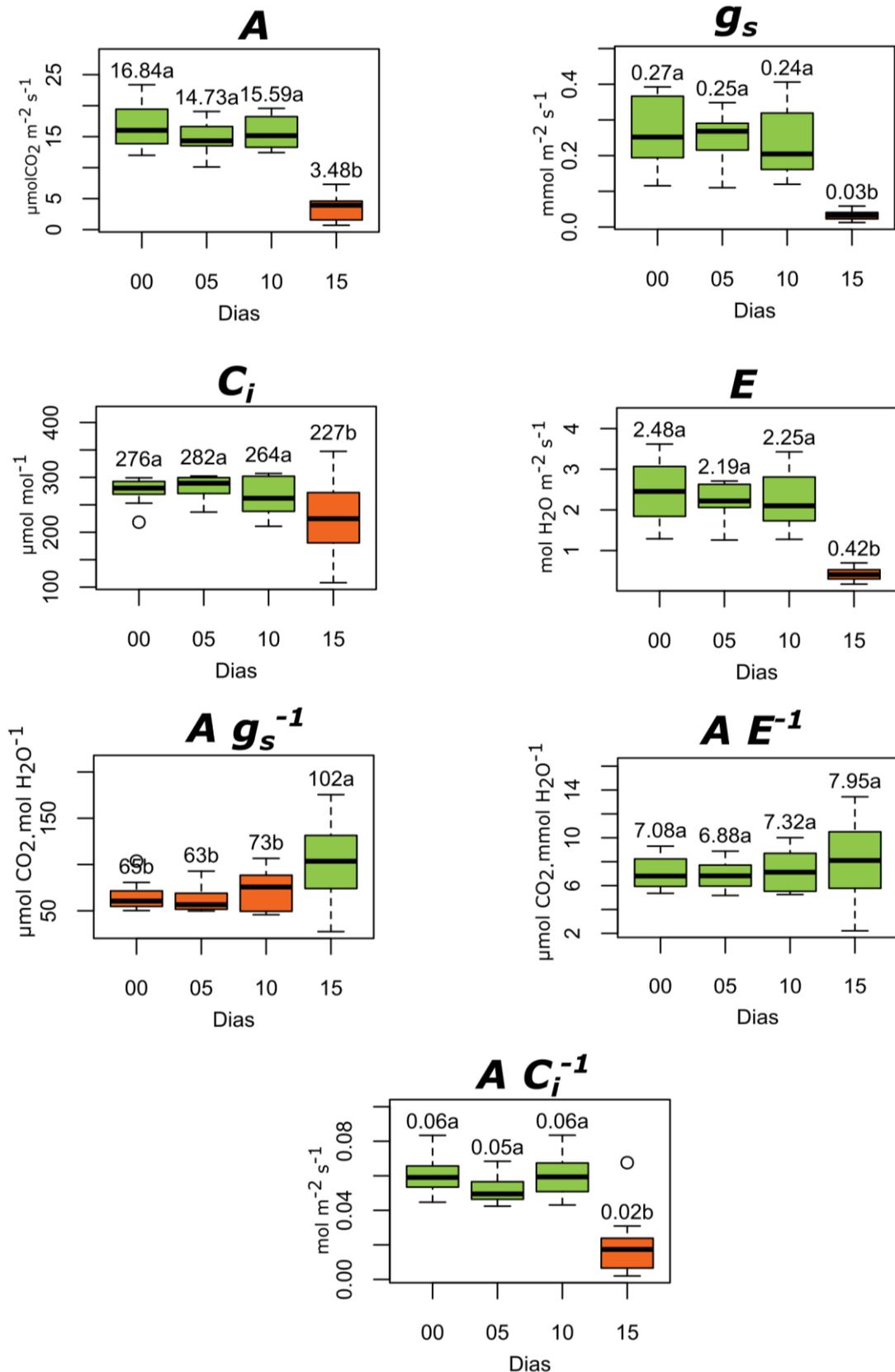


\*As médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, sendo que as que são seguidas das mesmas letras pertencem a um mesmo grupo.

### 3.1.2 Trocas gasosas

A Figura 2 apresenta os resultados estatísticos referentes às trocas gasosas.

**Figura 2** – Boxplots que representam o comportamento das variáveis fisiológicas de trocas gasosas estudadas em plantas de *Lippia alba* sob 0; 5; 10 ou 15 dias de suspensão da irrigação. Círculos representam os outliers.\*



\*As médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, sendo que as que são seguidas das mesmas letras pertencem a um mesmo grupo. A = taxa fotossintética líquida;  $g_s$  = condutância estomática;  $C_i$  =

conteúdo interno de carbono;  $E$  = transpiração;  $A g_s^{-1}$  = eficiência intrínseca no uso da água;  $A E^{-1}$  = eficiência no uso instantâneo da água;  $A C_i^{-1}$  = eficiência de carboxilação.

O estresse hídrico causou redução na  $A$ . Em relação ao controle, a queda média foi de quase 5 vezes aos 15 dias de desidratação contínua. Assim como observado para  $A$ , as médias de  $g_s$  e  $E$  também foram afetadas pelo estresse hídrico. Observamos que aos 15 dias de suspensão da irrigação a  $g_s$  foi 9 vezes menor em relação ao controle e que os dados ficaram menos dispersos para este tratamento. O mesmo ocorreu com a  $E$ , sendo que esta reduziu em aproximadamente 6 vezes em relação às plantas mantidas em solo sempre úmido.

O déficit hídrico reduziu a média do  $C_i$ , fazendo com que o tratamento de 15 dias de suspensão da irrigação ficasse 22% menor que o controle, além de resultar em dados mais dispersos.

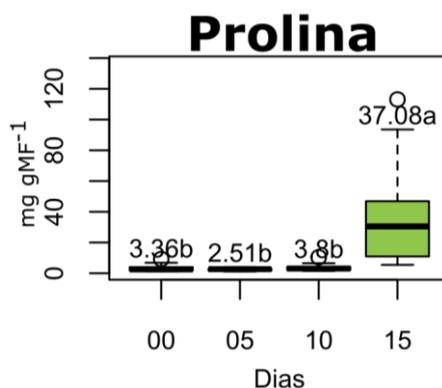
A  $A g_s^{-1}$  apresentou elevação da média no tratamento de 15 dias de desidratação contínua, chegando a ser 40% superior ao controle e com maior variação nos dados. Apesar de o tratamento de 15 dias de suspensão da irrigação apresentar a maior média para a  $A E^{-1}$  e maior variação dos dados, não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação a esta variável. A média de  $A C_i^{-1}$  foi 3 vezes menor do que o controle utilizado.

As variáveis  $E$  e  $g_s$  apresentaram um padrão muito parecido ao longo do tempo. No entanto, as razões  $A E^{-1}$  e  $A g_s^{-1}$  apresentaram estatísticas distintas, uma vez que a média de  $A E^{-1}$  aos 15 dias de suspensão da irrigação não diferiu dos demais tratamentos. Como  $E$  e  $g_s$  são dois processos muito próximos e correlacionados, acreditamos que a diferença no comportamento entre  $A E^{-1}$  e  $A g_s^{-1}$  tenha ocorrido por um acaso aleatório mínimo na coleta dos valores, mas suficiente para que a diferença estatística significativa não aparecesse. Mesmo sem diferença estatística, a média da  $A E^{-1}$  foi maior do que as médias dos demais tratamentos.

### 3.1.3 Conteúdo de prolina

Conforme apresentado no gráfico da Figura 3, podemos inferir que a média do conteúdo de prolina em folhas de plantas de *L. alba* submetidas a 15 dias sem irrigação foi 11 vezes maior em relação ao controle. Além disso, a variação total dos dados com 15 dias sem irrigação foi muito mais ampla em comparação aos demais tratamentos.

**Figura 3** – *Boxplots* que representam o comportamento da variável fisiológica prolina estudada em plantas de *Lippia alba* sob 0; 5; 10 ou 15 dias de suspensão da irrigação. Círculos representam os *outliers*.\*



\* As médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, sendo que as que são seguidas das mesmas letras pertencem a um mesmo grupo.

### 3.1.4 Análise de componentes principais

Os dois primeiros componentes explicaram 88,6% da variação total dos dados e foram os únicos que apresentaram seus autovalores acima de 0,7 (Tabela 1). Para o primeiro componente (PC1) as variáveis  $E$  e  $g_s$  foram as de maior peso, respectivamente; sendo que  $A$  apresentou um peso muito próximo. Já para o segundo componente (PC2),  $A E^{-1}$  foi a variável de maior peso.

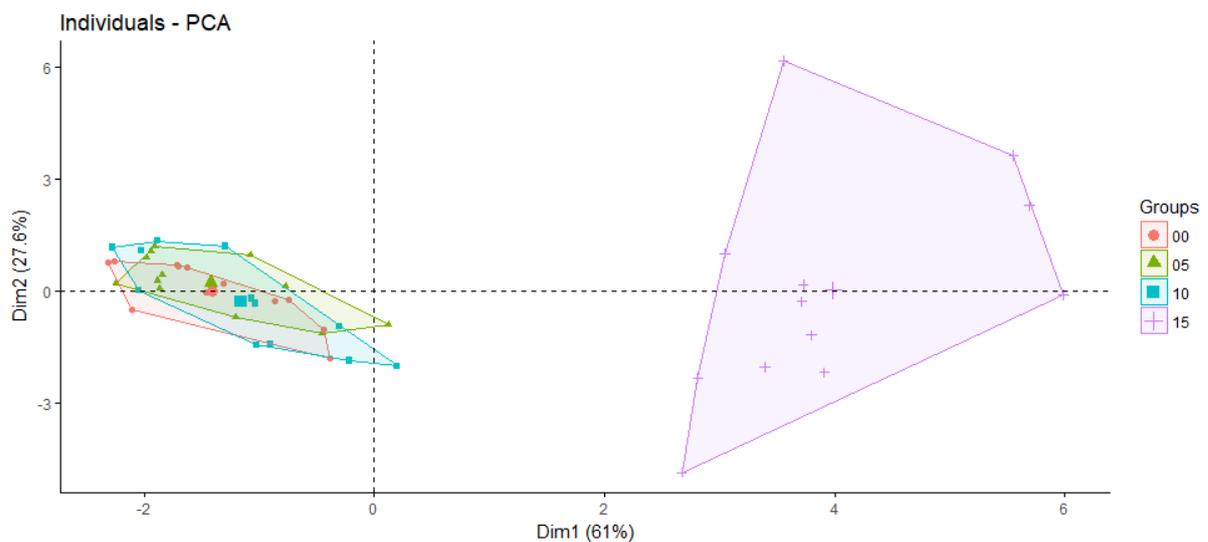
**Tabela 1** – Coeficientes de correlação entre os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2, respectivamente) e as variáveis analisadas, de plantas de *Lippia alba* sob 0; 5; 10 ou 15 dias de suspensão da irrigação.

Variáveis*	Componentes principais	
	PC1	PC2
CRA	0,355	0,077
HF	0,334	0,044
$A$	0,374	0,198
$g_s$	0,397	-0,017
$C_i$	0,195	-0,497
$E$	0,397	-0,007
Prolina	-0,339	-0,018
$A g_s^{-1}$	-0,204	0,511
$A E^{-1}$	-0,033	0,583
$A C_i^{-1}$	0,334	0,322
Variância (%)	61	27,6
Variância acumulada (%)	61	88,6

\*CRA = conteúdo relativo de água, HF = hidratação foliar;  $A$  = taxa fotossintética líquida;  $g_s$  = condutância estomática;  $C_i$  = conteúdo interno de carbono;  $E$  = transpiração;  $A g_s^{-1}$  = eficiência intrínseca no uso da água;  $A E^{-1}$  = eficiência do uso instantâneo no uso da água;  $A C_i^{-1}$  = eficiência de carboxilação.

