

COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E PRODUÇÃO DE
Cymbopogon citratus EM RESPOSTA À INTENSIDADE LUMINOSA E
APLICAÇÕES DE N6-BENZILAMINOPURINA

CLÁUDIA LOPES PRINS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO 2011**

COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E PRODUÇÃO DE
Cymbopogon citratus EM RESPOSTA À INTENSIDADE LUMINOSA E
APLICAÇÕES DE N6-BENZILAMINOPURINA

CLÁUDIA LOPES PRINS

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Dr. Silvério de Paiva Freitas

**CAMPOS DOS GOYTACAZES –RJ
FEVEREIRO 2011**

COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E PRODUÇÃO DE
Cymbopogon citratus EM RESPOSTA À INTENSIDADE LUMINOSA E
APLICAÇÕES DE N6-BENZILAMINOPURINA

CLÁUDIA LOPES PRINS

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal”

Aprovada em 17 de fevereiro de 2011

Comissão Examinadora:

Geraldo de Amaral Gravina (DSc. Fitotecnia) - UENF

Ivo José Curcino Vieira (DSc. Química) - UENF

Mara de Menezes de Assis Gomes – (DSc. Biologia Vegetal) – FAETEC/RJ

Prof. Silvério de Paiva Freitas (DSc., Fitotecnia) – UENF
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus;
À minha família, minha fonte de felicidade;
A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro;
Ao professor Silvério de Paiva Freitas pela orientação e confiança;
Ao senhor Jaime Rabi da Empresa Microbiológica por fornecer informações essenciais ao trabalho e pela doação de N6-benzilaminopurina;
Aos professores Ivo, Mara, Gravina e Gloria pela amizade e contribuições ao trabalho;
Aos amigos do laboratório e de curso pela amizade e momentos de alegria ao longo de todos os anos de convivência;
A Paula Alessandra e Verônica pela grande ajuda na colheita e avaliação dos experimentos;
À professora Virgínia, ao técnico Acácio e técnico Detone;
Ao Prof. Cláudio Marciano e ao técnico Ederaldo;
Ao técnico Jader e funcionários de campo (Adegildo, Alcimar, Alex, André, Armando, Ederval, Luiz Augusto);
Ao professor Eliemar Campostrini, Anderson, Alena e alunos do LMGV/Fisiologia Vegetal;
Ao professor Braz, Frances, à técnica Maristela e alunos LCQUI/Química de Produtos Naturais pela valiosa ajuda nas análises cromatográficas;
Ao professor Vanildo e Angêlo (LBT/CBB) pelas análises de proteômica;
À D. Isa e aos secretários(as) do curso de Produção Vegetal e CCTA;
A todos os professores da UENF;
Aos técnicos e alunos de outros laboratórios/setores/centros;
A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa;

Minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Avaliação do efeito da intensidade luminosa e aplicação de diferentes concentrações de N6-benzilaminopurina sobre a composição do óleo essencial e produção de <i>C. citratus</i>	19
3.2 Avaliação do efeito da intensidade luminosa e frequência de aplicação de N6-benzilaminopurina sobre a composição do óleo essencial e produção de <i>C. citratus</i>	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Avaliação do efeito da intensidade luminosa e aplicação de diferentes concentrações de N6-benzilaminopurina sobre a composição do óleo essencial e produção de <i>C. citratus</i>	27
4.2 Avaliação do efeito da intensidade luminosa e frequência de aplicação de N6-benzilaminopurina sobre a composição do óleo essencial e produção de <i>C. citratus</i>	37
5. RESUMO E CONCLUSÕES	45

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
APÊNDICE.....	57

RESUMO

PRINS, C.L. DSc. Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Fevereiro de 2011. Composição do óleo essencial e produção de *Cymbopogon citratus* em resposta à intensidade luminosa e aplicações de N6-benzilaminopurina. Orientador: Silvério de Paiva Freitas.

O capim-limão é uma espécie aromática cujo óleo essencial é amplamente utilizado devido ao intenso aroma de limão. A produção de óleos essenciais pode sofrer influência de fatores ambientais e endógenos como, por exemplo, hormônios vegetais. Hormônios vegetais são substâncias biossintetizadas pelas plantas e que possuem funções de coordenação do crescimento e desenvolvimento. Dentre os hormônios vegetais está a citocinina, que é relacionada a diversos processos como percepção de sinais externos e regulação do metabolismo. Diversos trabalhos têm demonstrado que as citocininas podem afetar a produção de óleos essenciais. Este trabalho objetivou avaliar os efeitos de concentrações crescentes e freqüência de aplicações de N6-benzilaminopurina, uma citocinina sintética, sobre a composição do óleo essencial e produção de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) cultivado em condições de campo e sob sombreamento. Foram realizados dois experimentos. No primeiro avaliou-se o efeito da aplicação de N6-benzilaminopurina nas concentrações de 0; 30; 60; 90; 120; 150 e 180 mg.L⁻¹ em plantas cultivadas sob condições de campo e sob sombreamento através de cultivo em casa de vegetação com retenção de

35% acrescida de tela sombrite 50%. Utilizou-se delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial (2 x 7) com cinco repetições. Aos sete meses após o plantio iniciou-se a aplicação dos tratamentos. Uma semana após a aplicação de N6-benzilaminopurina foi realizada a colheita. O material vegetal colhido foi pesado e submetido à secagem para determinação de matéria fresca e seca, respectivamente. Avaliou-se ainda a área foliar, a razão de peso de folhas e de perfilhos, a razão de área foliar, o teor de óleo essencial, o teor de citral, o teor de geraniol e a concentração de proteínas totais. Observou-se que o sombreamento reduziu o crescimento de capim-limão, especialmente por inibir o perfilhamento. Não houve efeito da intensidade luminosa ou das concentrações de N6-benzilaminopurina sobre o teor de óleo essencial. O teor de citral e de geraniol decresceu em resposta a aplicações de N6-benzilaminopurina. A concentração de proteínas totais aumentou em resposta a aplicações do hormônio. No segundo experimento avaliou-se o efeito de aplicações semanais, quinzenais e ausência de aplicação de N6-benzilaminopurina sobre a composição do óleo essencial e produção de *Cymbopogon citratus* cultivado sob condições de campo e sombreamento. Utilizou-se delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial (2 x 3) com oito repetições. Aplicações semanais de N6-benzilaminopurina apresentaram efeito negativo sobre a área foliar, crescimento de folhas e teor de clorofila. As trocas gasosas foram negativamente influenciadas pelo sombreamento, sem efeito de N6-benzilaminopurina. O percentual de óleo essencial não foi influenciado pelos tratamentos. O teor de geraniol foi superior sob sombreamento. Os resultados indicam que o sombreamento e aplicações semanais de N6-benzilaminopurina foram prejudiciais ao crescimento de capim-limão, no entanto a síntese de óleo essencial não foi prejudicada nessas condições. Por outro lado, o aumento da concentração de N6-benzilaminopurina reduziu o percentual de citral e geraniol no óleo essencial e aumentou a concentração de proteínas totais em folhas do capim-limão, indicando que os efeitos observados podem estar associados a alterações na expressão protéica.

ABSTRACT

PRINS, C.L. DSc. Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense. February, 2011. Essential oil composition and production of *Cymbopogon citratus* in response to light gradient and N6-benzylaminopurine application. Advisor: Silvério de Paiva Freitas.

Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) is an aromatic plant which essential oil is widely used due its lemon scent. Essential oil production can be influenced by environmental and endogenous factors as plant hormones. Phytohormones are compounds biosynthesized by plants and it has growth and development coordination functions. Among the phytohormones classes there is cytokinin which is related to a range of processes like external signaling perception and metabolism regulation. Many works have been showing that cytokinins can affect essential oil production. In the present work it was aimed to evaluate the effects of increased concentrations and frequency of application of N6-benzylaminopurine, a synthetic cytokinin, on essential oil composition and production of lemongrass grown in field conditions and under shade. With this purpose it was carried out two experiments. In the first one it was evaluated the effect of N6-benzylaminopurine application on the following concentrations: 0; 30; 60; 90; 120; 150 and 180 mg.L⁻¹ on plants exposed to full sunlight (field conditions) and plants growing in a greenhouse covered with 35% and 50% woven nylon for sunlight retention. It was

used randomized blocks design in factorial scheme (2 x 7) with five replications. At seven months after cultivation it was started N6-benzylaminopurine applications. A week after applications the plants were harvest. Plant material was weighted for fresh mass determination and following submitted to drying for dry mass determination. It was also evaluated leaf area, leaf weight ratio, tiller weight ratio, leaf area ratio, essential oil, citral and geraniol percentages and total protein concentration. It was observed that shade reduced lemongrass growth mainly by tillering inhibition. There was not effect of light gradient or N6-benzylaminopurine concentrations on essential oil percentage. Citral and geraniol percentage decreased in response to N6-benzylaminopurine application. The total protein concentration increased in response to cytokinin treatment. In the second experiment it was evaluated the effects of weekly, biweekly and absence of applications of N6-benzylaminopurine on essential oil and production of lemongrass growing under field conditions and shade. It was used randomized blocks design in factorial scheme (2 x 3) with eight replications. Weekly applications showed negative effect on leaf area, leaves growth and chlorophyll concentration. The gas exchange was negatively affected by shade, without N6-benzyladenine effects. The essential oil percentage was not influenced by treatments. The percentage of geraniol was higher under shade conditions. The results show that shade and weekly applications of N6-benzylaminopurine had negative effects on lemongrass growth, however, essential oil biosynthesis was not affected by the treatments. Otherwise, with the increase of N6-benzylaminopurine application the citral and geraniol percentages in essential oil were reduced and the total protein concentration in lemongrass leaves rose indicating that the observed effects can be linked to protein expression alterations.

1. INTRODUÇÃO

A produção de óleos essenciais, assim como de outros metabólitos secundários, pode ser influenciada por fatores como estágio de desenvolvimento de toda a planta (vegetativo e reprodutivo), ou de órgãos específicos, e por fatores ambientais (bióticos e abióticos).

As mudanças fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante a ontogenia da planta regulam de forma programada a expressão de genes e a atividade de enzimas envolvidas em rotas do metabolismo secundário. Esta programação genética pode ser influenciada por fatores exógenos que alteram o *status* fisiológico, induzem mudanças bioquímicas e/ou são sinalizadores que desencadeiam uma rede de respostas que culminarão na produção dos metabólitos secundários.

A produção comercial de óleos essenciais tem como principal obstáculo os efeitos dos fatores ambientais sobre o teor e, principalmente, a composição destes. Técnicas de cultivo que permitam produção constante, pouca ou nenhuma variabilidade na composição, associadas à maior produtividade de biomassa são desejáveis.

Óleos essenciais são constituídos basicamente de monoterpenos, grupo de compostos de dez carbonos, biossintetizados a partir do composto C₅ isopentenil difosfato (IPP). O IPP utilizado para a síntese de monoterpenos é

oriundo, predominantemente, da rota MEP (metileritritol 4-fosfato), que ocorre nos cloroplastos, cujo precursor é o metileritritol 4-P, sintetizado a partir de gliceraldeído 3-P e piruvato.

A rota do ácido mevalônico (MVA) no citoplasma também sintetiza IPP e há evidências de trocas deste composto entre as duas rotas. Consecutivas ligações cabeça-cauda entre IPPs, catalisadas por preniltransferases originam monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos e politerpenos. A geranyl difosfato sintase produz o geranyl, que através de reações catalisadas por terpeno sintases específicas originam os diversos monoterpenos (Rodríguez-Concepción, 2006; Cheng et al, 2007).