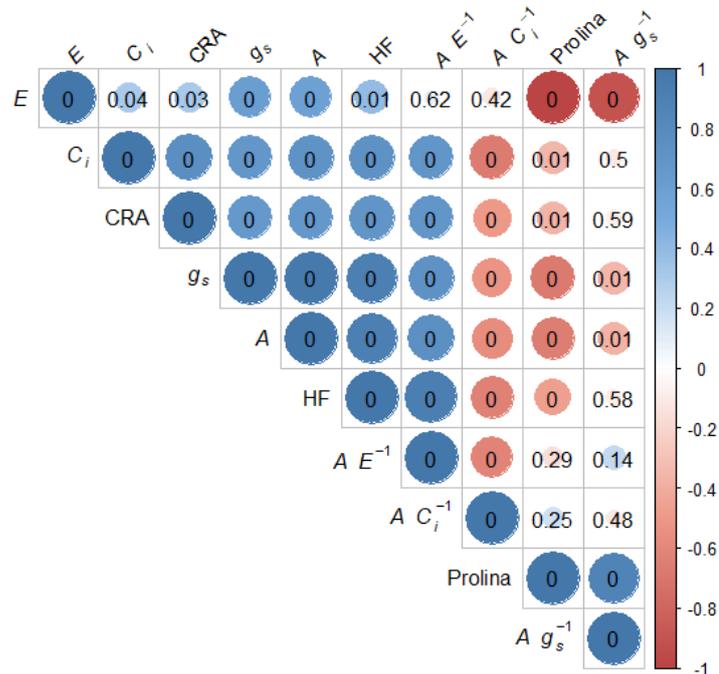
A análise do gráfico *score plot* da Figura 4 permitiu verificar que o tempo de desidratação influenciou na variação das respostas fisiológicas, mas a poliploidia não, corroborando os resultados obtidos pelas análises de variância univariadas. Também ficou claro que somente as plantas do tratamento 15 dias de suspensão da irrigação diferiram das demais nas respostas fisiológicas, formando um grupo à parte, além de apresentarem-se distribuídos de forma mais dispersa.

**Figura 4** – Gráfico *score plot* dos indivíduos de *Lippia alba* avaliados sob 0; 5; 10 ou 15 dias de suspensão da irrigação.



A matriz de correlação entre as variáveis respostas estudadas está representada na Figura 5. Nesta figura é possível observar que as variáveis de EUA e prolina se correlacionam de forma negativa às demais variáveis avaliadas. Além disso, na maioria dos casos, o grau de significância se manteve diretamente proporcional ao percentual de explicação ( $r^2$ ) das correlações. Ou seja, variáveis pouco correlacionadas não geraram correlações significativas (levando-se em consideração um p-valor de 0,05).

**Figura 5** – Matriz de correlação entre as variáveis fisiológicas estudadas em plantas de *Lippia alba* sob 0; 5; 10 ou 15 dias de suspensão da irrigação. \*



\*O tamanho, cor (vermelho ou azul) e intensidade de cor representam o quanto as variáveis são correlacionadas ( $r^2$  de Pearson). Os números dentro dos quadrados representam a significância da correlação (p-valor). CRA = conteúdo relativo de água, HF = hidratação foliar; A = taxa fotossintética líquida;  $g_s$  = condutância estomática;  $C_i$  = conteúdo interno de carbono; E = transpiração;  $A g_s^{-1}$  = eficiência intrínseca no uso da água;  $A E^{-1}$  = eficiência do uso instantâneo no uso da água;  $A C_i^{-1}$  = eficiência de carboxilação.

## 3.2 EXPERIMENTO 2

Assim como para o Experimento 1, não houve o efeito do nível de poliploidia e nem dos blocos sobre os resultados obtidos. Somente o tempo de desidratação levou à diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos utilizados. Portanto, o *design* experimental empregado foi eficiente.

### 3.2.1 Trocas gasosas

Mesmo com a diferença de períodos experimentais, as médias dos parâmetros avaliados em comum nos dois experimentos (trocas gasosas) ficaram muito próximas, para os tratamentos de 0 e 15 dias de suspensão da irrigação, conforme pode ser verificado na Tabela 2. Esse fato deve-se, provavelmente, à uniformidade das condições ambientais avaliadas (através de dados de temperatura e umidade supracitados). Também na Tabela 2 é possível observar a taxa de variação entre as variáveis analisadas em ambos experimentos. Os valores das taxas foram

obtidos dividindo-se o valor da variável aos 0 dias de suspensão da irrigação (tratamento controle) pelo valor da variável aos 15 dias de suspensão da irrigação e subtraindo-se 1 do resultado, dentro de cada experimento.

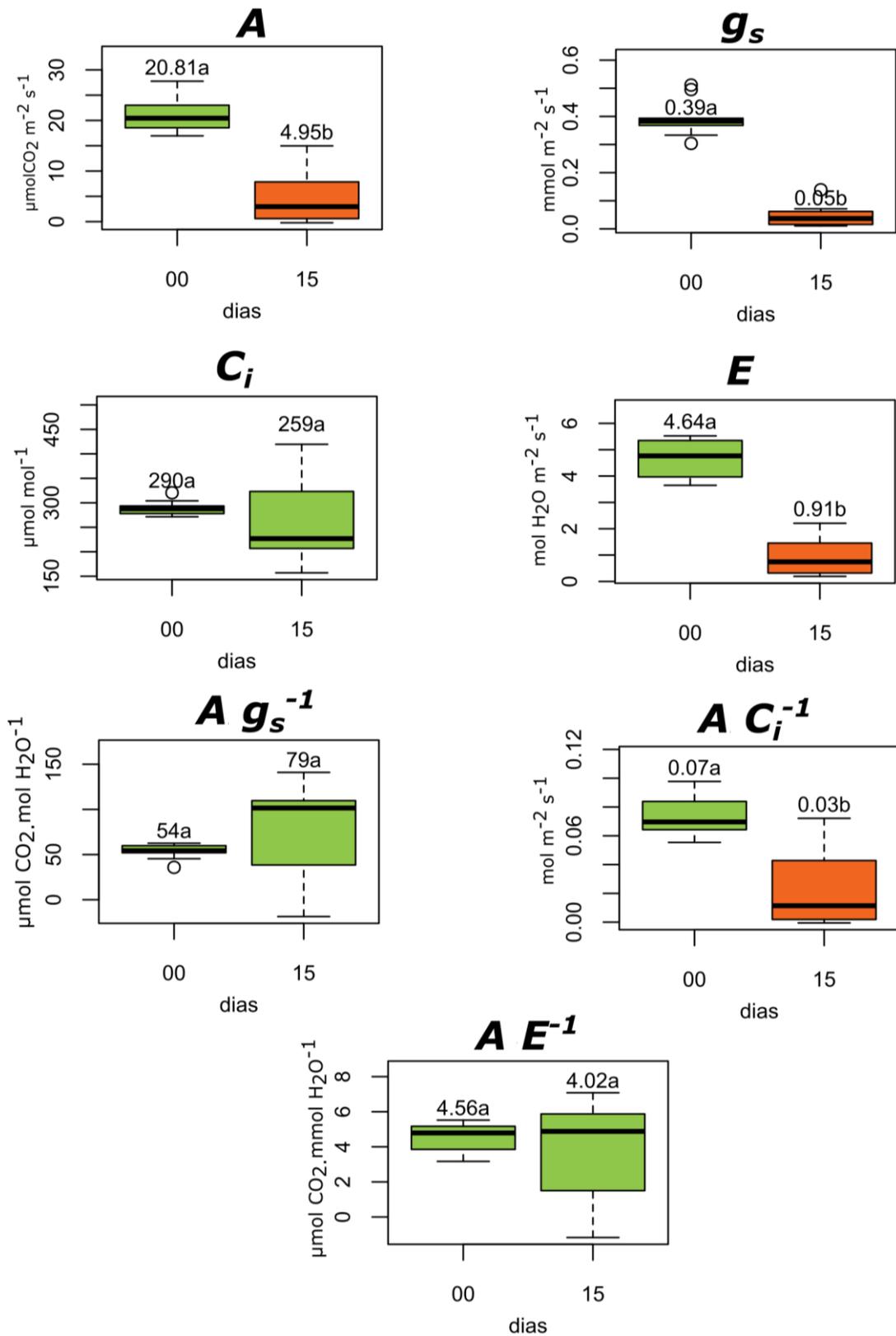
**Tabela 2** – Médias das variáveis analisadas em comum nos experimentos 1 e 2, de plantas de *Lippia alba* sob 0 ou 15 dias de déficit hídrico, e suas taxas de variação\*.

Tratamento	$A$	$g_s$	$C_i$	$E$	$A g_s^{-1}$	$A C_i^{-1}$	$A E^{-1}$
0 exp 2	20,81	0,39	289,53	4,64	53,51	0,07	4,56
0 exp 1	16,84	0,27	276,07	2,48	65,32	0,06	7,08
15 exp 2	4,95	0,05	258,68	0,91	79,34	0,03	4,02
15 exp 1	3,48	0,03	227,22	0,42	102,01	0,02	7,95
Var exp 2	3,20	6,80	0,12	4,10	-0,33	1,33	0,13
Var exp 1	3,84	8,00	0,21	4,90	-0,36	2,00	-0,11

\*  $A$  = taxa fotossintética líquida ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $g_s$  = condutância estomática ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $C_i$  = conteúdo interno de carbono ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ );  $E$  = transpiração ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $A g_s^{-1}$  = eficiência intrínseca no uso da água ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ );  $A E^{-1}$  = eficiência instantânea no uso da água ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O}^{-1}$ );  $A C_i^{-1}$  = eficiência de carboxilação ( $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); 0 exp 2 = controle do Experimento 2; 0 exp 1 = controle do Experimento 1; 15 exp 2 = 15 dias de suspensão da irrigação do Experimento 2; 15 exp 1 = 15 dias de suspensão da irrigação do Experimento 1; Var exp 2 = taxa de variação no Experimento 2; Var exp 1 = taxa de variação no Experimento 1.

Assim, ficou demonstrada a compatibilidade de comparação entre os resultados obtidos nos dois experimentos, pois os parâmetros de trocas gasosas possuem um alto poder de explicação e possuíram comportamentos e valores próximos nos dois experimentos. Os gráficos que contêm as informações estatísticas sobre as trocas gasosas encontram-se na Figura 6.

**Figura 6** – Boxplots que representam o comportamento das variáveis fisiológicas de trocas gasosas estudadas em plantas de *Lippia alba* sob 0 ou 15 dias de suspensão da irrigação. Círculos representam os outliers.\*



\*As médias foram agrupadas pelo Teste t a 5% de probabilidade, sendo que as que são seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem entre si. A = taxa fotossintética líquida;  $g_s$  = condutância estomática;  $C_i$  = conteúdo interno

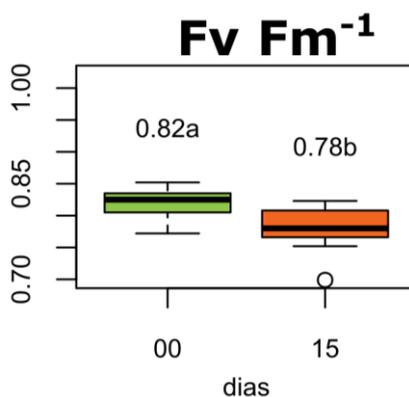
de carbono;  $E$  = transpiração;  $A \text{ g}_s^{-1}$  = eficiência intrínseca no uso da água;  $A E^{-1}$  = eficiência do uso instantâneo no uso da água;  $A C_i^{-1}$  = eficiência de carboxilação.

Ainda sobre as trocas gasosas, somente as variáveis  $C_i$ ,  $A \text{ g}_s^{-1}$  e  $A E^{-1}$  não apresentaram variações significativas entre os tratamentos empregados. Aos 15 dias de suspensão da irrigação, estas apresentaram maiores valores de desvio padrão.

### 3.2.3 Fluorescência da *clorofila a*

De acordo com os resultados mostrados na Figura 7, houve uma queda estatisticamente significativa de 5% no rendimento quântico máximo do fotossistema II das plantas estressadas. Em ambos os tratamentos a dispersão total dos dados foi baixa.

**Figura 7** – *Boxplots* que representam o comportamento da variável fisiológica rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v F_m^{-1}$ ) estudada em plantas de *Lippia alba* sob 0 ou 15 dias de suspensão da irrigação. Círculos representam os *outliers*. \*

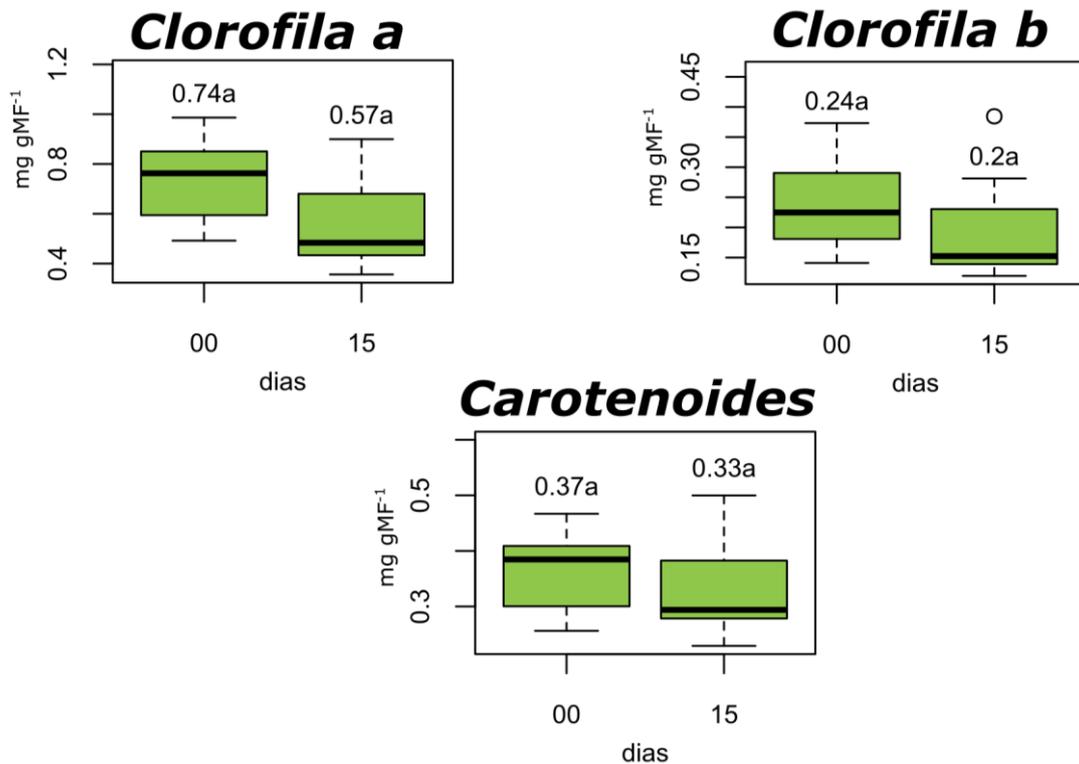


\*As médias foram comparadas pelo Teste t a 5% de probabilidade, sendo que as que são seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem entre si.

### 3.2.4 Pigmentos fotossintéticos

O déficit hídrico causou queda na concentração para as três classes de pigmentos fotossintéticos analisados, embora nenhuma delas tenha sido significativa. Os resultados encontram-se na Figura 8.

**Figura 8** – *Boxplots* que representam o comportamento das variáveis fisiológicas *clorofila a*, *clorofila b* e carotenoides totais estudadas em plantas de *Lippia alba* sob 0 ou 15 dias de suspensão da irrigação. Círculos representam os *outliers*.\*



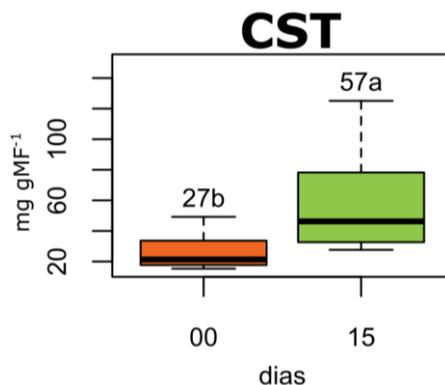
\*As médias foram comparadas pelo Teste t a 5% de probabilidade, sendo que as que são seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem entre si.

A queda de maiores proporções foi a da *clorofila a*, que reduziu em 23%. A *clorofila b* e os carotenoides totais reduziram em 16% e 11%, respectivamente.

### 3.2.5 Carboidratos solúveis totais

Frente ao déficit hídrico, a concentração de CST aumentou em 54%, com dados mais dispersos apenas no tratamento de 15 dias de suspensão da irrigação (Figura 9), sendo verificada a diferença estatística entre os tratamentos.

**Figura 9** – *Boxplots* que representam o comportamento da variável fisiológica carboidratos solúveis totais (CST) estudada em plantas de *Lippia alba* sob 0 ou 15 dias de suspensão da irrigação.

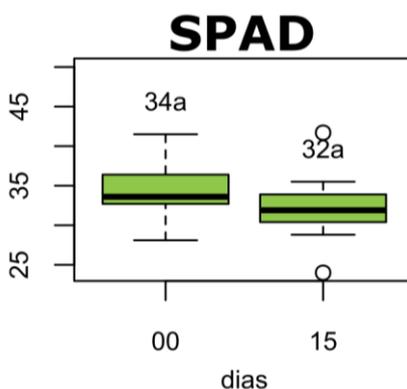


\*As médias foram comparadas pelo Teste t a 5% de probabilidade, sendo que as que são seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem entre si.

### 3.2.6 Índice SPAD

Embora o índice SPAD tenha sido 7% menor aos 15 dias de suspensão da irrigação, a diferença entre tratamentos não foi estatisticamente significativa, sendo que os valores médios ficaram muito próximos (Figura 10).

**Figura 10** – *Boxplots* que representam o comportamento da variável fisiológica índice SPAD estudada em plantas de *Lippia alba* sob 0 ou 15 dias de suspensão da irrigação. Círculos representam os *outliers*.\*



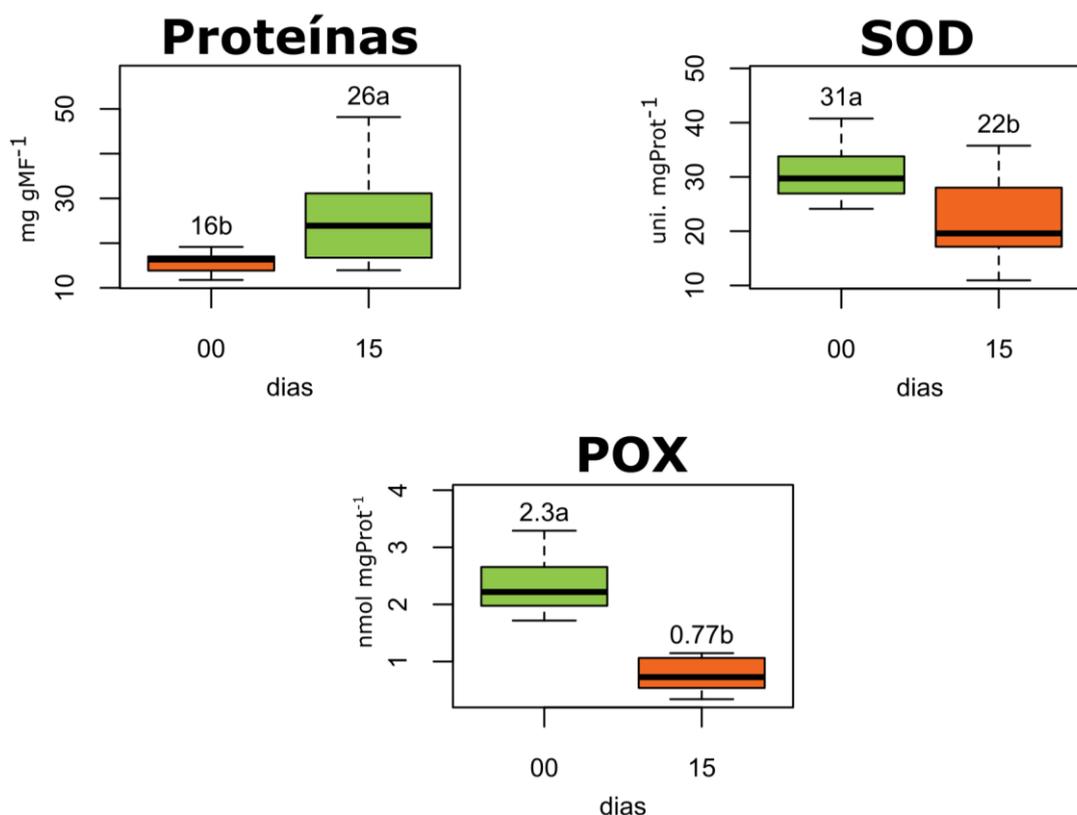
\*As médias foram comparadas pelo Teste t a 5% de probabilidade, sendo que as que são seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem entre si.

Em complemento, houve uma notável correlação entre o índice SPAD e a *clorofila a* ( $r^2=0,72$ ;  $p$ -valor = 0,001), sendo menos correlacionado à *clorofila b* ( $r^2=0,67$ ;  $p$ -valor = 0,002). Vale destacar, ainda, a correlação deste parâmetro com  $F_v F_m^{-1}$ , de  $r^2=0,65$  ( $p$ -valor = 0,004); e com os carotenoides, de  $r^2=0,60$  ( $p$ -valor = 0,008).

### 3.2.7 Proteínas, catalase, superóxido dismutase e peroxidase

A variação total da concentração das proteínas foi muito similar à dos carboidratos, com um aumento estatisticamente significativo de 38% sob déficit hídrico (Figura 11). Portanto, a correlação entre ambas foi alta, de  $r^2=0,86$ .

**Figura 11** – *Boxplots* que representam o comportamento das variáveis fisiológicas conteúdo de proteínas e atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POX) estudadas em plantas de *Lippia alba* sob 0 ou 15 dias de suspensão da irrigação.\*



\*As médias foram comparadas pelo Teste t a 5% de probabilidade, sendo que as que são seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem entre si.

Não foi detectada atividade para a catalase em nenhum dos grupos estudados. A atividade específica da superóxido dismutase caiu em 41% devido ao estresse hídrico, sendo esta queda estatisticamente significativa. Ao mesmo passo, houve a redução da atividade da peroxidase, sendo que a sua queda foi de duas vezes em relação ao grupo controle.

### 3.2.8 Análise de componentes principais

Os dois primeiros componentes (PC1 e PC2) explicaram 78,5% da variação total dos dados e foram suficientes para uma eficiente análise dos dados (Tabela 3). Para o PC1, a variável  $A C_i^{-1}$  foi a de maior peso, seguida de perto pela  $A$ . Já para o PC2, a variável *Clorofila b* foi a de maior peso.

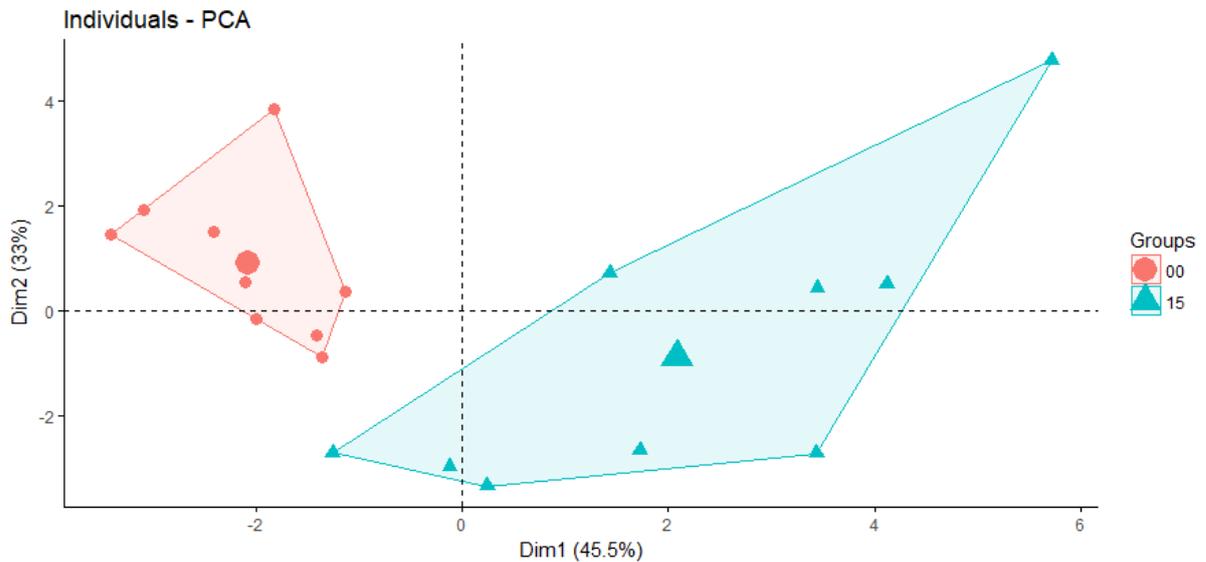
**Tabela 3** – Coeficientes de correlação entre os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2, respectivamente) e as variáveis analisadas, de plantas de *Lippia alba* sob 0 ou 15 dias de suspensão da irrigação.