O capim-limão é uma espécie aromática cujo óleo essencial, rico em citral, é utilizado como aromatizante devido ao intenso aroma de limão, como matéria-prima para síntese de vitamina A e de iononas, que são substâncias com aroma de violeta utilizada em produtos de limpeza. Também produz geraniol, utilizado como fixador em perfumes, além de outros compostos minoritários como mirceno, que tem sido estudado por suas atividades analgésicas (Budavani et al, 1996; Paumgarten, 2003; Silva et al, 2005).

O capim-limão é cultivado no Sul do Brasil, tem produção instável devido às baixas temperaturas que ocorrem nesta região (Gomes et al, 2004). Apresenta crescimento perene e rusticidade que lhe confere maior resistência à seca, quando comparado à espécie *C. flexuosus*, que também produz citral. Além disso, capim-limão requer ambientes com boa incidência de radiação solar e temperaturas diárias de 25 a 30°C (Weiss, 1997). Assim, esta cultura pode ser uma alternativa agrícola para a região de Campos dos Goytacazes - RJ, que possui clima tropical úmido com verão chuvoso, inverno seco e temperatura do mês mais frio em torno de 21°C. A precipitação pluvial anual está em torno de 1.023 mm (Mendonça et al, 2007).

Hormônios vegetais são substâncias biossintetizadas pelas plantas e que possuem funções de coordenação do crescimento e desenvolvimento destas. Já o termo “Reguladores vegetais” engloba substâncias produzidas naturalmente ou sintetizadas em laboratório. Estas últimas podem ou não ser análogas aos hormônios vegetais, e atuam afetando o desenvolvimento vegetal interferindo na fisiologia da planta em processos de síntese de outros compostos, no transporte de substâncias pela planta, e que afetarão o desenvolvimento e crescimento dos

vegetais. Para utilização na agricultura a denominação “reguladores vegetais” é recomendada devido ao impacto negativo que o termo “hormônio vegetal” pode causar ao público. A aplicação destes compostos pode alterar processos vitais ou estruturais que aumentam a qualidade, a produção ou facilitam a colheita (Sanches, 2000).

Dentre os reguladores vegetais está a citocinina. Descoberta na década de 50, a citocinina está associada a processos de proliferação celular. Avanços nas áreas de genética e biologia molecular têm permitido obtenção de informações sobre a biossíntese, transporte, reconhecimento e ação deste regulador. Os compostos *trans*-zeatina (tZ), N⁶-(Δ^2 -isopentenil)adenina (iP), *cis*-zeatina (cZ) e diidrozeatina (DZ) são citocininas de ocorrência natural, sendo tZ e iP as mais comumente encontradas em plantas. O passo inicial da biossíntese de citocininas é catalisado pela adenosina fosfato-isopentenil transferase (IPT) que utiliza como substrato dimetilalil difosfato (DMAPP) e adenosina trifosfato (ATP) ou adenosina difosfato (ADP). A sinalização de citocininas envolve o sistema regulatório de dois componentes: as proteínas sensoras transmembrana e os reguladores de resposta citoplasmáticos. A sinalização ocorre por fosforilação dos resíduos histidina e aspartato dos dois componentes. O transporte se dá pelo xilema, através do fluxo transpiratório. Alguns processos, nos quais estão envolvidas as citocininas são: retardo da senescência foliar, síntese de pigmentos, produção de cloroplastos, diferenciação celular, regulação da expressão gênica e indiretamente influencia a síntese de compostos como jasmonato e ácido salicílico, ritmo circadiano, função dos fitocromos e modulação das respostas à luz (Sano et al, 1996; Brault e Maldiney, 1999; Chernyad'ev, 2000; Kulaeva e Kusnetsov, 2002; Chen et al, 2006; Hirose et al, 2007; Ioio et al, 2007; Naito et al, 2007; Yakir et al, 2007).

A aplicação de reguladores vegetais visando o aumento da produção de óleos essenciais pode ser verificada *in vitro* e *in vivo*. Vários experimentos indicam efeito positivo da aplicação de citocininas na produção de terpenos (El-Ketawi e Croteau, 1987a; El-Keltawi e Croteau, 1987b; Decendit et al, 1993; Farooqi et al, 1993; Stoeva e Iliiev, 1997; Sudriá et al 1999; Khandelwal et al, 2002; Farooqi et al, 2003; Arikat et al, 2004; Sudriá et al, 2004; Papon et al, 2005; Silva et al, 2005; Weathers et al, 2005; Scravoni et al, 2006; Oudin et al, 2007; Shah, 2007). No entanto, deve-se considerar que as respostas variam de acordo

com a espécie em questão e estágio de desenvolvimento desta, e de outros fatores que influenciam a ação dos reguladores como condições ambientais, pH da solução e quantidade do produto aplicado (Sanches, 2000).

O efeito da aplicação de citocininas sobre a produção de óleo essencial pode estar relacionado a fatores como: aumento da atividade fotossintética como consequência do aumento do número de cloroplastos e/ou maior síntese de clorofila; aumento da produção de biomassa; aumento do número de estruturas de armazenamento, que em capim-limão são idioblastos localizados no mesófilo foliar; maior período de produção de óleos essenciais devido ao retardo na senescência foliar, uma vez que a produção destes compostos ocorre em folhas jovens; intensificação de sinais exógenos, como por exemplo, luz; ou ainda, estímulo à atividade de enzimas relacionadas a etapas de biossíntese de monoterpenos.

A avaliação dos efeitos de citocinina sobre a produção de óleo essencial em capim-limão sob sombreamento possibilitará a aquisição de conhecimento sobre a regulação da biossíntese de óleos essenciais, a ação de citocinina em uma poácea aromática.

Este trabalho possui como objetivos gerais avaliar o efeito de aplicações de N⁶-benzilaminopurina sobre a produção e composição do óleo essencial e crescimento de *Cymbopogon citratus*.

Os objetivos específicos foram avaliar:

- Produção de matéria fresca e seca de folhas e perfilhos
- Área foliar
- Razão de peso de folhas, razão de peso de perfilhos e razão de área foliar
- Esverdeamento de folhas
- Alongamento foliar
- Trocas gasosas
- Teor de óleo essencial
- Teor de citral e geraniol
- Concentração de proteínas totais

2. REVISÃO DE LITERATURA

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf, popularmente conhecido como capim-limão ou “lemongrass”, é uma espécie da família Poaceae. Essa família é dividida em duas grandes subfamílias: Pooieae e Panicoideae, esta última consistindo em 3 tribos Paniceae, Maydeae e Andropogoneae. Na tribo Andropogoneae encontram-se os gêneros *Cymbopogon* e *Vetiveria*. O gênero *Cymbopogon* Spreng. engloba de 50 a 60 espécies de Poaceae tropicais e perenes (Weiss, 1997). De acordo com Gomes e Negrelle (2003), a classificação botânica do capim-limão é:

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Ordem: Poales

Família: Poaceae (R.BR.) Barnhat

Gênero: *Cymbopogon* Spreng.

Espécie: *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf

Segundo Weiss (1997), muitas espécies do gênero *Cymbopogon* possuem folhagem aromática, sendo esse gênero o mais representativo da família Poaceae quanto à produção de óleos essenciais, uma vez que poucas gramíneas são aromáticas. Espécies do gênero, cujo centro de origem é o Sudeste Asiático, são cultivadas para extração de óleos essenciais da parte aérea (Ortiz et al., 2002).

É uma planta C₄ (Lewinsohn et al., 1998) tipo NADP-ME, ou seja, enzima málica NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) dependente (Berthea et al., 2003). Rajendrudu e Das (1981), estudando características fotossintéticas de gramíneas tropicais aromáticas, dentre as quais se encontravam espécies do gênero *Cymbopogon*, verificaram que essas apresentaram baixo ponto de compensação de CO₂ (0-5 $\mu\text{L.L}^{-1}$). O CO₂ não foi limitante com o aumento da densidade de fluxo de fótons fotossintetizantes. A fotossíntese líquida ótima ocorre sob altas temperaturas (35°C), as espécies apresentaram também altas taxas fotossintéticas líquidas (55-67 mg CO₂ dm⁻² área foliar h⁻¹ ou 34-42 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e pouca ou nenhuma resposta da fotossíntese às alterações na concentração de O₂.

De modo geral, espécies do gênero *Cymbopogon* são resistentes à seca, e somente deficiências nutricionais severas reduzem significativamente a produtividade (Ortiz et al., 2002).

É uma planta que cresce formando touceiras de 1 m ou mais de altura. Apresenta rizomas curtos e inflorescências em pares de racimos espiciformes, terminais, 30-60cm de comprimento, porém raramente floresce, sendo propagada por divisão de touceiras (Weiss, 1997; Gomes e Negrelle, 2003). Plantas cultivadas sobrevivem de 4 a 5 anos. Os perfilhos apresentam coloração verde brilhante, e seu número afeta significativamente a quantidade de folhas produzidas. Raízes de *C. citratus*, embora extensas, não são profundas. De acordo com Tscherning et al (1995), as raízes concentram-se nos primeiros 30 cm a partir da superfície do solo.

As folhas possuem bainhas fechadas na base e estriadas, lígula membranácea ou árida, 4-5mm de comprimento, lâminas eretas, planas, ponta cetácea, aproximadamente 1m de comprimento e 5-15mm de largura. As folhas são longas e estreitas (1x3 m), cespitosas quando jovens e decumbentes na maturidade (Weiss, 1997; Gomes e Negrelle, 2003).

A anatomia da lâmina foliar revela que o mesofilo é homogêneo, encontrando-se no lado adaxial as células buliformes, enquanto na região mediana situam-se os feixes vasculares maiores, ligados por extensões de bainha esclerenquimática a ambas as faces da epiderme. Entre os feixes vasculares observam-se três a cinco pequenos feixes vasculares ligados apenas à epiderme abaxial. O mesofilo apresenta-se com clorênquima composto por células pequenas e isodiamétricas. A bainha que envolve o feixe vascular é dupla, esclerenquimática e cercada por células com parede espessada uniformemente. As epidermes são formadas por células pequenas de parede cutinizada e consistem de células retangulares longas e curtas, com o eixo paralelo ao comprimento das folhas. Ocorre presença de abundantes estômatos, observados nas duas faces das folhas. Nas epidermes foram encontrados tricomas aculiformes, pontiagudos e unicelulares, inseridos na região das nervuras da folha. Entre as regiões das nervuras encontram-se micro-pêlos (Martins et al., 2004).

Diferentemente de outras plantas aromáticas, *C. citratus* não possui tricomas glandulares na superfície das folhas. Segundo Lewinsohn et al. (1998), o óleo essencial é armazenado em células de óleo no parênquima das folhas (idioblastos), as quais têm como característica a pronunciada lignificação das paredes celulares, o que pode estar relacionado a um mecanismo de proteção do tecido por meio da formação de uma barreira impermeável que mantém o óleo isolado das células adjacentes.

Folhas jovens e em expansão sintetizam e acumulam óleo essencial. Ao longo do processo de maturação a capacidade de biossíntese de óleos essenciais nas folhas é reduzida. As lâminas foliares possuem mais óleo que as bainhas, e há aumento de óleo essencial da base da folha para o ápice. Análises microscópicas indicam que a produção de óleo essencial ocorre em células do parênquima clorofiliano e da bainha do feixe vascular (Weiss, 1997; Lewinsohn et al, 1998; Ventrella e Ambrósio, 1999; Martins et al, 2004). Em *C. flexuosus*, Singh et al (1989) verificaram que a máxima produção de óleo essencial ocorreu em folhas com 20 dias de idade.

O teor de óleo essencial obtido de um corte típico, que inclui colmos e folhas, pode ser, em média, de 0,25 a 0,35%. Porém, teores acima de 0,60% podem ser obtidos (Weis, 1997). Em condições experimentais, aplicando-se

diferentes níveis de confinamento do sistema radicular, foi observado que os teores variaram de 0,35% a 0,95%, em plantas cultivadas em vasos de 1,5L e 42L, respectivamente (Prins, 2007).

Capim-limão caracteriza-se pela produção de óleo essencial com intenso aroma de limão. Este aroma é atribuído ao citral, que consiste em uma mistura dos isômeros neral e geranial, considerados os constituintes majoritários do óleo essencial (Akhila, 1985; Singh-Sangwan et al., 1993). Óleos essenciais que apresentam acima de 75% de citral são considerados de boa qualidade (Schaneberg e Khan, 2002). Na tabela 1 e figura 1 são apresentados os compostos que podem estar presentes no óleo essencial de capim-limão de acordo com Weiss (1997).

Tabela 1: Substâncias detectadas em óleo essencial de *C. citratus* (Weiss, 1997)

SUBSTÂNCIA	PERCENTUAL
Geranial	45,2 - 55,9
Neral	25 - 28
Mirceno	8,2 - 19,2
Geranil Acetato	1,0
Linalol	0,8 - 1,1
Geraniol	0,5 - 0,6
6-metilhepta-5-en-2-ona	0,5 - 2,3
Undecan-2-ona	0,4 - 0,6
Nerol	0,3 - 0,4
Nonanal	0,2 - 0,7
α - terpineol	0,2 - 0,3
<i>cis</i> - β - ocimeno	0,2
1,8 cineol	0,2
Borneol	0,1 - 0,4
<i>Trans</i> - β - ocimeno	0,1 - 0,2
α - tujona	0,1
Citronelal	0,1
Citronelol	0,1
α - tujeno	traços - 0,1
Limoneno	traços

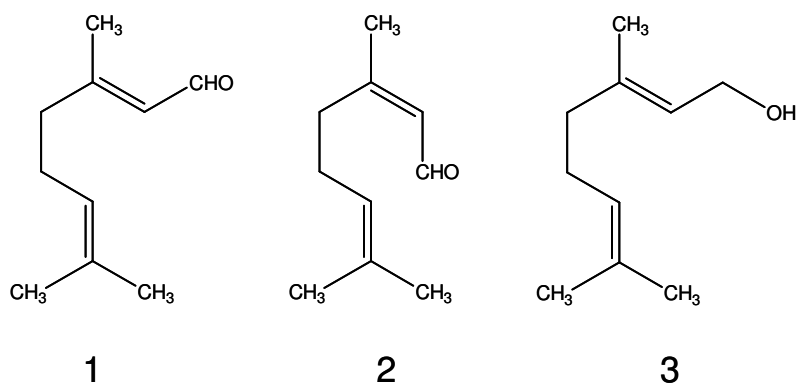


Figura 1: Estruturas químicas de geranial (1), neral (2) e geraniol (3).

Óleos essenciais são misturas de compostos voláteis e aromáticos, predominantemente, monoterpenos. Terpenos (ou terpenóides) são substâncias oriundas da condensação de unidades de isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP), que possuem cinco carbonos. As consecutivas condensações destes “blocos” de C_5 originam os grupos de terpenos: monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e politerpenos ($C_{>40}$).

Em células vegetais IPP e DMAPP podem ser sintetizados a partir de duas rotas espacialmente distintas. No citoplasma, IPP/DMAPP são produzidos via mevalonato (rota MVA). Nos plastídios, o composto que origina IPP/DMAPP é o metileritritol 4-fosfato (rota MEP). Tem sido verificado que o IPP produzido no citoplasma é utilizado para produção de sesquiterpenos e triterpenos, enquanto nos plastídios (cloroplastos) são produzidos monoterpenos, diterpenos e politerpenos (Rodríguez-Concepción, 2006; Nagegowda, 2010).

A rota MEP, elucidada há, aproximadamente, 10 anos, tem sido amplamente estudada. Essa rota não é observada em arqueobactérias, fungos e animais. Embora genes e enzimas desta rota tenham sido rapidamente identificados na última década, pouco se conhece sobre os mecanismos que

regulam o fluxo metabólico através da rota, a troca de produtos entre esta e a rota MVA, e sua coordenação com passos posteriores da rota para produção de produtos finais nos plastídios (Rodríguez-Concepción, 2006; Ashour et al, 2010).

Além de fatores endógenos, como estágio de desenvolvimento de toda a planta (vegetativo x reprodutivo) e de órgãos específicos (folha, fruto, flores), fatores exógenos (bióticos e abióticos) podem influenciar a produção de óleos essenciais (Sangwan et al., 2001; Lima et al, 2003; Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

De acordo com Singh et al. (1989), em *C. flexuosus*, a segunda folha (do interior para o exterior do perfilho) apresentou maior produção de óleo essencial. Entre o 10º e 20º dia de crescimento da folha houve substancial aumento na quantidade de óleo essencial. Neral e geranial (citról) também aumentaram até o 20º dia, quando então permanecem constantes. Por outro lado, geraniol aumentou rapidamente e em seguida decresceu. A produção de óleos essenciais em várias espécies, inclusive no gênero *Cymbopogon*, está associada ao período inicial de crescimento (Sangwan et al, 2001).

Leal (1998) avaliando a produção de óleo essencial de *C. citratus* em função de fatores endógenos e exógenos, verificou que houve resposta da espécie às influências estacionais e variação de produção ao longo do dia. De acordo com o autor o plantio em junho com colheita em outubro proporcionou maiores rendimentos de óleo essencial devido ao nível de radiação solar incidente no período, que teria favorecido a atividade fotossintética e, conseqüentemente, o metabolismo secundário.

As alterações sazonais resultantes das mudanças do comprimento do dia (fotoperíodo) são reguladas pelo sistema circadiano, enquanto as variações diárias são controladas pelo relógio circadiano (Yakir et al, 2007).

De acordo com Zheng et al (2006), a luz é o maior fator externo que atua no controle do ritmo circadiano em plantas superiores.

Em revisão sobre fatores que regulam a produção de óleos essenciais, Sangwan et al. (2001) comentam o efeito da modulação fotoperiódica e qualidade da luz. Relatam que em *Cymbopogon khasianus* foi verificado aumento da biossíntese de citról sob dias curtos. Quanto à qualidade da radiação luminosa, os autores observaram que em folhas destacadas de *C. flexuosus* expostas à luz vermelha houve aumento de, aproximadamente, 30% na biossíntese de óleo

essencial. Os autores sugerem a participação de fitocromos no processo metabólico de biossíntese de óleos essenciais.

Segundo Rodriguez-Concepción (2006), a luz está envolvida na regulação positiva da rota MEP. A luz pode aumentar o fluxo metabólico, através do aumento das atividades das enzimas DXR (deoxi-xilulose 5-fostato redutoisomerase), envolvida nos passos iniciais da rota e, HDS e HDR (hidroximetilbutenil difosfato sintase e hidroximetilbutenil difosfato redutase), envolvidas nos passos finais da produção de IPP. Dados apontam para um modelo de regulação mediado por luz durante os estágios iniciais do desenvolvimento das plantas. Em plântulas cultivadas sob iluminação o fluxo metabólico na rota MEP aumenta, através de regulação positiva de genes da rota e talvez pela atividade de algumas enzimas como aquelas potencialmente reguladas pelo sistema ferredoxina/tiorredoxina. Pode haver também aumento da disponibilidade de substratos (gliceraldeído 3-fosfato e piruvato) oriundos da fotossíntese, conseqüentemente elevando a produção de IPP e DMAPP.

De acordo com Voirin e Bayet (1996), a luz é um dos mais importantes fatores na regulação da composição dos óleos essenciais. Embora as variações na composição de monoterpenos possam estar ligadas à atividade fotossintética, não se deve descartar a influência dos fitocromos na regulação da biossíntese de óleos essenciais.

Rios-Esteva et al (2008) verificaram que em menta a produção de óleo essencial foi reduzida em 50% quando as plantas foram mantidas sob baixa luminosidade ($300\mu\text{ mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$).

Plantas que produzem e/ou emitem óleos essenciais podem apresentar produção/emissão regulada por ritmo circadiano. Em *Rosa hybrida*, Helsper et al (1998) observaram variação da composição dos voláteis no ciclo de 24 horas. Relatam que o fator de controle desta periodicidade é a luz, uma vez que plantas mantidas no escuro emitiram voláteis, porém, sem variação da composição.

As plantas possuem mecanismo de aclimatação a gradientes de luz que permite o uso eficiente desta para fotossíntese, garantindo assim a sobrevivência. Para tanto, há um sistema de percepção do gradiente de luz que traduz os sinais resultando na apropriada regulação das enzimas fotossintéticas e outros processos associados. A citocinina transportada pelo fluxo xilemático possui importante função neste sistema. Vários mutantes para receptores de citocinina

apresentaram redução da capacidade fotossintética em resposta ao sombreamento (Boonman and Pons, 2007).

Boonman et al (2007), utilizando tabaco e *Arabidopsis*, demonstraram que a distribuição de citocininas nestas plantas é regulada pela taxa transpiratória, e que este hormônio é responsável por mediar os efeitos do sombreamento na copa das plantas, assim como os efeitos de diferentes intensidades de luz, através da regulação de genes envolvidos na atividade fotossintética.

Citocininas podem induzir a expressão de vários genes regulados pela luz (Kieber, 2002). Foram descobertas funções da citocinina como produto intermediário nos processos de desenvolvimento regulados pela luz, como a diferenciação dos cloroplastos, o desenvolvimento do metabolismo autotrófico e a expansão de folhas e cotilédones (Neto et al., 2004). De acordo com To e Kieber (2008), citocininas participam da regulação do ritmo circadiano e do controle da atividade do fitocromo.

As citocininas podem, ainda, estimular a síntese de metabólitos secundários, como betacianinas e alcalóides indólicos (Brault e Maldney, 1999).

Segundo Brault e Maldney (1999), a ação das citocininas pode ser célula-específica, podendo estas agir sinérgica ou antagonicamente com outros sinais endógenos, como outros hormônios, ou exógenos, como a luz. Em relação à luz, as citocininas podem modular a resposta a este fator, agir em conjunto ou controlar os mesmos processos que esta, porém de maneira independente. Isto exemplifica e explica porque as citocininas são elicitoras de diferentes respostas biológicas. As diferentes respostas a citocininas podem estar relacionadas a diversas rotas de transdução deste hormônio nas células vegetais.

Chen et al (2006) verificaram que houve maior acúmulo de antocianina em plântulas de *Arabidopsis* sob luz azul, e que a aplicação de citocinina aumentou o acúmulo deste composto. Concluíram, ainda, que a luz azul é reconhecida pelo fotorreceptor criptocromo 1 (CRY 1). Em mutantes que não apresentam o fotorreceptor CRY 1 as citocininas cinetina e zeatina não apresentaram o efeito positivo sobre o acúmulo de antocianina observado em plantas selvagens. Com isto concluíram que a produção de antocianina é regulada por luz azul e que a citocinina contribui para aumentar o acúmulo deste composto de forma CRY1-dependente. Guo et al (2005) também verificaram que citocinina modula o sinal de luz para a síntese de antocianina. Naito et al (2007)

verificaram que luz e citocinina regulam o gene *CGA1* (*CYTOKININ-RESPONSIVE GATA FACTOR 1*), que codifica o fator de transcrição GATA, envolvido na resposta à luz em *Arabidopsis thaliana*.

Estudos com *Lupinus alba* L., demonstraram que N6-benzilaminopurina induziu a síntese do citocromo b559 no escuro e que após o acúmulo desta proteína, luz e citocinina causaram efeitos sinérgicos (Chernyad`ev, 2000).