Variáveis*	Componentes principais	
	PC1	PC2
<i>A</i>	-0,347	0,057
$g_s$	-0,316	0,163
$C_i$	0,113	0,358
<i>E</i>	-0,315	0,092
$A g_s^{-1}$	-0,080	-0,362
$A C_i^{-1}$	-0,349	-0,023
$A E^{-1}$	-0,245	-0,247
Fv Fm <sup>-1</sup>	-0,221	0,211
<i>Clorofila a</i>	-0,090	0,383
<i>Clorofila b</i>	0,008	0,406
Carotenóides	0,023	0,388
CST	0,311	0,157
Índice SPAD	-0,086	0,280
Proteínas	0,328	0,129
Sod	-0,321	-0,010
Pod	-0,326	0,119
Variância (%)	45,5	33,0
Variância acumulada (%)	45,5	78,5

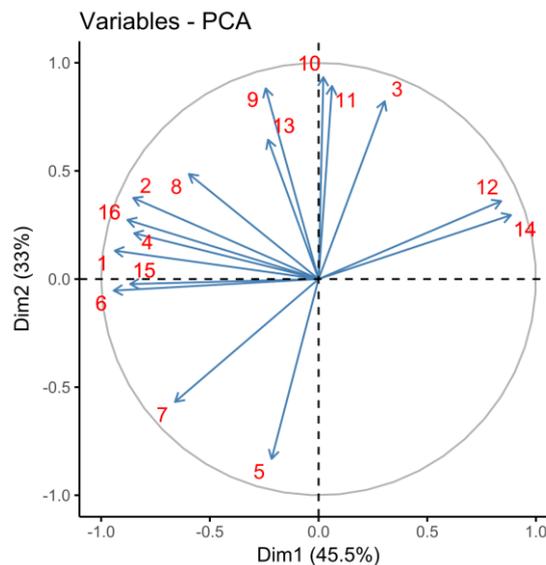
\**A* = taxa fotossintética líquida;  $g_s$  = condutância estomática;  $C_i$  = conteúdo interno de carbono; *E* = transpiração;  $A g_s^{-1}$  = eficiência intrínseca no uso da água;  $A E^{-1}$  = eficiência do uso instantâneo no uso da água;  $A C_i^{-1}$  = eficiência de carboxilação; Fv Fm<sup>-1</sup> = rendimento quântico potencial máximo do fotossistema II; CST = carboidratos solúveis totais; Sod = superóxido dismutase; Pod = peroxidase.

Na Figura 12 encontra-se o gráfico *score plot* referente aos resultados da PCA, enquanto na Figura 13 há o *loading plot* da mesma.

**Figura 12** – Gráfico *score plot* dos indivíduos de *Lippia alba* avaliados sob 0 ou 15 dias de suspensão da irrigação.



**Figura 13** – Gráfico *loading plot* das variáveis\* fisiológicas estudadas em plantas de *Lippia alba* sob 0 ou 15 dias de suspensão da irrigação.



\*1 =  $A$  (taxa fotossintética líquida), 2 =  $g_s$  (condutância estomática), 3 =  $C_i$  (conteúdo interno de  $CO_2$ ), 4 =  $E$  (transpiração), 5 =  $A g_s^{-1}$  (eficiência intrínseca no uso da água), 6 =  $A C_i^{-1}$  (eficiência de carboxilação), 7 =  $A E^{-1}$  (eficiência instantânea no uso da água), 8 =  $F_v F_m^{-1}$  (rendimento quântico potencial máximo do fotossistema II), 9 = *clorofila a*, 10 = *clorofila b*, 11 = carotenoides totais, 12 = carboidratos solúveis totais, 13 = Índice SPAD, 14 = proteínas, 15 = superóxido dismutase, 16 = peroxidase.

A maioria das variáveis estudadas compõe o PC1, sendo que apenas  $C_i$ ,  $A g_s^{-1}$ ,  $A E^{-1}$ , *Clorofila a*, *Clorofila b*, *Carotenoides* e o índice SPAD compõem o PC2. Apesar de as proteínas e os CST comporem o PC1, estes o fazem de forma antagônica às demais variáveis do eixo. O

mesmo comportamento ocorreu em relação às EUA e as demais variáveis do PC2, com destaque para o antagonismo entre  $A g_s^{-1}$  e  $C_i$ .

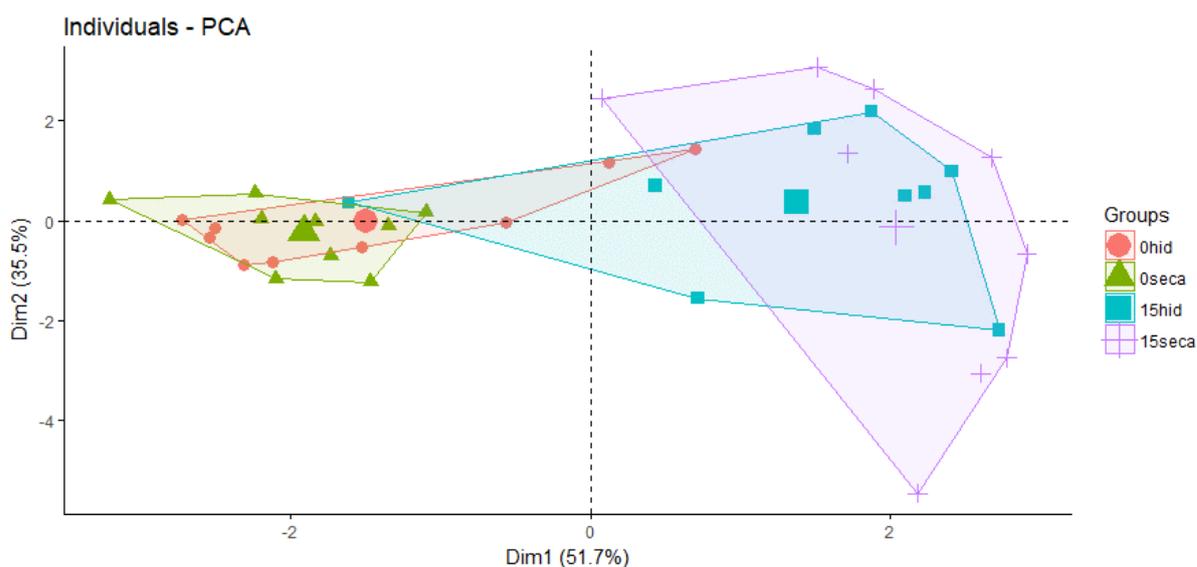
Portanto, as proteínas e os CST (localizados à direita do PC1) foram as variáveis mais significativas para o entendimento fisiológico de *L. alba* sob condições de estresse hídrico. Já as variáveis localizadas à esquerda do PC1 (grande maioria) definem melhor o comportamento de *L. alba* sob condições de cultivo não estressantes.

É interessante notar que, mais uma vez, a  $C_i$  se correlacionou de maneira forte e negativa com as EUA, principalmente com  $A g_s^{-1}$ . Além disso, as EUA mais uma vez apresentaram comportamentos distintos entre si, embora mais destacados nesta etapa experimental.

### 3.2.9 Reidratação

Ainda que com algumas interferências, ficou claro pelo gráfico *score plot* da Figura 14 que as plantas que não passaram por nenhum tipo de estresse hídrico formaram um grupo separado das estressadas, que formaram outro. Dentro do grupo das plantas que passaram pelo déficit hídrico, há uma leve tendência das plantas reidratadas ocuparem espaços mais internos em relação ao centro do gráfico. Os dois primeiros componentes principais explicaram 87,2% da variação total das variáveis.

**Figura 14** – Gráfico *score plot* dos indivíduos de *Lippia alba* avaliados sob 0 ou 15 dias de suspensão da irrigação. \*



\*0hid = plantas que não passaram por déficit hídrico, na fase de reidratação após 24 horas; 0seca = plantas que não passaram por déficit hídrico, na fase de seca; 15hid = plantas que passaram por déficit hídrico, na fase de reidratação após 24 horas; 15seca = plantas que passaram por déficit hídrico, na fase de seca.

Pelo Teste t Pareado, ficou evidente que somente a  $g_s$  e  $E$  diferiram estatisticamente antes e após a reidratação nas plantas que passaram pelo período de déficit hídrico (Tabela 4).

**Tabela 4** – Médias das variáveis analisadas em plantas de *Lippia alba* sob déficit hídrico durante 15 dias, antes e depois da reidratação de 24 horas. \*

Tratamento	$A$	$g_s$	$C_i$	$E$	$A g_s^{-1}$	$A E^{-1}$	$A C_i^{-1}$	$F_v F_m^{-1}$
Desidratação	4.95a	0.05a	258.70a	0.92a	79.30a	4.02a	0.03a	0.78a
Reidratação	7.48a	0.10b	242.40a	1.88b	87.40a	4.06a	0.03a	0.81a

\* As médias foram comparadas pelo Teste t pareado a 5% de probabilidade, sendo que as que são seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem entre si.  $A$  = taxa fotossintética líquida ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $g_s$  = condutância estomática ( $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $C_i$  = conteúdo interno de carbono ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ );  $E$  = transpiração ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $A g_s^{-1}$  = eficiência intrínseca no uso da água ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ );  $A E^{-1}$  = eficiência instantânea no uso da água ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O}^{-1}$ );  $A C_i^{-1}$  = eficiência de carboxilação ( $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $F_v F_m^{-1}$  = rendimento quântico máximo do fotossistema II.

Ao compararem-se essas variáveis com os seus respectivos equivalentes no grupo controle, verificou-se que também não houve igualdade entre as populações (Tabela 5). As demais variáveis comportaram-se de modo a tenderem a recuperarem-se do déficit hídrico após a reidratação.

**Tabela 5** – Médias das variáveis condutância estomática ( $g_s$ ) e transpiração ( $E$ ) em plantas de *Lippia alba* sob déficit hídrico durante 15 dias e depois da reidratação de 24 horas; e plantas que não passaram sob déficit hídrico (controle), após o mesmo período de 24 horas. \*

Tratamento	$g_s$	$E$
Reidratadas	0.10a	1.88a
Controle	0.32b	4.78b

\* As médias foram comparadas pelo Teste t a 5% de probabilidade, sendo que as que são seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem entre si.  $g_s$  = condutância estomática ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $E$  = transpiração ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

### 3.2.10 Óleos essenciais

Ao todo, foram encontrados 15 constituintes nos óleos essenciais produzidos pelas plantas avaliadas: óxido de cariofileno, p-cimeno, elemol, geranial, germacreno-D, g-terpineno, humuleno, limoneno, linalool, neral, selineno, zingibereno,  $\beta$ -myrceno,  $\beta$ -ocimeno e  $\beta$ -tujona ou sabineno (quanto a estes dois últimos, as áreas dos picos gerados pela técnica de análise não foram eficientes para a diferenciação de ambos). Os dados referentes aos testes univariados encontram-se na Tabela 6.