A citocinina é um regulador que participa de eventos ao longo de toda a ontogenia da planta, desde o desenvolvimento do óvulo fertilizado até a senescência e morte, estando envolvida em processos como controle da divisão celular, iniciação e crescimento da parte aérea, retardo da senescência foliar, controle do desenvolvimento dos cloroplastos e modulação do metabolismo e morfogênese em resposta a estímulos ambientais (Chenyad`ev, 2000; Kieber, 2002; Kulaeva e Kusnetsov, 2002; Hirose et al, 2007). Em tabaco foi verificado que citocinina participa da regulação de níveis endógenos de jasmonato e ácido salicílico, hormônios vegetais envolvidos na resposta ao estresse (Sano et al, 1996). A citocinina atua em respostas a ataque de insetos, por meio do aumento do fluxo da rota octadecanoide que origina o jasmonato. Os autores relataram que a expressão de genes regulados por citocinina também podem ser elicitados por outros estímulos (Yu e An, 2000).

Altas concentrações de citocininas resultaram em aumento do diâmetro do caule devido ao aumento das células corticais e epidérmicas, houve, ainda, inibição da atividade do meristema apical e aumento da produção de raízes. Em cultura de células elevadas concentrações de BAP, promoveram a morte celular programada, acelerando a senescência (Guo et al, 2005; Oliveira et al, 2007).

Por muito tempo acreditou-se que citocininas eram produtos oriundos de microrganismos rizogênicos, já que muitos destes, que estão associados às raízes, como por exemplo, *Bradyrhizobium*, *Azobacter*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Frankia* e fungos micorrízicos, podem sintetizar essas substâncias (Kulaeva e Kusnetsov, 2002).

Na década de 50, Skoog e Miller observaram que o endosperma de coco era um potente ativador da produção de células em cultura de tecidos de tabaco. Posteriormente identificaram um derivado de adenina como composto ativo, a cinetina. Em seguida foi isolada a zeatina em endosperma de milho, caracterizada como a primeira citocinina de ocorrência natural (Kieber, 2002).

Em poáceas, citocininas são particularmente importantes para o perfilhamento. Suge e Iwamura (1993) verificaram que citocinina (2iP) apresentou efeito positivo no perfilhamento de cevada (*Hordeum vulgare* L. cv Chikurin Ibarage nº 1), enquanto a substância anticitocínica CCET (4-cloro-2-ciclobutilamino-6-etilamino-s-triazina) inibiu o perfilhamento da espécie. O perfilhamento em poáceas é agronomicamente importante, pois o aumento da emissão de perfilhos e o desenvolvimento destes podem resultar em aumento da produtividade (Harrison e Kaufman, 1980). Esses mesmos autores observaram que a interação entre os diversos reguladores vegetais influenciou o perfilhamento em aveia (*Avena sativa* L.), sendo a citocinina importante para a iniciação do perfilhamento, enquanto auxina e ácido abscísico atuam como inibidores. Chenyad`ev (2002) verificou que a aplicação das citocininas sintéticas tidiazuron (TDZ), N6-benzilaminopurina e Kartolin-2 aumentou a área foliar específica em poáceas.

Citocininas naturais são derivados de adenina, classificadas de acordo com a natureza da cadeia na região N-6, que pode ser isoprenóides ou aromáticas (Spíchal et al., 2007).

N6-benzilaminopurina (BAP) é um análogo sintético da citocinina, derivado de purina. Demonstra alta atividade fisiológica e assim como a cinetina é amplamente utilizado em estudos *in vitro* e *in vivo*. Também tem como característica ser resistente à ação da citocinina oxidase, enzima responsável pela degradação das citocininas (Chenyad`ev, 2002).

O uso de fitorreguladores está sendo muito utilizado na agricultura devido às suas influências positivas na quantidade e qualidade de produção. É uma prática já difundida principalmente em países com pequena extensão territorial, onde se faz necessário o uso de tecnologia para a obtenção de maiores produtividades e de produtos de melhor qualidade. Pouco se conhece, porém, sobre os efeitos destas substâncias em plantas medicinais e aromáticas (Povh e Ono, 2006).

Segundo Farooqi e Shukla (1990), reguladores de crescimento vegetal estimulam o crescimento e a biossíntese de terpenos em várias espécies aromáticas, o que resulta em mudanças benéficas na qualidade e quantidade de terpenos.

Em suspensão de células de *Catharantus roseus*, Decendit et al (1993) e Papon et al (2005) observaram que citocinina (zeatina) aumentou a atividade da enzima geraniol 10-hidroxilase, que atua na rota de síntese da porção terpênica dos alcalóides indólicos encontrados na espécie, como ajamalicina, serpentina e catharantina. Oudin et al (2007) também verificaram que a adição de citocinina ao meio de cultura aumentou a produção de alcalóides que possuem cadeia terpênica.

No cultivo *in vitro* de *Lavandula dentata* L. a aplicação de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de citocinina (BAP) no meio de cultura apresentou efeito positivo na capacidade de produção e/ou acúmulo de óleo essencial. O aumento foi de 150% em relação ao controle. Quanto às glândulas, citocinina influenciou o desenvolvimento destas, retardando o estágio pós-secretório. A constituição química do óleo essencial não foi alterada, sendo mantidos os compostos majoritários, que representam 80% da composição do óleo (1,8-cineol, fenchol, cânfora e borneol). No entanto, a aplicação de citocinina resultou em aumento do percentual de cânfora e decréscimo de 1,8-cineol. A atividade da 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase (enzima envolvida na rota MVA), também apresentou aumento (140%) no tratamento com citocina. O aumento da atividade da HMG-CoA redutase não está diretamente relacionado ao aumento da produção de óleo, mas sim ao aumento de todo o metabolismo da planta, o que requer fornecimento de produtos oriundos da rota em questão para o metabolismo primário. Quanto à alteração da composição pode ter ocorrido uma influência do regulador de crescimento sobre as atividades das enzimas envolvidas (Sudriá et al 1999).

Stoeva e Iliev (1997) aplicando citocininas (4PU-30 – 25 e 50 mg.L^{-1} ; DROPP – 50 E 100 mg.L^{-1}) em menta [*Mentha spicata* (L.) Huds. cv. CS-87], observaram variação na composição do óleo essencial, como aumento de 1,8-cineol, e redução de carvona.

Arikat et al (2004) observaram que em sálvia cultivada *in vitro* houve maior teor de óleo essencial, que em plantas cultivadas em casa-de-vegetação. Os autores atribuem esta resposta à influência da citocinina no meio de cultura.

Plantas de lavanda cultivadas *in vitro* durante 8 semanas e com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP apresentaram maior número de folhas, e estas tinham verde mais intenso que as plantas controle. BAP também retardou o envelhecimento das plantas. O número de glândulas na superfície das folhas de plantas tratadas com BAP foi

menor, no entanto, estas não estavam rompidas. Isto foi atribuído ao retardo na diferenciação, o que manteve as glândulas no estágio pré-secretório. No experimento também foi aplicada auxina (ácido indolbutírico - IBA). Assim como para BAP plantas tratadas com auxina apresentaram menor número de glândulas, porém grande número de glândulas estava rompido (estágio pós-secretório), indicando que a auxina acelerou a diferenciação destas. A adição de BAP no meio reduziu o tamanho das células do mesofilo e aumentou a quantidade de cloroplastos. Em plantas que receberam $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP foi observado grande número de gotículas de óleo no cloroplasto (Sudriá et al, 2004).

Melissa officinalis cultivada em meio de cultura por 60 dias com adição de auxina e citocinina (ácido indolacético (IAA) $11,42 \text{ } \mu\text{mol/L}$ e BAP $8,87 \text{ } \mu\text{mol/L}$ e IAA+BAP), apresentou aumento de 1,4 vezes na proporção de nerol e 4,1 vezes de geraniol. Enquanto plantas crescidas no meio de cultivo controle e *ex vitro* apresentaram maior percentual de neral e geraniol. Foi sugerido que os reguladores adicionados ao meio de cultura inibiram a redução de alcoóis a aldeídos (Silva et al, 2005).

A adição de 2iP [6-(γ,γ -dimetilalilamino)purina] em cultura de raízes de artemísia (*Artemisia annua*) resultou em aumento de artemisinina (Weathers et al, 2005).

A resposta a citocinina em cultura de tecidos é bem conhecida. No entanto, a resposta de toda a planta ainda é inespecífica e generalizada.

De acordo com Farooqi et al (2003), reguladores de crescimento vegetal são comumente utilizados para aumentar a produtividade de menta (*Mentha* sp.). Na espécie *M. arvensis* a maturação das folhas leva a uma instabilidade na produção de biomassa e de óleo essencial. Estes autores observaram que aplicação de cinetina (200 mg.Kg^{-1}) durante o cultivo das cultivares 'Shivalik', 'Kosi', 'Himalaya' e 'Kalka' resultou em redução da abscisão foliar, aumento da área foliar, da produção de biomassa e da produção de óleo essencial. No entanto, o aumento do conteúdo de óleo essencial foi devido ao aumento da biomassa. A aplicação de cinetina também resultou em aumento do conteúdo de clorofila e decréscimo da atividade da peroxidase, sendo este conjunto de fatores responsáveis pelo retardo na senescência das folhas.

A aplicação exógena de citocinina em *Nigella sativa*, planta medicinal e aromática, estimulou a expansão da área foliar, acúmulo de clorofila e ontogênese de plastídios, assim como a produção de matéria seca. O autor verificou que a resposta à aplicação de citocinina varia com a idade da planta, sendo mais eficiente na fase vegetativa (Shah, 2007).

Khandelwal et al (2002) observaram aumento da produção de óleo essencial em henna (*Lawsonia inermis* L.) submetidas à aplicação de 2000 mg.Kg⁻¹ de tiouréia.

Em experimento com aplicação exógena de citocinina (BAP – 50 mg.L⁻¹) a cada quinze dias foi observado que houve aumento da massa seca em *Mentha piperita* L. A época da aplicação não influenciou o rendimento do óleo, porém alterou a composição do óleo essencial (Scravoni et al, 2006).

El-Ketawi e Croteau (1987a), aplicaram diferentes fontes de citocininas (cinetina, difeniluréia, benzilaminopurina e zeatina) em concentrações de 1-10 mg.Kg⁻¹ em espécies da família Lamiaceae (*Mentha piperita*, *M. spicata*, *M. suaveolens*, *Salvia officinalis* e *Lavandula vera*). Verificaram que cinetina e difeniluréia foram as mais efetivas no aumento da produção de óleo essencial. Embora tenham sido detectadas alterações dos monoterpenos oxigenados, as citocininas não alteraram drasticamente a composição do óleo essencial das espécies estudadas. Houve redução do teor de alguns compostos, no entanto os níveis absolutos aumentaram. De acordo com os autores o efeito primário das citocininas foi o estímulo da concentração de monoterpenos. Os efeitos da cinetina e da difeniluréia foram maiores que aqueles atribuídos a efeitos relacionados à alteração do crescimento e desenvolvimento, ou na formação e densidade de glândulas, assim foi sugerido que houve efeito no metabolismo. Para avaliar esta hipótese foram extraídas enzimas que participam da rota de síntese de compostos de *Salvia officinalis* e *M. piperita* em pontos chave. Foi observado que a atividade das enzimas analisadas (bornil pirofosfato ciclase de *S. officinalis* e limoneno ciclase de *M. piperita*) foi maior em plantas tratadas com 10 mg.Kg⁻¹ de difeniluréia que em plantas não tratadas. Assim os autores concluem que a aplicação foliar de citocinina estimulou o acúmulo de óleos essenciais, ao menos em parte, devido ao efeito direto no metabolismo dos monoterpenos.

O estresse salino causou redução da produção de óleo essencial em *Mentha spicata* e *Majorana hortensis*. Aplicações de citocininas (difeniluréia e zeatina – 10 mg.Kg⁻¹) em plantas sob estresse salino resultaram em reversão da inibição do crescimento e restaurou a produção de óleo essencial em níveis semelhantes aos das plantas controle (El-Keltawi e Croteau, 1987b).

Farooqi et al (1993) aplicaram cinetina em *Rosa damascena* nas concentrações de 5 mg.L⁻¹ e 20 mg.L⁻¹. A concentração de 5 mg.L⁻¹ aumentou a produção de citronelol + geranyl acetato em 8% no primeiro ano de aplicação e 20%, no segundo ano. Para estes mesmos compostos o aumento foi de 13 e 24%, quando foi utilizada 20 mg L⁻¹ no primeiro e segundo ano, respectivamente.

Figueiredo et al (2006) não verificaram efeito da aplicação de reguladores vegetais em diferentes épocas do ano em *C. citratus*. Houve efeito apenas das épocas de colheita, onde os maiores teores foram obtidos no inverno. De acordo com os autores, este resultado foi devido à redução da temperatura nesta estação, o que se caracteriza como fator de estresse e que como resposta às condições desfavoráveis a espécie apresentou aumento da produção de óleos essenciais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Avaliação do efeito da intensidade luminosa e aplicação de diferentes concentrações de N6-benzilaminopurina sobre a composição do óleo essencial e produção de *C. citratus*

O experimento foi conduzido na Unidade de Apoio à Pesquisa do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UAP/CCTA/UENF), situada na cidade de Campos dos Goytacazes – RJ (21°45.229'S 41°19.538'O), no período de janeiro de 2009 a agosto de 2010. A região apresenta clima tropical úmido com verão chuvoso, inverno seco e temperatura do mês mais frio em torno de 21°C. A precipitação pluvial anual é de 1.023 mm em média (Mendonça et al, 2007).

As mudas de capim-limão (*Cymbopogon citratus* – nº de tombo 436381, Jardim Botânico do Rio de Janeiro/RJ) foram obtidas através de propagação vegetativa (divisão de touceiras) utilizando-se como matrizes plantas da coleção de plantas medicinais da UAP/CCTA/UENF.

As plantas foram cultivadas em vasos de 42 L preenchidos com substrato composto por mistura de solo, areia e esterco bovino curtido, na proporção de 1:1:1 v/v. Utilizou-se uma planta por vaso. Os vasos foram dispostos no campo no espaçamento de 1 x 1 m.

Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial (2 – ambiente de cultivo x 7 – concentrações de N6-benzilaminopurina) com cinco repetições.

O experimento foi conduzido durante os meses de janeiro a agosto de 2009, totalizando 210 dias. As plantas foram cultivadas em dois ambientes: condições de campo (SOL), no qual os vasos foram dispostos no campo e sombreado (SOMBRA), com cultivo em casa de vegetação revestida com tela do tipo sombrite de 35%, acrescida de tela sombrite 50%.

A radiação média, verificada com aparelho de medida de fluxo de fótons fotossintéticos (Quantum Meter, Spectrum Technologies, Modelo LQS-QM) na condição de campo foi de $1210 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No interior da casa de vegetação com o uso da cobertura a radiação solar média foi de $183 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o que representa redução de, aproximadamente, 85%.

Aos 203 dias após o plantio, aproximadamente 7 meses, realizou-se a aplicação da citocinina sintética N6-benzilaminopurina (BAP), fornecida pela empresa Microbiológica, nas seguintes concentrações: 0; 30; 60; 90; 120; 150 e 180 mg.L^{-1} . Cada planta recebeu uma única aplicação de 50 mL da solução BAP acrescida de 3-4 gotas de Tween 80 uma semana antes da colheita pela manhã (8h). Nas plantas controle foram aspergidos apenas 50 mL de água deionizada acrescida de 3-4 gotas de Tween 80. Para as aplicações foram utilizados pulverizadores manuais Utrajet 500 mL, marca Guarany®.

Para evitar a perda de água por evaporação utilizou-se palhada como cobertura morta na superfície dos vasos. As plantas cultivadas em condições de campo foram irrigadas diariamente, exceto nos períodos chuvosos, com volume médio de 5,2 mm/dia. As plantas cultivadas em casa de vegetação foram irrigadas diariamente com volume médio de 4 mm/dia. O percentual de umidade (peso) do substrato foi de 31,5%, em média. Os vasos foram monitorados quanto à ocorrência de plantas invasoras, sendo estas retiradas manualmente quando necessário. Os dados climáticos dos períodos experimentais encontram-se no apêndice (Figuras 1A, 2A, 3A, 4A, 5A e 6A).

Inicialmente foram colhidas as folhas com corte a 20 cm da superfície do substrato e em seguida foram colhidos os perfilhos. Todo o material foi levado ao laboratório para pesagem e determinação da matéria fresca total (MFT), matéria fresca de folhas (MFF) e matéria fresca de perfilhos (MFP).

Em seguida foram separadas 25 folhas, que foram pesadas e levadas para medida da área foliar em um medidor de área foliar Modelo 3100 Li-Cor (Setor de Fisiologia Vegetal do Laboratório de Melhoramento Genético – CCTA/UENF). Após determinação da área foliar, as folhas foram levadas para secagem (70°C) em estufa com circulação forçada de ar por uma semana. Após esse período o material foi pesado diariamente, sendo considerado peso constante após três medidas consecutivas sem variação do peso. A determinação da área foliar total foi realizada conforme descrito por Benincasa (2003).

Para determinação da matéria seca de folhas foram obtidas cinco amostras de 10 g de folhas frescas. A matéria seca de perfilhos foi obtida através de 3 amostras de 10 g de perfilhos frescos. As amostras de folhas e perfilhos foram submetidas à secagem como descrito anteriormente para as amostras destinadas à determinação da área foliar. Após obtenção do peso seco das amostras de folhas e perfilhos foi feito o cálculo da matéria seca de folhas e perfilhos utilizando-se como referência a matéria fresca destes previamente avaliada, conforme a fórmula:

$$\{[(\text{Peso fresco total } X) * (\text{Peso seco da amostra } X)] / (\text{Peso fresco da amostra } X)\}$$

onde,

X = folhas ou perfilhos

Foram avaliadas ainda as razões de peso de folhas e de perfilhos calculadas através da razão entre a massa seca de folhas ou de perfilhos e a massa seca total **(1)** e razão de área foliar, que consiste na razão entre a área foliar total e a matéria seca total **(2)** (Benincasa, 2003).

$$[(\text{Matéria seca de } X) / (\text{Matéria seca total})] \quad \mathbf{(1)}$$

$$[(\text{Área foliar total}) / (\text{Matéria seca total})] \quad \mathbf{(2)}$$

onde,

X= folhas ou perfilhos

Para a extração do óleo essencial utilizou-se, aproximadamente, 100g de folhas frescas. Foi utilizada a técnica de hidrodestilação em aparelho Clevenger. O tempo de extração foi de 2h contadas a partir do início da coleta de óleo essencial e hidrolato no tubo coletor. Ao término da extração a fase superior de material do tubo coletor, correspondente ao óleo essencial, foi coletada com auxílio de uma pipeta graduada. Determinou-se a massa de óleo extraído. O teor de óleo essencial foi determinado dividindo-se a massa de óleo obtida pela massa de material utilizado (seca), em seguida multiplicando-se o valor por 100, obtendo-se assim o percentual. O óleo essencial foi armazenado em freezer (-18 °C) para posterior avaliação da composição química.

A composição química do óleo essencial obtido em plantas tratadas com 0; 60; 120 e 180 mg.L⁻¹ de BAP foi analisada através de cromatografia gasosa em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas Shimatzu 17A (Setor de Química de Produtos Naturais do Laboratório de Ciências Químicas – CCT/UENF). Foram quantificados os teores de citral (neral e geranial) e geraniol. Para determinação das concentrações dessas substâncias no óleo essencial foi utilizado o método de calibração externa com uso dos padrões citral (95%, mistura cis/trans – Sigma Aldrich) e geraniol (P.A. Sigma Aldrich). O solvente utilizado para diluição dos padrões e amostras de óleo essencial foi hexano. As características do método utilizado na análise cromatográfica foram: coluna capilar DB5 de 30 m e 0,25 mm de diâmetro interno, temperatura do injetor 200°C, temperatura inicial da coluna de 50 °C, temperatura final da coluna 230 °C, taxa de 15 °C/ minuto, pressão inicial 87,5 KPa, pressão final 171 KPa, taxa 7 KPa/minuto, temperatura do detector 230 °C, razão de split 1:20, *solvent cut* de 3 minutos.

A extração e a quantificação de proteínas totais foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Ciências Biológicas da UENF. Amostras de 200 mg de matéria fresca (MF) de folhas oriundas de plantas tratadas com 0; 60 e 180 mg.L⁻¹ de BAP foram maceradas em N₂ líquido, ressuspendidas em tampão TCA/Acetona (20% tampão ácido tricloroacético TCA, 0,2% de ditionitrosol (DTT), 1mM de fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF) 5 µM de pepstatina) e incubadas por 12h a -20°C. Após essa etapa, as amostras foram

centrifugadas a 12000 g por 30 min, o pellet coletado e lavado por três vezes com acetona gelada, em seguida o pellet foi ressuscitado em 1 mL de tampão uréia/tiouréia e centrifugado a 12000 g por 5 min, a 4°C. A concentração de proteínas foi determinada com o kit 2D-Quant (GE-Healthcare®) que utiliza albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A leitura da absorbância de cada amostra e das concentrações de proteínas utilizadas como padrão foi realizada a 480 nm em leitor de microplacas. A partir da curva padrão obtida foram determinadas as concentrações de proteínas nas amostras.

3.2 Avaliação do efeito da intensidade luminosa e frequência de aplicação de N6-benzilaminopurina sobre a composição do óleo essencial e produção de *C. citratus*

O experimento foi conduzido na Unidade de Apoio à Pesquisa do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UAP/CCTA/UENF), situada na cidade de Campos dos Goytacazes – RJ (21°45.229'S 41°19.538'O), no período de novembro de 2009 a junho de 2010. A região apresenta clima tropical úmido com verão chuvoso, inverno seco e temperatura do mês mais frio em torno de 21°C. A precipitação pluvial anual é de 1.023 mm em média (Mendonça et al, 2007).

As mudas de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) foram obtidas através de propagação vegetativa (divisão de touceiras) utilizando-se como matrizes plantas da coleção de plantas medicinais da UAP/CCTA/UENF.

As plantas foram cultivadas em vasos de 42 L preenchidos com substrato composto por mistura de solo, areia e esterco bovino curtido, na proporção de 1:1:1 v/v. Utilizou-se uma planta por vaso. Os vasos foram dispostos no campo no espaçamento de 1 x 1 m.

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (2 – ambiente de cultivo x 3 – frequência de aplicação), com oito repetições.

O experimento foi conduzido durante os meses de novembro a junho de 2010, totalizando 203 dias. As plantas foram cultivadas em dois ambientes: condições de campo (SOL), no qual os vasos foram dispostos no campo e

sombreado (SOMBRA) com cultivo em casa de vegetação revestida com tela do tipo sombrite de 35%, acrescida de tela sombrite 50%.

A radiação média verificada com equipamento de medida de fluxo de fótons fotossintéticos (Quantum Meter, Spectrum Technologies, Modelo LQS-QM) na condição de campo foi de $1063,89 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No interior da casa de vegetação com o uso da cobertura extra a radiação solar média foi de $162 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o que representa redução de, aproximadamente, 85%.