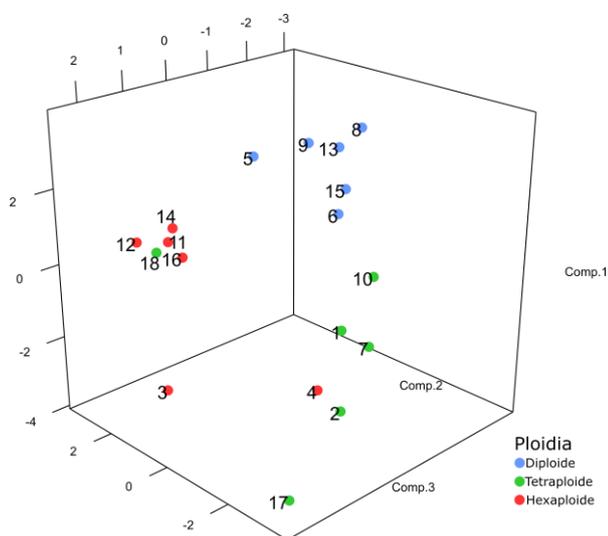
**Tabela 6** – Médias das concentrações (em porcentagem) dos compostos constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* em plantas diploides, tetraploides e hexaploides. \*

Composto (%)	Ploidias		
	Diploide	Tetraploide	Hexaploide
Óxido de cariofileno	0,00b	4,98a	1,60b
p-cimeno	1,64a	2,57a	0,96a
Elemol	0,68a	0,00b	0,00b
Geranial	55,25a	52,34a	53,82a
Germacreno-D	6,38a	1,54b	3,47b
g-terpineno	5,48a	2,83b	0,92b
Humuleno	0,08b	0,50a	0,21b
Limoneno	5,51a	0,03b	0,06b
Linalool	0,54b	0,74a	0,37b
Neral	22,53a	21,12a	21,51a
Selineno	0,27b	0,61b	1,44a
Zingibereno	0,55a	0,00b	0,00b
$\beta$ -myrceno	0,16b	6,08a	6,16a
$\beta$ -ocimeno	0,15c	1,77a	1,02b
$\beta$ -tujona ou sabineno	0,43a	0,57a	0,45a

\*As médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, sendo que as que são seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem entre si.

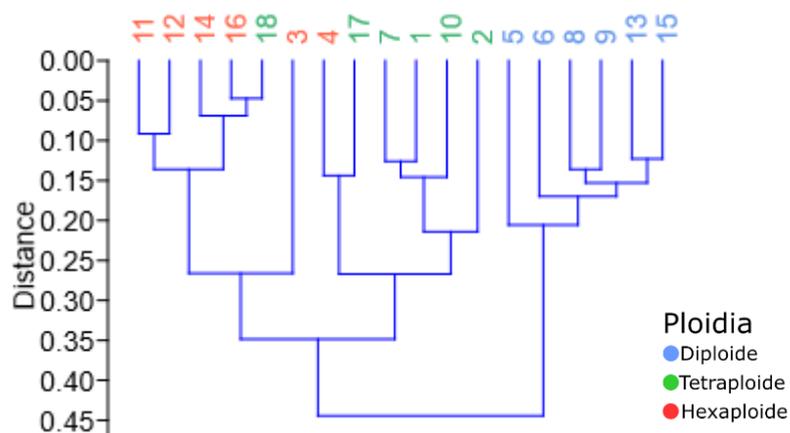
Os dois primeiros componentes explicaram somente 68% da variação total dos dados, sendo que este valor pode ser considerado pouco explicativo, pois está abaixo de 70%. Ao acrescentar o percentual de explicação do PC3, os três primeiros eixos juntos explicaram 82% da variação total dos dados. Além disso, a dispersão dos dados ficou melhor visualizada em um espaço tridimensional do que em um bidimensional, conforme demonstrado na Figura 15.

**Figura 15** – Gráfico *score plot* dos indivíduos de *Lippia alba* avaliados com base na concentração dos constituintes de seus óleos essenciais.



O coeficiente de correlação cofenética obtido pela análise de agrupamento presente na Figura 16 foi de 0,88; demonstrando que o método adotado foi muito adequado. Foi observado a formação de 3 grupos principais, que correspondem aos três níveis de poliploidia.

**Figura 16** – Dendrograma dos indivíduos de *Lippia alba* avaliados e agrupados com base na concentração dos constituintes de seus óleos essenciais.



Tanto na PCA quanto na análise de agrupamentos, foi observado que as parcelas 4 e 18 ficaram agrupados de forma inesperada, pois a parcela 18 é uma planta tetraploide que ficou agrupada com as hexaploides, enquanto que a planta 4 é hexaploide e agrupou-se com as plantas tetraploides.

Os grupos formados pelas duas análises, correspondentes aos níveis de ploidia, demonstraram, ainda, que as plantas hexaploides e tetraploides estão mais próximas entre si do que em relação às diploides.

Nos próximos parágrafos desta seção, será abordada a composição dos óleos essenciais em relação aos compostos minoritários de destaque das amostras (pela alta ou baixa produção), que, embora não tenham aplicação sobre a produção de *L. alba*, contribuem como conhecimento de base sobre a espécie.

As plantas diploides possuíram produção exclusiva de elemol e zingibereno e significativamente maior de germacreno D, g-terpineno, limoneno. Em relação aos demais genótipos, os espécimes diploides produziram em quantidades muito baixas ou nulas os compostos óxido de cariofileno, humuleno, selineno,  $\beta$ -mirceno e  $\beta$ -ocimeno.

As plantas tetraploides possuíram produção exclusiva ou mais elevada com significância estatística de óxido de cariofileno, humuleno, linalool e  $\beta$ -ocimeno. Em relação aos demais genótipos, os espécimes tetraploides produziram em quantidades muito baixas ou nulas os compostos óxido de elemol, germacreno D, limoneno e zingibereno.

As plantas hexaploides possuíram produção mais elevada com significância estatística apenas de selineno. Em relação aos demais genótipos, os espécimes hexaploides produziram em quantidades muito baixas ou nulas os compostos óxido de cariofileno, elemol, g-terpineno, limoneno, linalool e zingibereno.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 EFEITO DO NÍVEL DE POLIPLOIDIA

É comumente relatado na literatura que plantas poliploides diferem de seus progenitores quanto à tolerância ao estresse hídrico (TE BEEST et al., 2012; SATTLER; CARVALHO; CLARINDO, 2016; SOLTIS et al., 2016). No entanto, generalizações não devem ser feitas, pois não há um padrão identificado para a maioria dos táxons vegetais (SOLTIS et al., 2016). Em plantas de *L. alba* mantidas sob estresse hídrico, as análises multivariadas e univariadas não detectaram diferenças significativas para as variáveis estudadas, levando-se em consideração os diferentes acessos estudados e seus respectivos níveis de ploidia. Sabe-se que para esta espécie não há um padrão claro correlacionando a ploidia e a morfologia das folhas (VICCINI et al., 2014), sendo este o órgão vegetal utilizado para todas as análises deste trabalho. No entanto, em campo, foi possível verificar que entre os acessos há morfologias distintas das folhas, principalmente em dimensões de altura, largura e espessura.

É aceito que o vigor de plantas autoploides aumenta de acordo com o incremento no nível de ploidia, mas somente em casos em que há o aumento da heterozigose. Se a endogamia (e, portanto, a homozigose) for recorrente em conjunto com a poliploidização, há o decréscimo do vigor (TAIZ et al., 2014). Muito provavelmente, ao longo do processo evolutivo de cada um dos acessos estudados, as respostas fisiológicas ao estresse hídrico se desenvolveram de forma muito similar, pois eles apresentaram o mesmo nível de tolerância aos tratamentos utilizados.

### 4.2 EXPERIMENTO 1

O CRA e o HF são bons indicadores do status hídrico vegetal (JONES, 2006) e muito utilizados na literatura (BEGCY et al., 2011; MURSHED; LOPEZ-LAURI; SALLANON, 2013; MORALES; GARCIA; MUNNE-BOSCH, 2015). O CRA representa a relação entre a quantidade de água em um tecido e a capacidade total que o mesmo poderia reter deste recurso.

Já a HF representa a proporção de tecido que é ocupada por água. Portanto, plantas submetidas a estresses hídricos possuem esses parâmetros alterados em relação às plantas bem hidratadas. As altas e significativas correlações observadas entre esses parâmetros e com os de trocas gasosas e prolina observadas neste estudo demonstram o quão o *status* hídrico é capaz de interferir no metabolismo das plantas.

As reduções dos CRA e HF no tratamento de 15 dias de suspensão da irrigação (Figura 1) foram resultadas da perda da eficiência na regulação do grau de abertura estomática (relacionada à  $g_s$ ), pois qualquer quantidade de água perdida para a atmosfera passa a ser valiosa; e pela dificuldade na absorção de água do solo; o que leva à perda de turgescência foliar. Tal dificuldade ocorre tanto pela reduzida disponibilidade de água no substrato, quanto pela redução da  $g_s$  e da  $E$ , uma vez que essas variáveis são componentes fundamentais do contínuo solo-planta-atmosfera, que, por sua vez, é fundamental para a manutenção adequada do fluxo de água e minerais no xilema e para o controle de *status* hídrico em vegetais.

A água é o fator que mais limita o crescimento e o metabolismo vegetal (TAIZ et al., 2014). Portanto, fica evidente a sua influência sobre o processo fotossintético. As altas correlações positivas entre  $A$ ,  $g_s$  e  $E$ , e destes com o CRA e HF (Figura 5), demonstram como a disponibilidade hídrica afeta o metabolismo primário de *L. alba*.

A prolina é um aminoácido que funciona como um osmólito do ajustamento osmótico em vegetais sob condições de déficit hídrico. Essa molécula possui função osmoprotetora, pois auxilia na manutenção da integridade de estruturas proteicas e membranares, além de ser uma fonte de nitrogênio e carbono para as células, quando estas retornam a condições não estressantes (DA SILVA et al., 2013; TAIZ et al., 2014; ZANDALINAS et al., 2017). Portanto, é de se esperar que indivíduos submetidos a estresse hídrico tenham maior conteúdo de prolina em suas células (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008).

Ragagnin e colaboradores (2014) sugeriram que o acúmulo de prolina nas folhas de *Lippia gracilis* foi essencial para a manutenção de um CRA adequado sob estresse salino. Mesmo ocorrendo um grande acúmulo de prolina aos 15 dias de desidratação (Figura 3), uma queda significativa no CRA foi observada neste mesmo período, o que demonstra a ineficácia desta estratégia fisiológica isoladamente para a manutenção do status hídrico nas plantas de *L. alba*. Segundo Zegaoui e colaboradores (2017), a seca progressiva desencadeia a expressão dos genes de resposta ao estresse hídrico e de síntese de prolina, mas há pouco acúmulo de prolina nos períodos iniciais de estresse em feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), sendo o acúmulo mais significativo encontrado quando o estresse apresenta-se mais evidenciado. Tal afirmação

corroborar e explicar o comportamento de maior acúmulo desse soluto compatível em folhas de *L. alba* apenas aos 15 dias de desidratação contínua (Figura 3).

O fechamento estomático foi uma estratégia adotada pelas plantas, porém, isoladamente, esse mecanismo foi ineficiente, afetando a manutenção adequada das taxas fotossintéticas sob déficit hídrico. Inclusive, os resultados da PCA (Tabela 1) explicitaram como as variações da  $E$  e  $g_s$  explicaram mais a variação total dos dados do que a variação da  $A$ , demonstrando a sensibilidade desse parâmetro fisiológico ao déficit hídrico. Este é um comportamento amplamente utilizado em plantas sob algum tipo de limitação hídrica, uma vez que a desidratação foliar é acompanhada pelo acúmulo de ácido abscísico, sendo este, juntamente com a luminosidade, um dos principais reguladores do grau de abertura estomática (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009). Portanto, o fechamento estomático minimiza a perda de água da planta para a atmosfera.

Houve uma correlação negativa entre a  $A E^{-1}$  e  $A g_s^{-1}$  com o CRA e HF, pois ocorreram maiores quedas nos valores de  $E$  e  $g_s$  em relação à queda de  $A$ . Assim, as EUA aumentaram devido ao intenso fechamento estomático, que também levou à queda na  $C_i$  e, por consequência, na atividade fotossintética, uma vez que a baixa disponibilidade de  $CO_2$  no mesófilo é um reconhecido fator limitante da fotossíntese (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009; TAIZ et al., 2014). Segundo Larcher (2003), a otimização da assimilação do carbono pelo processo fotossintético ocorre frente ao fechamento parcial dos estômatos, fenômeno este que ocorre paralelamente ao início da limitação hídrica (no entanto, sem afetar a taxa fotossintética líquida).