Para evitar a perda de água por evaporação utilizou-se palhada como cobertura morta na superfície dos vasos. As plantas cultivadas em condições de campo foram irrigadas diariamente, exceto nos períodos chuvosos, com volume médio de 5,2 mm/dia. As plantas cultivadas em casa de vegetação foram irrigadas diariamente com volume médio de 4 mm/dia. O percentual de umidade (peso) foi de 31,5%, em média. Os vasos foram monitorados quanto à ocorrência de plantas invasoras, sendo estas retiradas manualmente quando necessário. Os dados climáticos dos períodos experimentais encontram-se no apêndice (Figuras 1A, 2A, 3A, 4A, 5A e 6A).

Aos 175 dias após o plantio, aproximadamente 6 meses, iniciou-se a avaliação da frequência de aplicação de BAP. Quatro semanas antes da colheita foram aplicados os tratamentos. Cada planta recebeu 50 mL de solução de BAP (60 mg.L^{-1}) acrescida de 3-4 gotas de Tween 80. A solução foi aplicada com pulverizadores manuais Utrajet 500 mL, marca Guarany®. As plantas controle receberam apenas 50 mL de água deionizada acrescida de 3-4 gotas de Tween 80.

Após o início das aplicações foi realizada semanalmente avaliação do crescimento das lâminas foliares para determinação do alongamento foliar. Em cada planta foi selecionado um perfilho no qual foi medido o comprimento da nervura central da folha emergente. As medidas foram realizadas semanalmente, sempre na mesma folha, no sentido do ápice até a bainha da primeira folha completamente expandida, identificada por apresentar lígula exposta.

No dia da colheita, pela manhã, realizou-se avaliação da atividade fotossintética através de analisador de gás no infravermelho (IRGA) com câmara de 225 mL cedido pelo setor de Fisiologia Vegetal do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal/CCTA/UENF. Foi selecionado um perfilho por planta buscando-se padronizar a posição deste na planta. Foi utilizada a região

mediana da terceira folha do perfilho selecionado para as avaliações. As avaliações foram realizadas sob luz natural com intensidade luminosa de 918,77 e 85,90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, para condição de campo e sombreado, respectivamente.

Foram realizadas também medições do esverdeamento das folhas, como indicador do teor de clorofila, utilizando-se o aparelho medidor de clorofila SPAD (Soil Plant Analysis Development - Minolta). As avaliações foram feitas nas folhas previamente selecionadas para avaliação do alongamento foliar. O valor SPAD utilizado foi resultante da média de três medidas ao longo da lâmina foliar, porção basal, mediana e apical.

Foram colhidas apenas as folhas a uma distância de 20 cm da superfície do substrato. Após a colheita o material foi levado ao laboratório para pesagem e determinação da matéria fresca de folhas. Em seguida foram separadas 10 folhas, que foram pesadas e em seguida utilizadas para determinação da área foliar em um medidor de área foliar Modelo 3100 Li-Cor (Setor de Fisiologia Vegetal do Laboratório de Melhoramento Genético – CCTA/UENF). Após determinação da área foliar, as folhas foram levadas para secagem (70°C) em estufa com circulação forçada de ar por uma semana. Após esse período o material foi pesado diariamente, sendo considerado peso constante após três medidas consecutivas sem variação do peso. Após a completa secagem foi calculada a área foliar por planta de acordo com descrito por Benincasa (2003).

Uma amostra de 60g de folhas frescas foi utilizada para determinação da matéria seca de folhas. A amostra foi submetida à secagem sob as mesmas condições descritas para determinação da área foliar. A matéria seca de folhas foi determinada através da fórmula:

$$\{[(\text{Peso fresco total } X) * (\text{Peso seco da amostra } X)] / (\text{Peso fresco da amostra } X)\}$$

onde,

X = folhas

O restante da matéria fresca colhida foi submetido à secagem (40°C) em estufa com circulação forçada de ar até peso constante, determinado após três pesagens consecutivas sem variação de peso.

A extração do óleo essencial foi realizada através da técnica de hidrodestilação em aparelho Clevenger. A extração teve duração de 2h contadas a partir do início do acúmulo de óleo essencial no tubo coletor do aparelho. Ao término da extração a fase superior de material do tubo coletor, correspondente ao óleo essencial, foi coletada com auxílio de uma pipeta graduada. Determinou-se a massa de óleo extraído. O teor de óleo essencial foi determinado de acordo com a fórmula:

$$[(\text{Massa de óleo essencial}) / (\text{Massa de material vegetal})] * 100$$

O óleo essencial foi armazenado em freezer (-18 °C) para posterior avaliação da composição química.

A composição química foi realizada por meio de cromatografia gasosa (Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro). Foram quantificados os teores de citral (neral e geranial) e geraniol. Para determinação das concentrações dessas substâncias no óleo essencial foi utilizado o método de calibração externa com uso dos padrões citral (95%, mistura cis/trans – Sigma Aldrich) e geraniol (P.A. Sigma Aldrich). O solvente utilizado para diluição dos padrões e amostras de óleo essencial foi hexano. As características do método utilizado na análise cromatográfica foram: coluna capilar DB5 de 30 m e 0,25 mm de diâmetro interno, temperatura do injetor 200°C, temperatura inicial da coluna de 50 °C, temperatura final da coluna 230 °C, taxa de 15 °C/ minuto, pressão inicial 87,5 KPa, pressão final 171 KPa, taxa 7 KPa/minuto, temperatura do detector 230 °C, razão de split 1:20, *solvent cut* de 3 minutos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do efeito da intensidade luminosa e aplicação de diferentes concentrações de N6-benzilaminopurina sobre a composição do óleo essencial e produção de *C. citratus*

Na tabela 2 são apresentados os valores médios de produção de matéria fresca e seca total, de folhas e de perfilhos. Não houve efeito das concentrações de N6-benzilaminopurina (BAP) aplicadas sobre o crescimento de capim-limão. No entanto, houve efeito significativo dos ambientes de cultivo sobre as características avaliadas (Tabela 2).

Tabela 2: Médias de matéria fresca total (MFT), matéria fresca de folhas (MFF), matéria fresca de perfilhos (MFP), matéria seca total (MST), matéria seca de folhas (MSF), matéria seca de perfilhos (MSP) de capim-limão em resposta ao cultivo em condições de campo (SOL) e sob sombreamento (SOMBRA) em Campos dos Goytacazes/RJ no período de janeiro a agosto de 2009

AMBIENTES	MFT	MFF	MFP	MST	MSF	MSP
	----- g.planta ⁻¹ -----					
SOL	1566,91 ^A	683,91 ^A	883 ^A	437,65 ^A	221,19 ^A	216,46 ^A
SOMBRA	517,19 ^B	264,22 ^B	252,97 ^B	118,15 ^B	78,06 ^B	40,09 ^B
CV (%)	20,45	20,63	22,88	19,99	25,26	22,61

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

Tabela 3: Médias de razão de peso de folhas (RPF), razão de peso de perfilhos (RPP), área foliar (AF) e razão de área foliar (RAF) de capim-limão em resposta ao cultivo em condições de campo (SOL) e sob sombreamento (SOMBRA) em Campos dos Goytacazes/RJ no período de janeiro a agosto de 2009

AMBIENTES	RPF	RPP	AF	RAF
	--- g.g ⁻¹ ---		m ²	m ² .g ⁻¹
SOL	0,50 ^B	0,50 ^A	1,75 ^A	0,008 ^B
SOMBRA	0,66 ^A	0,34 ^B	0,98 ^B	0,012 ^A
CV (%)	13,50	18,46	27,99	16,32

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

Observa-se que o nível de sombreamento utilizado nesse experimento resultou em inibição do crescimento das plantas. Na tabela 1 verifica-se que a produção de matéria fresca total foi, aproximadamente, 67% menor em plantas cultivadas na sombra quando comparadas às plantas cultivadas em condições de campo. A redução de produção de matéria seca sob sombreamento foi de 73%, em média, sendo o efeito negativo do sombreamento mais acentuado sobre os perfilhos, cuja redução foi de 81,48% se comparado à produção de matéria seca de perfilhos em plantas cultivadas em condições de campo.

A relação entre matéria seca de folhas e matéria seca de perfilhos (g/g) é de 1 em plantas cultivadas em condições de campo, enquanto em plantas sombreadas essa relação é de 1,9. Esses valores, associados aos resultados obtidos quanto à produção de matéria fresca e seca, indicam que o principal efeito do sombreamento, em termos de crescimento do capim-limão, ocorreu sobre o perfilhamento. Observa-se ainda que, em plantas sombreadas as folhas contribuem expressivamente para a massa total. Isso pode ser visualizado através da razão entre a matéria seca de folhas e a matéria seca total ou razão de peso de folhas (RPF), que foi de 0,66 (Tabela 3).

Martuscello et al (2009) verificaram que espécies do gênero *Brachiaria* apresentaram redução linear do número de perfilhos por planta em resposta ao aumento do nível de sombreamento. Segundo os autores, a menor intensidade de radiação e a reduzida relação vermelho/vermelho distante inibiram o perfilhamento. Ainda de acordo com os autores a alocação de fotoassimilados para perfilhos em plantas sombreadas é menor. A menor incidência de luz nas gemas também é um fator associado à redução do perfilhamento, já que a luz é um estímulo ao crescimento de novos perfilhos (Vieira e Mochel Filho, 2010).

De acordo com Doust (2007), a ramificação vegetativa em poáceas é sensível a variações ambientais. A regulação da iniciação do crescimento nos meristemas axilares está sob regulação hormonal, particularmente o balanço entre auxina e citocinina. Segundo Kebrom et al (2010), o controle hormonal do perfilhamento tem sido investigado em vários trabalhos e as pesquisas sugerem que a auxina atua controlando o crescimento dos perfilhos indiretamente através da redução da expressão da enzima adenosina fosfato isopenteniltransferase (IPT) presente na rota de biossíntese de citocinina. No presente trabalho não foi verificado efeito de citocinina sobre o perfilhamento das plantas.

Em arroz o gene *OsTB1* suprime o perfilhamento, sendo seus efeitos relacionados à resposta ao sombreamento. O TB1 (TEOSINE BRANCHED 1) está relacionado com a resposta ao sombreamento, com crescimento onde há alongamento dos internódios e supressão da ramificação. Essa resposta é iniciada pela percepção da planta de um decréscimo da razão vermelho: vermelho distante. Estudos sugerem que os fitocromos estão envolvidos no controle do gene TB1 e na iniciação do crescimento dos meristemas. Em sorgo cultivado com luz vermelho-distante suplementar observou-se aumento da expressão do gene

TB1. O gene TB1 codifica proteína da família de fatores de transcrição TCP, que estão associados ao controle do ciclo celular e da divisão celular (Doust, 2007).

Em relação à área foliar, observou-se que plantas cultivadas em condições de campo apresentaram, aproximadamente, o dobro da área de plantas cultivadas sob sombreamento. Esse resultado foi associado à maior produção de folhas (Tabela 3).

Quanto ao teor de óleo essencial não foi verificada resposta aos tratamentos aplicados. O teor médio em plantas cultivadas em condições de campo e sob sombreamento foi de 1,06 e 1,09 %, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4: Médias de teor de óleo essencial de capim-limão em resposta a aplicações de concentrações crescentes de N6-benzilaminopurina (BAP) e ao cultivo em condições de campo (SOL) e sob sombreamento (SOMBRA) na cidade de Campos dos Goytacazes/RJ no período de janeiro a agosto de 2009

CONCENTRAÇÕES DE BAP (mg.L ⁻¹)	AMBIENTES		MÉDIAS
	SOL	SOMBRA	
0	1,10	1,38	1,24 ^A
30	1,15	0,90	1,03 ^A
60	0,92	1,18	1,05 ^A
90	1,10	0,81	0,96 ^A
120	0,88	1,06	0,97 ^A
150	1,13	1,46	1,30 ^A
180	1,12	0,92	1,02 ^A
MÉDIAS	1,06 ^a	1,10 ^a	1,08

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

A regulação da biossíntese de óleos essenciais é complexa e depende de diversos fatores. O controle genético e a interação deste com o ambiente são determinantes para a produção de óleos essenciais, uma vez que esta classe de metabólitos está associada à resposta da planta ao meio no qual essa desenvolve (Sangwan et al, 2001; Gershenzon, 1994). No entanto, a associação direta entre fatores de estresse e aumento ou redução da biossíntese de metabólitos secundários não é adequada, pois a resposta às alterações ambientais depende de diversos fatores como: a magnitude e duração da alteração e, especialmente,

o comportamento de cada espécie diante das mudanças do ambiente, pois os mecanismos de percepção e reação ao estresse são específicos. Espécies como *Ocimum selloi* (alfavaquinha) (Gonçalves et al, 2003), *Aloysia gratissima* (alfazema do Brasil) (Pinto et al, 2007), *Lippia citriodora* (cidrão) (Gomes et al, 2009) e *Hyptis marrubioides* (hortelã do campo) (Sales et al, 2009) não apresentaram alteração da produção do óleo essencial em resposta ao sombreamento.