Assim como observado neste trabalho (Figura 2), o aumento das EUA em plantas sob estresse hídrico é um fenômeno também relatado nos trabalhos de Souza e colaboradores (2005); Wu e colaboradores (2017); Meng e colaboradores (2017); e outros. O estresse hídrico aos 15 dias de suspensão da irrigação neste experimento pode ser caracterizado como moderado, pois sob um estresse severo, os valores médios de  $A$  chegam muito próximos a 0 (CHOI; CAI; GU, 2016).

A inibição fotossintética também pode ocorrer sinergicamente devido a fatores enzimáticos, como a eficiência de carboxilação da Rubisco, o bom estado de funcionamento do aparato fotossintético e a concentração de  $CO_2$  no ambiente, por exemplo. No entanto, como a  $C_i$  acompanhou o comportamento da  $g_s$  e  $E$  (Figura 2), acreditamos que estes fatores tiveram uma menor influência no processo de queda da  $A$ . Caso a limitação da  $A$  fosse do tipo não-estomática, não deveria ter ocorrido queda na  $C_i$  juntamente com a  $g_s$  (principalmente) e  $E$ .

Sabe-se que baixos níveis de  $C_i$  estimulam a abertura estomática, mas este efeito não foi significativo nas plantas avaliadas neste experimento.

A fotossíntese é o principal processo componente do metabolismo primário vegetal e, baseado no que foi descrito e argumentado neste trabalho, a queda na  $A$  parece estar ligada principalmente à limitação estomática, assim como para a maioria das plantas (CORNIC, 2000). Em adição, conforme a Figura 5, foi possível verificar que há uma grande correlação positiva entre  $A$ ,  $E$  e  $g_s$ .

Com a redução na  $A$  e na  $C_i$  também ocorreu queda na  $A C_i^{-1}$  (Figura 2). Tal queda ocorreu de forma muito mais similar com a queda na  $A$  do que na  $C_i$ : de modo mais brusco aos 15 dias de suspensão da irrigação.

Assim como nesse trabalho, outros estudos (MARTÍNEZ et al., 2018; ZHANG et al., 2018) demonstram que a imposição de déficit hídrico em plantas gera uma dispersão maior em dados coletados, para diferentes classes de variáveis fisiológicas e bioquímicas. Portanto, plantas bem irrigadas tendem a possuir menor amplitude de valores de parâmetros quando comparadas com plantas sob estresse, mesmo tratando-se de clones.

## 4.3 EXPERIMENTO 2

### 4.3.1 Etapa de indução do estresse hídrico

Como o comportamento fisiológico relacionado às trocas gasosas foi bastante próximo ao observado no Experimento 1 (Tabela 2), optou-se por não se repetir a mesma discussão do experimento anterior. Entretanto, outros aspectos relevantes serão discutidos.

$C_i$ ,  $A g_s^{-1}$  e  $A E^{-1}$  (Figura 6) apresentaram-se sem variação estatisticamente significativa aos 15 dias de suspensão da irrigação em relação ao controle, o que não ocorreu com  $C_i$  e  $A g_s^{-1}$  no Experimento 1. Além disso,  $A E^{-1}$  apresentou queda nas plantas sobre estresse hídrico, também de forma diferente do Experimento 1. Na PCA (Tabela 3) estas variáveis compuseram o PC2, juntamente com o índice SPAD e os pigmentos fotossintéticos. A ausência de diferença estatisticamente significativa neste experimento para as variáveis citadas, mas presente no Experimento 1, provavelmente ocorreu devido ao fato de o desvio padrão ter sido muito elevado nos dados das plantas mantidas sob 15 dias de suspensão da irrigação, como pode ser inferido pela alta dispersão dos dados nestas amostras, e o Experimento 2 contar com menos repetições do que o primeiro.

O índice SPAD apresentou-se bem correlacionado com as clorofilas e, inclusive, com os carotenoides (vide seção 3.2.6 este trabalho), além de não apresentar variações significativas entre as médias dos tratamentos empregados (Figura 10). Sabe-se que este tipo de correlação depende da espécie, do estágio de desenvolvimento vegetal, das condições de cultivo, da anatomia da folha e de outros fatores (ALI et al., 2017). Assim como ocorreu no presente trabalho, a associação entre o índice SPAD e o rendimento quântico máximo do fotossistema II foi reportado por Netto e colaboradores (2005) em plantas de café. Portanto, é digno de nota que esse fenômeno seja melhor estudado em experimentos futuros envolvendo plantas de *L. alba*, para averiguar-se se há uma relação direta entre esses parâmetros, uma vez que ambos são ligados à concentração das clorofilas.

Os carotenoides totais, *clorofila a* e *clorofila b* são de fundamental importância para o processo fotossintético, haja vista que eles são responsáveis pela captação da luz. Apesar dessa função, os carotenoides são mais importantes na proteção do aparato fotossintético, prevenindo danos devidos ao excesso de luz. Esses parâmetros decresceram nas plantas sob déficit hídrico, mas de forma não significativa (Figura 8), e são sintomas apresentados por muitas plantas estressadas, pois o estresse hídrico leva à produção de maiores quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) e desencadeia o estresse oxidativo. Tal estresse é danoso para qualquer tipo de célula e, em especial, os pigmentos fotossintéticos encontrados em células vegetais são muito susceptíveis a serem danificados pelas EROs. A queda desses parâmetros devido à falta de água no solo é um indício de que há, provavelmente, danos ao complexo fotoquímico (JALEEL et al., 2009).

A fluorescência da *clorofila a* é um fenômeno importante para o processo de dissipação do excesso de energia presente na luz recebida pelas plantas, evitando danos a todo o sistema envolvido na fotossíntese. Foi verificado que a perturbação ocorrida nos valores ótimos de concentração de pigmentos fotossintéticos (devido ao estresse hídrico) refletiu sobre o rendimento quântico máximo do fotossistema II (Figura 7). É relatado na literatura que plantas em bom estado fisiológico apresentam a taxa  $F_v F_m^{-1}$  com valores que vão de 0,75 a 0,85 (BOLHAR-NORDENKAMPF et al., 1989). Os valores para os dois tratamentos empregados situaram-se dentro desta faixa, apesar de os mesmos serem diferentes estatisticamente. Portanto, mesmo sendo matematicamente significativa, fisiologicamente não foram observadas perdas líquidas para as plantas estudadas nesse aspecto. Este fato é mais um argumento que sustenta a hipótese de que a queda da fotossíntese ocorreu principalmente devido à limitação estomática.

Como o déficit hídrico foi insuficiente para, em média, levar a fotossíntese a níveis negativos e comprometer o fotossistema II, o estresse imposto às plantas no Experimento 2 também ficou caracterizado como moderado, assim como no caso do Experimento 1 (CHOI; CAI; GU, 2016).

Além de causarem a degradação de pigmentos fotossintéticos nas membranas dos tilacoides, as EROs causam danos para toda a célula. Dependendo da duração do estresse oxidativo, a célula morrerá. A produção dessa classe de radicais tóxicos em vegetais está intimamente ligada ao balanço entre a captura da energia luminosa e o seu uso. Como ocorrido neste experimento (Figura 6), a falta de água nas folhas diminui as taxas de *A* e *E* e a entrada de CO<sub>2</sub> no mesofilo. Assim, há o excesso formação de poder redutor, pois a luz será constante e não haverá moléculas de CO<sub>2</sub> para serem reduzidas. Com isso, o excesso de elétrons será dissipado pelos centros de reação e complexo antena, gerando EROs, como O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e OH<sup>-</sup> (REDDY; CHAITANYA; VIVEKANANDAN, 2004).

Em relação ao aumento das EROs em tecidos vegetais, ocorre, normalmente, a seguinte sequência de eventos: (1) aumento da produção de EROs e de moléculas alvo oxidadas; (2) aumento da expressão de genes para funções antioxidantes; (3) aumento dos níveis de sistemas antioxidativos e antioxidantes; e (4) maior capacidade de eliminação de EROs, resultando em tolerância contra o estresse (MANO, 2002). Entretanto, as EROs possuem algumas funções benéficas para os vegetais, principalmente no que diz respeito à sinalização e regulação de alguns processos celulares, como a aclimatação a novas condições ambientais (CHOUDHURY et al., 2017).

Para defenderem-se contra os malefícios causados às células pelas EROs, os seres vivos, em geral, criaram complexos mecanismos antioxidantes. Os agentes antioxidantes podem ser de natureza enzimática (como as enzimas superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e outras) ou não (como prolina, carotenoides, ácido ascórbico, betaína, glutathione e outros). As enzimas, por natureza, atuam sobre formas de EROs específicas, enquanto os antioxidantes não enzimáticos não possuem essa especificidade. Como outra forma de defesa, os vegetais podem sintetizar isoformas de proteínas e lipídeos menos sensíveis às EROs (DEMIDCHIK, 2015). Além disso, muitas outras substâncias e enzimas são necessárias para a recuperação da forma ativa dos agentes oxidantes (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003).

A enzima superóxido dismutase age transformando o radical superóxido em peróxido de hidrogênio. As principais rotas de eliminação de EROs das plantas incluem a superóxido dismutase em suas diferentes formas, encontradas em quase todos os compartimentos celulares (MITTLER, 2002). Devido a essa abundância e sua ação sobre o superóxido, a superóxido

dismutase é considerada a primeira linha de defesa contra as EROs (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). Neste trabalho, houve a queda na atividade da superóxido dismutase aos 15 dias da suspensão da irrigação (Figura 11). Portanto, o estresse hídrico inicialmente deve ter levado ao aumento da atividade dessa enzima, com posterior redução, devido ao seu prolongamento, assim como relatado no trabalho de Zhang e Kirkham (1994) com trigo.

Juntamente com a superóxido dismutase, a catalase é uma das enzimas mais importantes do sistema antioxidativo nos seres vivos, sendo que sua localização predomina no peroxissomos (MITTLER, 2002). Apesar de sua importância para a maioria das espécies vegetais, não foi detectada a atividade dessa enzima nas plantas avaliadas. Devido à ausência de trabalhos na literatura que levam em consideração essa enzima em *L. alba*, não foi possível saber se este resultado decorre de algum erro relativo às coletas de material ou de natureza analítica; ou se realmente não há a atividade da mesma, assim como relatado no trabalho de de Sousa e colaboradores (2016) com milho.

De ação mais secundária que a superóxido dismutase e a catalase, as peroxidases formam uma família de enzimas consideradas bifuncionais, já que possuem a capacidade de oxidar vários substratos na presença de  $H_2O_2$ , embora também produzam EROs. Além disso, as peroxidases também possuem participação em outros processos biológicos (MOHAMED et al., 2011). Assim como para a superóxido dismutase, houve a queda da atividade dessa enzima nas plantas que tiveram baixa disponibilidade hídrica (Figura 11). Acreditamos que o mesmo comportamento ao longo tempo também tenha ocorrido.

O acúmulo de proteínas e carboidratos é uma estratégia comum adotada por plantas mantidas sob déficit hídrico, sendo parte importante do processo de ajustamento osmótico e, portanto, da manutenção do turgor celular. Isso ocorre devido ao fato de várias classes de carboidratos e compostos proteicos serem osmoticamente ativos. O aumento da concentração dos CST (Figura 9) e de proteínas (Figura 11) nas folhas das plantas de *L. alba* sob desidratação contínua após 15 dias provavelmente ocorreu devido à perda de água dos tecidos que compõe esse órgão. Essa afirmação sustenta-se nos dados da literatura (FALAHY et al., 2018; ROHOLLAHI et al., 2018) e pelo fato de a queda da HF no Experimento 1 (Figura 1) ter sido de 43% aos dias 15 de suspensão da irrigação (em relação ao controle) e o aumento da concentração de CST e de proteínas ter sido de 38% para cada um dos parâmetros no tratamento equivalente do Experimento 2.

### 4.3.2 Etapa de reidratação

Após a reidratação, foi observado que as folhas tenderam a iniciar a recuperação de suas atividades fisiológicas (conforme os parâmetros analisados), sendo essa resposta especialmente verdadeira para as taxas de  $E$  e  $g_s$ . Mas mesmo com a significativa recuperação de  $E$  e  $g_s$  (Tabela 4), esses parâmetros ficaram abaixo dos valores encontrados para as plantas do grupo controle (Tabela 5). Assim, mais uma vez neste trabalho, ficou demonstrada a importância da regulação estomática em *L. alba* e a sua sensibilidade em relação à disponibilidade de água no solo. Com a recuperação parcial desses parâmetros, ficou evidente a tentativa da retomada da taxa fotossintética adequada pelos espécimes avaliados. Isso era esperado, haja vista a importância do processo fotossintético para a fisiologia das plantas como um todo. Com isso, a  $C_i$  decresceu após a reidratação, favorecendo a eficiência de carboxilação (Tabela 4). Em relação à EUA,  $A$   $g_s^{-1}$  aumentou, pois a maior disponibilidade hídrica, até certo ponto, favoreceu a tomada da recuperação desse parâmetro fisiológico (Tabela 4).

Devido às suas características climáticas extremas, a tolerância ou resistência a condições hídricas estressantes e a alta capacidade de recuperação após períodos de seca são características indispensáveis compartilhadas pela maioria das plantas encontradas em campos rupestres (OLIVEIRA et al., 2016), onde muitas espécies do gênero *Lippia* são encontradas (PIMENTA et al., 2007). Portanto, muito provavelmente, tais características estão atreladas intrinsecamente a esse gênero e a herança filogenética explica o eficiente comportamento fisiológico de *L. alba* frente ao déficit hídrico.

É comum que plantas adaptadas a ambientes com baixa disponibilidade hídrica respondam rapidamente à presença de água nos solos, uma vez que essa disponibilidade pode durar por pouco tempo. Quanto mais do recurso hídrico for aproveitado em um curto período de tempo, mais rapidamente a planta poderá recuperar sua homeostase e dar prosseguimento ao seu ciclo de vida. Para que o aumento da taxa de absorção de água (e nutrientes, por consequência) do solo pelas raízes possa acontecer,  $E$  e  $g_s$  possuem um papel fundamental, devido às relações hídricas do contínuo solo-planta-atmosfera. Tratando-se de aspectos ecofisiológicos de *L. alba*, consideramos ambos os parâmetros de alta relevância e que, juntamente com  $A$ , possuem um alto poder explicativo em termos de variância, conforme as PCAs deste trabalho puderam comprovar. Portanto, sugere-se que esses parâmetros sejam empregados em estudos que tenham como objetivo o melhoramento da espécie.

A retomada acelerada das características fisiológicas vegetais ótimas em curtos intervalos de tempo é demonstrada e discutida em trabalhos com gramíneas (GHANNOUM et

al., 2003; SANTOS et al., 2014; RIBOLDI; OLIVEIRA; ANGELOCCI, 2016), principalmente, e com *Pleurostima purpurea* (AIDAR et al., 2014), uma espécie encontrada em afloramentos rochosos e constituinte da família Velloziaceae (típica de campos rupestres, segundo Oliveira e colaboradores (2016)).

Em última análise, o gráfico de dispersão da Figura 15 resume bem o que foi discutido nesta subseção: no geral, 24 horas de reidratação não foi um intervalo de tempo significativo e suficiente para que as plantas de *L. alba* recuperassem a sua homeostase fisiológica, embora perceba-se que a recuperação das mesmas provavelmente ocorre de forma rápida. Somado a isto, o fato das plantas terem suportado bem 15 dias sem rega (nas condições estudadas) e continuarem vivas são indícios de que essa espécie é bem adaptada à escassez de recursos hídricos.

#### 4.3.3 Perfil de óleos essenciais

Sabe-se que o as condições ambientais e o estágio do desenvolvimento vegetal são fatores que influenciam qualitativamente e quantitativamente a produção de óleos essenciais em várias espécies (BOUYAHYA et al., 2017; FIGUEIREDO et al., 2008; JESHNI et al., 2017; MORSHEDLOO et al., 2017). A variação ocorre principalmente devido a uma sequência de acontecimentos e rotas metabólicas, já que os constituintes de óleos essenciais são metabólitos secundários: (1) mudanças nas condições ambientais podem afetar o metabolismo primário vegetal, (2) o que pode afetar diretamente o metabolismo secundário vegetal e, portanto, impactar na produção de óleos essenciais. É relatado na literatura, ainda, que os metabólitos secundários estão envolvidos em interações da planta com o ambiente, principalmente em processos ecológicos de competição e defesa contra a predação (FIGUEIREDO et al., 2008).

Embora relações envolvendo traços quantitativos da composição do óleo essencial de *L. alba* não tenham sido analisados neste estudo, é válido destacar que, segundo Larcher (2003), condições ambientais estressantes levam ao aumento da concentração de constituintes proteicos, livres, pois o estresse inibe a síntese de proteínas e as já existentes são degradadas continuamente. Este *pool* de constituintes proteicos livres favorece o aumento da concentração de metabólitos secundários. Há de acrescentar-se, ainda, que plantas sob estresse tendem a aumentar a produção de terpenos, devido a uma baixa alocação de carbono para o crescimento, apontando a existência de um *trade-off* entre a taxa de crescimento e a produção de defesas contra o estresse (TURTOLO et al., 2003; BETTAIEB et al., 2009). Em adição, a maior parte

dos metabólitos secundários presentes no óleo essencial de *L. alba* pertence à classe química dos terpenos.

O déficit hídrico não foi capaz de alterar o perfil qualitativo dos óleos essenciais, sendo que os agrupamentos encontrados se referiram apenas ao nível de poliploidia das plantas (Figura 15). Este resultado é similar ao encontrado por Alvarenga e colaboradores (2011) ao submeterem plantas de *Lippia sidoides* ao déficit hídrico, pois não foram detectadas variações na composição do óleo essencial.

Todas as plantas avaliadas são boas produtoras de neral e geranial, que são isômeros de citral (Tabela 6). Por este ser o componente majoritário das populações, elas são classificadas como quimiotipo citral. No entanto, diferenças foram encontradas na composição dos óleos essenciais referente a compostos produzidos em menores quantidades, de acordo com o nível de ploidia (Tabela 6). Já é relatado na literatura que o nível de poliploidia possui grande influência no perfil qualitativo de óleos essenciais de *L. alba* (VICCINI et al., 2014) e que essa é uma característica fortemente regulada por fatores genéticos (YAMAMOTO et al., 2008).

Sobre *L. alba*, é encontrado na literatura que plantas cultivadas *in vitro* com diferentes disponibilidades de dióxido de carbono apresentam diferenças qualitativas na composição de seu óleo (BATISTA et al., 2017). Mas o mesmo não ocorre quando as plantas são cultivadas *ex vitro* e com diferentes tratamentos hídricos e de adubação (YAMAMOTO et al., 2008). Em adição, mudanças qualitativas na luminosidade com o uso de malhas específicas (ALVES, 2015) ou com o uso de LEDs específicos (em condições *in vitro*) (BATISTA, 2016) também são capazes de causar mudanças na composição dos óleos essenciais da espécie. Outras espécies da família Verbenaceae não apresentaram mudanças no perfil de seus óleos essenciais quando submetidas a experimentos envolvendo estresse hídrico, como *Lippia gracilis* (CRUZ et al., 2014; RAGAGNIN et al., 2014) e *Aloysia triphylla* (PROCHNOW et al., 2017), por exemplo.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estresse hídrico somente foi detectado em plantas de *L. alba* que ficaram 15 dias sem serem regadas, sem influência do nível de ploidia. Além disso, foi verificado que 24 horas após a reidratação não foi um intervalo de tempo suficiente para que as plantas recuperassem seu estágio fisiológico ideal (embora tendências positivas tenham sido observadas). Para tais análises, os parâmetros *A*, *E* e *g<sub>s</sub>* mostraram-se muito eficientes para a discriminação de grupos de indivíduos. A produção qualitativa de óleos essenciais não foi afetada pelo estresse hídrico imposto, estando diretamente ligada a fatores genéticos, como o nível de ploidia. Por fim, os

resultados encontrados indicam que *L. alba* é uma espécie tolerante ao estresse hídrico, o que, provavelmente, é um dos principais fatores que contribuem para a sua ampla dispersão em diferentes regiões. Recomenda-se que estudos futuros envolvendo diferentes regimes hídricos sejam realizados para que relações hídricas, produção de óleos essenciais e outros aspectos biológicos de *L. alba* sejam melhor esclarecidos.

## REFERÊNCIAS

- AIDAR, S. T. et al. Photosynthetic response of poikilochlorophyllous desiccation-tolerant *Pleurostima purpurea* (Velloziaceae) to dehydration and rehydration. **Photosynthetica**, v. 52, n. 1, p. 124–133, 8 mar. 2014.
- ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 253–261, 12 set. 2013.
- ALCAMO, J.; FLÖRKE, M.; MÄRKER, M. Future long-term changes in global water resources driven by socio-economic and climatic changes. **Hydrological Sciences Journal**, v. 52, n. 2, p. 247–275, abr. 2007.
- ALI, M. M. et al. Leaf nitrogen determination using non-destructive techniques—A review. **Journal of Plant Nutrition**, v. 40, n. 7, p. 928–953, 21 abr. 2017.
- ALIX, K. et al. Polyploidy and interspecific hybridization: partners for adaptation, speciation and evolution in plants. **Annals of Botany**, v. 120, n. 2, p. 183–194, 1 ago. 2017.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 372, p. 1331–41, maio 2002.
- ALVARENGA, Ivan Caldeira Almeida et al. Water stress before harvest of pepper-rosmarin. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 7, p. 706-711, 2011.
- ALVES, A. C. *Lippia alba* (Mill) N.E. Br cultivada sob malhas fotoconversoras e doses de nitrogênio. 2015. Dissertação (Mestrado em solos e qualidade de ecossistemas)-Universidade Federal Do Recôncavo Da Bahia, Cruz das Almas, 2015.
- ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in Isozyme Profiles of Catalase, Peroxidase, and Glutathione Reductase during Acclimation to Chilling in Mesocotyls of Maize Seedlings. **Plant physiology**, v. 109, n. 4, p. 1247–1257, 1 dez. 1995.
- ARA, N. et al. In vitro antimicrobial and cytotoxic activities of leaves and flowers extracts from *Lippia alba*. **Pakistan journal of biological sciences : PJBS**, v. 12, n. 1, p. 87–90, 1 jan. 2009.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, n. 1, p. 205–207, ago. 1973.

BATISTA, D. S. **Growth performance and essential oil production in in vitro grown *Lippia alba* plantlets as affected by light quality and elevated CO<sub>2</sub>**. 2016. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

BATISTA, D. S. et al. Elevated CO<sub>2</sub> improves growth, modifies anatomy, and modulates essential oil qualitative production and gene expression in *Lippia alba* (Verbenaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 128, n. 2, p. 357–368, 21 fev. 2017.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276–287, 1 nov. 1971.

BEGCY, K. et al. An arabidopsis mitochondrial uncoupling protein confers tolerance to drought and salt stress in transgenic tobacco plants. 2011.

BETTAIEB, I. et al. Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. **Scientia Horticulturae**, v. 120, n. 2, p. 271–275, 2 abr. 2009.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v. 91, n. 2, p. 179–194, 1 jan. 2003.

BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R. et al. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. **Functional Ecology**, v. 3, n. 4, p. 497, 1989.

BOUYAHYA, A. et al. Correlation between phenological changes, chemical composition and biological activities of the essential oil from Moroccan endemic Ouirigaçõno (*Origanum compactum* Benth). **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 729–737, 1 dez. 2017.

BRANDÃO, A. D. et al. Cytogenetic characterization of *Lippia alba* and *Lantana camara* (Verbenaceae) from Brazil. **Journal of Plant Research**, v. 120, n. 2, p. 317–321, 12 mar. 2007.

CARVALHO, P. M. M. et al. Effect of the *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its main constituents, citral and limonene, on the tracheal smooth muscle of rats. **Biotechnology Reports**, v. 17, p. 31–34, 1 mar. 2018.