Para o capim-limão, nas condições experimentais utilizadas, o sombreamento não alterou o percentual de óleo essencial, indicando que a espécie possui mecanismos de manutenção de produção sob ambiente com reduzida disponibilidade de radiação solar.

Algumas teorias foram desenvolvidas para explicar o controle da biossíntese de metabólitos secundários (Stamp, 2003). A adequação a uma ou outra teoria depende de características do metabólito em questão como origem biossintética e taxa de *turn over*, características do ambiente no qual a planta se desenvolve e características da espécie (Gershenzon, 1994). De maneira geral elas tentam esclarecer como se dá a alocação de recursos (fotoassimilados) entre produção de metabólitos secundários e demais processos, como por exemplo, o crescimento. Duas das teorias mais conhecidas e que possuem maiores semelhanças são a hipótese do crescimento-diferenciação e do balanço carbono-nutrientes. Em ambas a resposta de biossíntese de metabólitos secundários ao longo do gradiente de recursos (nutrientes, água e outros) será uma curva com ponto de máxima na região mediana. Isso porque os fotoassimilados serão alocados para crescimento ou metabólitos secundários seguindo um fluxo favorável ao crescimento ou à defesa com a síntese de metabólitos secundários (Stamp,2003). De acordo com a hipótese do balanço carbono-nutriente a produção de metabólitos secundários é o somatório de uma porção fixa, geneticamente determinada, e uma porção variável, que sofre a influência do ambiente.

Em capim-limão observou-se que sob restrição do crescimento promovido por cultivo em recipientes houve alteração do teor do óleo essencial, sendo esta relacionada ao crescimento da planta. Em condições mais severas de restrição a produção de óleo manteve-se em um nível basal proporcional ao crescimento (Prins, 2007). Isso indica que a espécie tem como característica a manutenção de

uma produção basal mesmo em condições desfavoráveis, o que explica o resultado obtido no presente trabalho quanto ao teor de óleo essencial.

Por outro lado a composição do óleo essencial foi influenciada pelas concentrações de BAP. A aplicação de concentrações crescentes de BAP resultou em decréscimo do teor dos compostos citral (geranial + neral) e geraniol (Figuras 2 e 3).

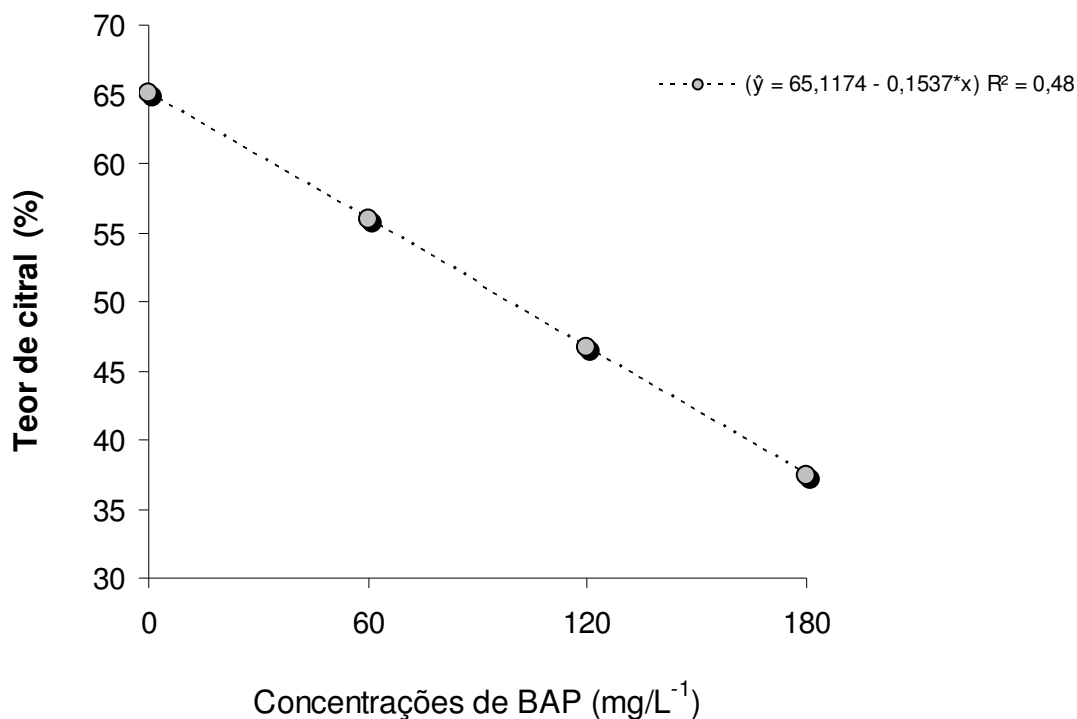


Figura 2: Teor (%) de citral no óleo essencial de capim-limão, cultivado em condições de campo e sob sombreamento, em resposta a diferentes concentrações de BAP. Gráfico gerado com os valores esperados de acordo com a equação de regressão. *significativa a 5% de probabilidade pelo teste “t” de Student. F= 4,16, significativo a 5% de probabilidade pelo teste “F”.

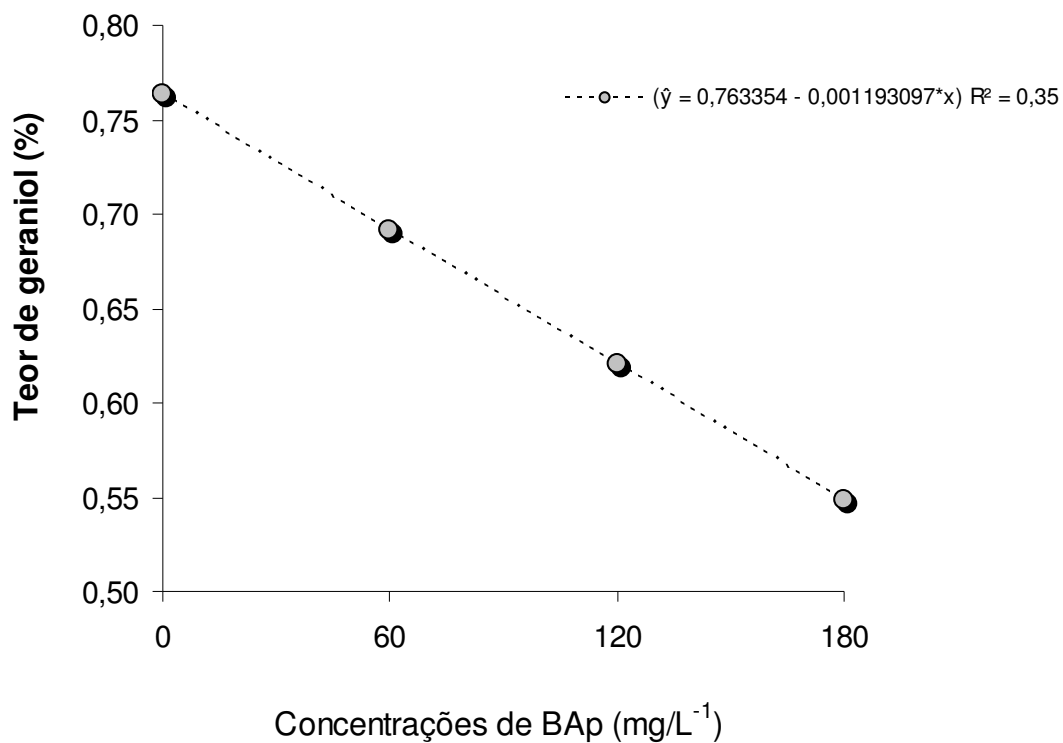


Figura 3: Teor (%) de geraniol no óleo essencial de capim-limão, cultivado em condições de campo e sob sombreamento, em resposta a diferentes concentrações de BAP. Gráfico gerado com os valores esperados de acordo com a equação de regressão. *significativa a 5% de probabilidade pelo teste “t” de Student. F= 2,87, significativo a 5% de probabilidade pelo teste “F”.

Embora os valores R^2 apresentados sejam baixos, o que indica alta variabilidade dos dados, os coeficientes da equação e a análise da regressão indicam que as equações obtidas são estatisticamente significativas a 5% de probabilidade pelo teste “t” (Quadro 1 e 2).

Quadro 1: Análise de regressão de dados relativos ao teor (%) de citral no óleo essencial de capim-limão em resposta à aplicação de concentrações crescentes de BAP (0; 60; 120 e 180 mg.Kg⁻¹)

PARÂMETROS DA REGRESSÃO				
<i>Coeficiente</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Valor de T</i>	<i>Coef. Beta</i>	<i>Probabilidade</i>
65,1174				
-0,15374	0,0753484	-2,040416	-0,398908	0,03
R ² 0,48				
ANÁLISE DE VARIÂNCIA				
<i>Fontes de Variação</i>	<i>GL</i>	<i>Soma de Quadrados</i>		<i>F</i>
Devido à Regressão	1	2552,754		4,16*
Independente	22	13489,45		

Quadro 2: Análise de regressão de dados relativos ao teor (%) de geraniol no óleo essencial de capim-limão em resposta à aplicação de concentrações crescentes de BAP (0; 60; 120 e 180 mg.Kg⁻¹)

PARÂMETROS DA REGRESSÃO				
<i>Coeficiente</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Valor de T</i>	<i>Coef. Beta</i>	<i>Probabilidade</i>
0,763354				
0,00193097	0,00114031	-1,693373	-0,339576	0,05
R ² 0,35				
ANÁLISE DE VARIÂNCIA				
<i>Fontes de Variação</i>	<i>GL</i>	<i>Soma de Quadrados</i>		<i>F</i>
Devido à Regressão	1	0,4026941		2,87*
Independente	22	3,089531		

A determinação das causas de um efeito de um regulador de crescimento observado sobre um processo bioquímico, fisiológico ou morfogênico de uma espécie é complexa, pois as respostas são dependentes de um balanço entre os hormônios vegetais. No entanto, as aplicações exógenas de reguladores isoladamente ou em conjunto permitem estabelecer o papel desses sobre determinados processos, como a biossíntese de óleos essenciais.

O geranial e o neral são resultantes da redução do geraniol e do seu isômero nerol. O geraniol por sua vez é o produto oriundo do geraniol difosfato (GPP), primeiro metabólito gerado na rota de biossíntese dos óleos essenciais. O GPP é originado da ligação de isopentenil difosfato e dimetilalil difosfato (IPP e DMAPP), estando o último também presente na rota de biossíntese da citocinina (Kamada-Nobusada e Sakakibara, 2009). Nesta a enzima isopentenil transferase é responsável pela redução do DMAPP dando origem às formas de citocinina conhecidas.