CASTRO, D. M.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Biomass production and chemical composition of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown Ex Britt Wilson in leaves on different plant parts in different seasons. **Acta Horticulturae**, n. 569, p. 111–115, fev. 2002.

CHANCE, B.; MAEHLY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764–775, 1 jan. 1955.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of botany**, v. 103, n. 4, p. 551–60, fev. 2009.

CHEN, Z. J. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, n. 1, p. 377–406, 1 jun. 2007.

CHOI, H.-S.; CAI, X.; GU, M. Effects of salinity and drought stress on photosynthesis, growth and development of ornamental plants. In: Pessarakli, M. **Handbook of Photosynthesis**. 1 ed. CRC Press, 2016. p. 651–661.

CHOUDHURY, F. K. et al. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **The Plant Journal**, v. 90, n. 5, p. 856–867, 1 jun. 2017.

CORNIC, G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture—not by affecting ATP synthesis. **Trends in plant science**, v. 5, n. 5, p. 187–188, 2000.

CRUZ, E. M. D. O. et al. Water deficit and seasonality study on essential oil constituents of *Lippia gracilis* Schauer germplasm. **Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–9. 2014.

DA SILVA, E. C. et al. Drought and Its Consequences to Plants – From Individual to Ecosystem. In: Akıncı, S. **Responses of Organisms to Water Stress**. 1 ed. InTech, 2013. p. 17–47.

DE FREITAS SOUZA, C. et al. Citral and linalool chemotypes of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish: a detailed physiological analysis of side effects during anesthetic recovery in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Biochemistry**, p. 1–14, 26 set. 2017.

DE SOUSA, D. P. F. et al. Increased drought tolerance in maize plants induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is closely related to an enhanced enzymatic antioxidant system and higher soluble protein and organic solutes contents. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 28, n. 3, p.

297–306, 9 set. 2016.

DEL LONGO, O. T. et al. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant and Cell Physiology**, v. 34, n. 7, p. 1023–1028, 1 out. 1993.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212–228, 1 jan. 2015.

DOS SANTOS MARQUES, C. T. et al. Improvement of biomass and essential oil production of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown with green manures in succession. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 113–118, 1 fev. 2018.

EHLERT, P. A. D. et al. Effect of substrata on the development of stem cuttings of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. -limonene-carvone chemotype. **Acta Horticulturae**, n. 576, p. 259–262, abr. 2002.

FALAHI, H. et al. Phenylethanoid glycosides accumulation in roots of *Scrophularia striata* as a response to water stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 147, p. 13–21, 1 mar. 2018.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213–226, 1 jul. 2008.

FITTER, A. H.; HAY, R. K. M. **Environmental Physiology of Plants**. 3 ed. Elsevier, 2012. 367 p.

GARCÍA, L. T. et al. Differential anti-proliferative effect on K562 leukemia cells of *Lippia alba* (Verbenaceae) essential oils produced under diverse growing, collection and extraction conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 96, p. 140–148, 1 fev. 2017.

GHANNOUM, O. et al. Nonstomatal limitations are responsible for drought-induced photosynthetic inhibition in four C4 grasses. **New Phytologist**, v. 159, n. 3, p. 599–608, 24 jul. 2003.

HALDAR, S. et al. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Lippia alba*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. S667–S670, 1 jan. 2012.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant physiology**, v. 84, n. 2, p. 450–5, 1 jun. 1987.

JALEEL, C. A. et al. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. **Int. J. Agric. Biol**, v. 11, p. 1560–8530, 2009.

JANANI, J. K. **Análise de crescimento e trocas gasosas de erva-cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britt Wilson) cultivada em solução nutritiva**. 2011. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

JESHNI, M. G. et al. The changes of yield and essential oil components of German Chamomile (*Matricaria recutita* L.) under application of phosphorus and zinc fertilizers and drought stress conditions. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 16, n. 1, p. 60–65, 1 jan. 2017.

JONES, H. G. Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 119–130, 6 nov. 2006.

JONES, H. G. **Plants and microclimate : a quantitative approach to environmental plant physiology**. 3 ed. Cambridge University Press, 2014. 452 p.

JULIÃO, S. A. **Avaliação da estabilidade genômica em acessos naturais e sintéticos de *Lippia alba* (MILL.) N. E. Br. (Verbenaceae)**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)-Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant physiology**, v. 57, n. 2, p. 315–9, 1 fev. 1976.

LARCHER, W.. **Physiological plant ecology : ecophysiology and stress physiology of functional groups**. 4 ed. Springer, 2003. 514 p.

LERMEN, C. et al. Growth of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi with different levels of humic substances and phosphorus in the soil. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 7, p. 48–53, 1 dez. 2017.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350–382, 1 jan. 1987.

LIMA, C. B. et al. Cuttings of *Lippia alba* with emphasis on time for seedling formation, substrates and plant growth regulators. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 230–235, jun. 2015.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

MANICA-CATTANI, M. et al. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 375–380, maio 2009.

MANO, J. Early events in environmental stresses in plants - induction mechanisms of oxidative stress. In: INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M. **Oxidative stress in plants**. 1 ed. Taylor & Francis, 2002. p. 267-302.

MARTÍNEZ, Luisa M. et al. Variation in functional responses to water stress and differentiation between natural allopolyploid populations in the *Brachypodium distachyon* species complex. **Annals of Botany**, 2018.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais** : guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. 3 ed. UFC Edições, 2007. 344 p.

MENG, L.-H. et al. Differentiation in drought tolerance mirrors the geographic distributions of alpine plants on the Qinghai-Tibet Plateau and adjacent highlands. **Scientific reports**, v. 7, p. 42466, 14 fev. 2017.

MESA-ARANGO, A. C. et al. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 878–884, set. 2009.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405–410, 1 set. 2002.

MOHAMED, S. A. et al. Characterisation of an anionic peroxidase from horseradish cv. Balady. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 725–730, 1 out. 2011.

MORALES, M.; GARCIA, Q. S.; MUNNE-BOSCH, S. Ecophysiological response to seasonal variations in water availability in the arborescent, endemic plant *Vellozia gigantea*. **Tree Physiology**, v. 35, n. 3, p. 253–265, 1 mar. 2015.

MORSHEDLOO, M. R. et al. Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono- and sesquiterpene synthesis in two irrigação ( *Origanum vulgare* L.) subspecies. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 111, p. 119–128, 1 fev. 2017.

MURSHED, R.; LOPEZ-LAURI, F.; SALLANON, H. Effect of water stress on antioxidant systems and oxidative parameters in fruits of tomato (*Solanum lycopersicon* L, cv. Microtom). **Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology**, v. 19, n. 3, p. 363–78, jul. 2013.

NETTO, A. T. et al. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. **Scientia Horticulturae**, v. 104, n. 2, p. 199–209, 30 mar. 2005.

NOGUEIRA, M. A. et al. Antibacterial Activity of *Lippia alba* (Lemon Herb). **Latin American Journal of Pharmacy Am. J. Pharm**, v. 26, n. 3, p. 404–6, 2007.

OLIVEIRA, R. S. et al. Ecophysiology of Campos Rupestres plants. In: **Ecology and Conservation of Mountaintop grasslands in Brazil**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 227–272.

P.H.P., P. et al. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.

PIMENTA, M. R. et al. Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia* L. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 2, p. 211–220, jun. 2007.

PROCHNOW, D. et al. Chemical composition of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hér) Britton due to water deficit and seasonality . **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 16, n. 2, p. 121–128, 2017.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2013. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>>

RAGAGNIN, R. C. G. et al. Effect of salt stress on the growth of *Lippia gracilis* Schauer and on the quality of its essential oil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 28, n. 3, p. 346–351, set. 2014.

REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 11, p. 1189–1202, 18 nov. 2004.

REIS, A. C. et al. *Lippia alba* (Verbenaceae): A new tropical autopolyploid complex? **American journal of botany**, v. 101, n. 6, p. 1002–1012, 1 jun. 2014.

RIBOLDI, L. B.; OLIVEIRA, R. F.; ANGELOCCI, L. R. Leaf turgor pressure in maize plants under water stress. **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, n. 6, p. 878–886, 20 jun. 2016.

ROHOLLAHI, I. et al. Expression and Biochemical Responses in under Drought Stress. **Crop Science**, v. 58, n. 1, p. 435, 30 set. 2018.

SANTOS, O. O. et al. Desempenho ecofisiológico de milho, sorgo e braquiária sob déficit hídrico e reidratação. **Bragantia**, v. 73, n. 2, p. 203–212, 3 jun. 2014.

SATTLER, M. C.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. The polyploidy and its key role in plant breeding. **Planta**, v. 243, n. 2, p. 281–296, 29 fev. 2016.

SOLTIS, D. E. et al. Polyploidy and angiosperm diversification. **American journal of botany**, v. 96, n. 1, p. 336–48, 1 jan. 2009.

SOLTIS, D. E. et al. Polyploidy: Pitfalls and paths to a paradigm. **American Journal of Botany**, v. 103, n. 7, p. 1146–1166, 2016.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; TATE, J. A. Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. **New Phytologist**, v. 161, n. 1, p. 173–191, 24 nov. 2003.

SOLTIS, P. S. et al. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 35, p. 119–125, 1 dez. 2015.

SOUSA, S. et al. Chromosome banding and essential oils composition of brazilian accessions of *Lippia alba* (Verbenaceae). **Biologia**, v. 64, n. 4, p. 711–715, 1 jan. 2009.

SOUZA, G. M.; PINCUS, S. M.; MONTEIRO, J. A. F. The complexity-stability hypothesis in plant gas exchange under water deficit. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 4, p. 363–373, dez. 2005.

TAIZ, L. et al. **Plant Physiology and Development**. 6<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates is an imprint

of Oxford University Press, 2014. 761 p.

TAVARES, E. S. et al. Kinetin Enhanced Linalool Production by *in vitro* Plantlets of *Lippia alba*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 5, p. 405–408, set. 2004.

TE BEEST, M. et al. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. **Annals of Botany**, v. 109, n. 1, p. 19–45, 1 jan. 2012.

TURTOLA, S. et al. Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in scots pine and norway spruce seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 9, p. 1981–1995, 2003.

VAN DE PEER, Y.; MIZRACHI, E.; MARCHAL, K. The evolutionary significance of polyploidy. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 7, p. 411–424, 15 maio 2017.

VENÂNCIO, D. DE F. A. et al. Flower-visiting insects and phenology of *Lippia alba* Lamiales: Verbenaceae): floral color changes and environmental conditions as cues for pollinators. **Environmental Entomology**, v. 45, n. 3, p. 685–693, 1 jun. 2016.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, n. 4, p. 753–759, 1 nov. 2008.

VIANA, G. S. B. et al. Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: a comparative study. **Pharmaceutical Biology**, v. 36, n. 5, p. 347–351, 29 jan. 1998.

VICCINI, L. F. et al. Citral and linalool content has been correlated to DNA content in *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). **Industrial Crops & Products**, v. 59, p. 14–19, 2014.

WENDEL, J. F. The wondrous cycles of polyploidy in plants. **American Journal of Botany**, v. 102, n. 11, p. 1753–1756, 2015.

WU, J. et al. A morphophysiological analysis of the effects of drought and shade on *Catalpa bungei* plantlets. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 3, p. 80, 22 mar. 2017.

YAMAMOTO, P. Y. et al. Performance of ginger grass (*Lippia alba*) for traits related to the production of essential oil. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 5, p. 481–489, set. 2008.

ZANDALINAS, S. I. et al. Plant adaptations to the combination of drought and high

temperatures. **Physiologia Plantarum**, v. 162, n. 1, p. 2-12, fev. 2017.

ZEGAOUI, Z. et al. Variation in relative water content, proline accumulation and stress gene expression in two cowpea landraces under drought. **Journal of Plant Physiology**, v. 218, p. 26–34, nov. 2017.

ZHANG, Xiangbo et al. Effects of drought stress and water recovery on physiological responses and gene expression in maize seedlings. **BMC plant biology**, v. 18, n. 1, p. 68, 2018.

ZHANG, J.; KIRKHAM, M. B. Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. **Plant and Cell Physiology**, v. 35, n. 5, p. 785–791, 1 jan. 1994.