Gharib (2005) verificou que em cultura de tecidos de *Pelargonium nervosum* o balanço entre citocinina e auxina foi responsável pela diferenciação celular e que este fator foi responsável por alterações quantitativas e qualitativas no óleo essencial da espécie. Para uma concentração fixa de auxina (ácido naftalenacético - ANA), a redução da concentração de citocinina (BAP) promoveu aumento do percentual de citral no óleo essencial.

Afonso et al (2009) observaram que altas concentrações de BAP (5 e 10 μM) afetaram negativamente a produção de timol em *Thymus vulgaris*.

Mujer e Smigocki (2001) verificaram que aplicação de zeatina (5×10^{-5} e 5×10^{-6} M) em *Nicotiana plumbaginifolia* resultou em aumento da expressão da seqüência CYP72A2, que possui 45% de similaridade com CYP72A1, uma geraniol-10-hidroxilase que converte geraniol e nerol aos seus derivados. Essa seqüência pertence à família CYP de genes do citocromo P450.

Para verificação do efeito das concentrações crescentes de BAP sobre a expressão de proteínas foi realizada extração e quantificação das proteínas totais de folhas de capim-limão. Verificou-se que houve efeito positivo das concentrações de BAP sobre a concentração de proteínas totais em folhas de capim-limão (Figura 4).

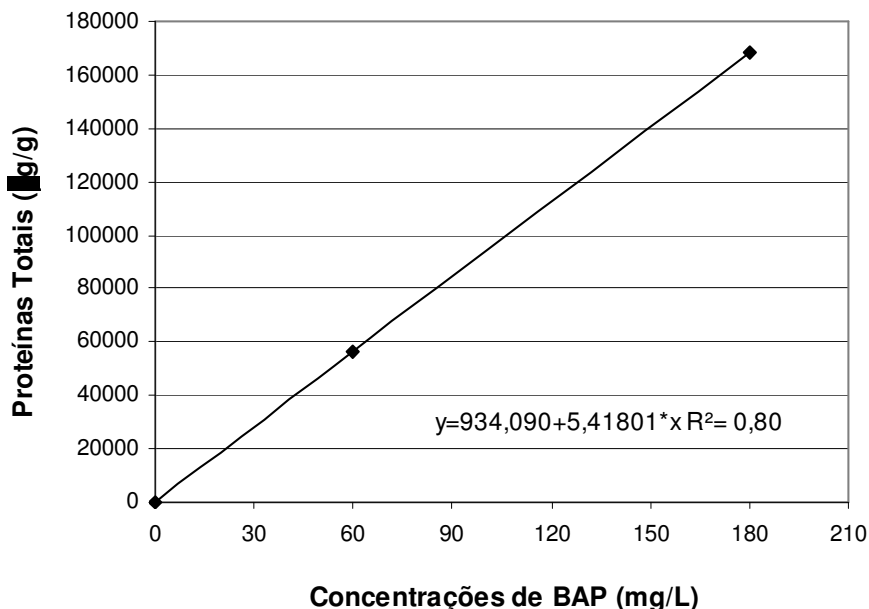


Figura 4: Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) de proteínas totais em folhas de capim-limão, cultivado em condições de campo e sob sombreamento, resposta à aplicação de concentrações crescentes de N6-benzilaminopurina. *significativa a 5% de probabilidade pelo teste “t” de Student.

A aplicação de citocinina pode influenciar a relação fonte x dreno (Alizadeh et al, 2010), aumentando o metabolismo da planta o que requer maior consumo de derivados do IPP e DMAPP, possivelmente restringindo a disponibilidade desses para a síntese de terpenos como geraniol e citral.

Segundo Manzano et al (2006), a 3-hidroxi-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase é considerada a principal enzima reguladora da síntese de IPP e DMAPP. Ainda de acordo com esses autores a partição de IPP e DMAPP nas diversas rotas nas quais são precursores é finamente regulada para prevenir que esses se tornem limitantes à síntese de classes específicas de isoprenóides. Tal regulação pode ser demonstrada por meio de dados experimentais onde o desequilíbrio das atividades das enzimas que suprem ou competem por esses substratos limitam a síntese de isoprenóides específicos. Em experimento realizado com *Arabidopsis* o aumento da atividade da farnesil difosfato sintase, sem aumento da HMGR levou a um decréscimo da síntese de citocinina

(Masferrer et al, 2002; Manzano et al, 2006). Esses resultados sugerem estreita relação entre a síntese de isoprenóides e citocininas. Sudriá et al (1999) observaram que em *Lavandula dentata* a atividade da HMG-CoA redutase (enzima envolvida na rota MVA) foi maior (140%) em plantas tratadas com citocina. De acordo com os autores a maior atividade da HMG-CoA redutase pode ser atribuída ao aumento de todo o metabolismo da planta. Os autores verificaram ainda que houve alteração da composição do óleo essencial e sugerem que isso pode ter ocorrido devido à influência do regulador de crescimento sobre as atividades das enzimas envolvidas.

4.2 Avaliação do efeito da intensidade luminosa e freqüência de aplicação de N6-benzilaminopurina sobre a composição do óleo essencial e produção de *C. citratus*

A freqüência de aplicação de BAP não influenciou as características de crescimento avaliadas. Assim como observado no experimento 1, apenas o ambiente de cultivo influenciou significativamente o crescimento de capim-limão.

Na tabela 4, referente aos resultados obtidos em resposta à freqüência de aplicação de BAP, são apresentados os valores médios de produção de matéria seca de folhas e área foliar. Plantas cultivadas em condições de campo apresentaram produção de matéria seca foliar de 287,18 g em média, enquanto plantas sombreadas tiveram produção de 106,14 g.

Em relação à área foliar, observou-se que plantas cultivadas em condições de campo apresentaram, aproximadamente, o dobro da área de plantas cultivadas sob sombreamento (Tabela 4). Esse resultado foi associado à maior produção de folhas. A área foliar total foi significativamente influenciada pelo ambiente e pela freqüência de aplicação de BAP, porém não houve efeito significativo da interação entre esses fatores. O sombreamento resultou em decréscimo de, aproximadamente, 48% em média, da área foliar quando comparado às plantas cultivadas em condições de campo. As áreas foliares de plantas cultivadas em condições de campo e que não receberam aplicação de BAP (2,11 m²) e de plantas que foram tratadas com aplicações quinzenais (2,21

m²) não diferiram entre si e foram significativamente superiores àquela de plantas que receberam BAP semanalmente (1,53 m²) (Tabela 4).

Tabela 5: Médias de produção de matéria seca de folhas (MSF) e área foliar (AF), em resposta a aplicações quinzenais e semanais de N6-benzilaminopurina (BAP) em condições de campo (SOL) e sob sombreamento (SOMBRA). Coeficientes de Variação: MSF = 37,37; AF = 29,06; SPAD = 12,50

TRATAMENTOS	VARIÁVEIS	SOL	SOMBRA	MÉDIAS
CONTROLE	MSF (g)	295,31 ^A	116,58 ^B	205,94
	AF (m ²)	2,82 ^A	1,40 ^B	2,11
QUINZENAL	MSF (g)	323,48 ^A	118,33 ^B	220,91
	AF (m ²)	2,66 ^A	1,76 ^B	2,21
SEMANAL	MSF (g)	242,74 ^A	83,51 ^B	163,12
	AF (m ²)	2,21 ^A	0,85 ^B	1,53
MÉDIAS	MSF (g)	287,18	106,14	196,66
	AF (m ²)	2,56	1,34	1,95

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas na horizontal não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

Houve incremento do comprimento ao longo das quatro semanas de avaliação para todos os tratamentos. Foi observado que a partir da terceira semana o comprimento de folhas nas plantas cultivadas na sombra foi significativamente inferior ao observado em plantas cultivadas em condições de campo (Figura 3). O comprimento foliar foi ainda influenciado pelo ambiente, pela frequência de aplicação de BAP e pela interação desses fatores. As folhas de plantas cultivadas em condições de campo apresentaram comprimento médio de 77,6 cm no momento da colheita, enquanto em plantas sombreadas o comprimento médio foi de 69,3 cm. As aplicações semanais de BAP resultaram em comprimento médio menor (60,9 cm) comparado aos comprimentos observados nas plantas controle (63,4 cm) e tratadas quinzenalmente (63,7 cm), que não diferiram entre si (Tabela 5). Foi observado ainda que para plantas crescidas em condições de campo as aplicações quinzenais de BAP favoreceram o crescimento das folhas.

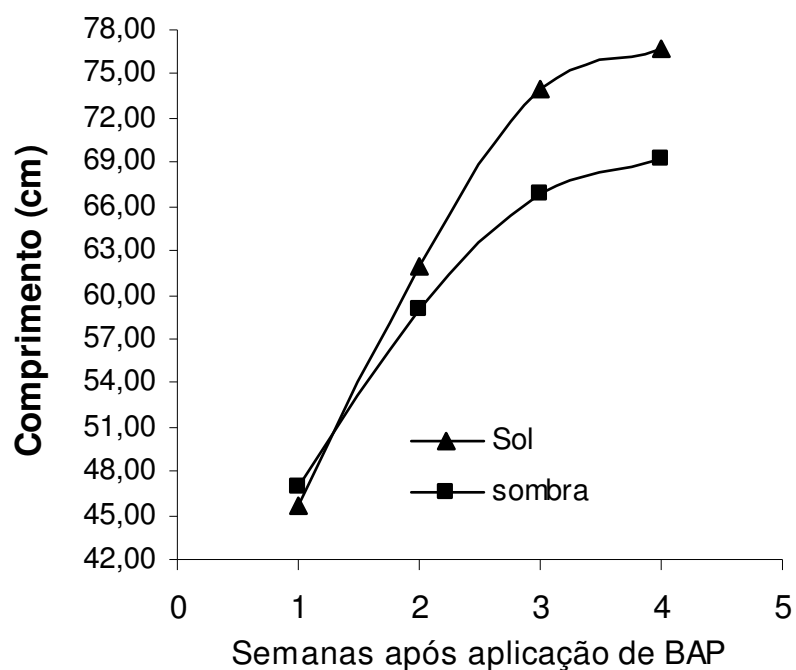


Figura 5: Comprimento da nervura central de folhas de capim-limão (cm), cultivado a pleno Sol e sob sombreamento, ao longo de quatro semanas após início das aplicações de BAP (quinzenais e semanais).

Tabela 6: Médias de comprimento da nervura central de folhas de capim-limão ao longo de quatro semanas de avaliação (S1; S2; S3 e S4) em resposta à intensidade luminosa (SOL; SOMBRA) e freqüência de aplicação de N6-benzilaminopurina (QUINZENAL; SEMANAL).

TRATAMENTOS	SOL				SOMBRA				
	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	
CONTROLE	45,0	62,5	74,1	77,1	45,0	60,8	70,0	73,1	
QUINZENAL	48,9	66,9	66,9	80,6	48,6	55,6	64,4	65,6	
SEMANAL	43,0	56,2	69,0	75,2	47,0	60,9	66,2	69,1	
MÉDIAS	45,3	66,1	70,0	77,6	46,9	59,1	66,9	69,3	
		64,8				60,5			

Tabela 7: Médias de comprimento da folha (cm) de capim-limão em resposta à frequência de aplicação de BAP (quinzenal e semanal) em plantas cultivadas em condições de campo (SOL) e sob sombreamento (SOMBRA).

TRATAMENTOS	SOL	SOMBRA	MÉDIAS
Controle	64,7 ^{Ab}	62,2 ^{Aa}	63,4
Quinzenal	68,8 ^{Aa}	58,6 ^{Ba}	63,7
Semanal	61,0 ^{Ab}	60,8 ^{Aa}	60,9
MÉDIAS	64,8	60,53	
CV(%) 11,01			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

Os resultados relativos à área foliar e ao comprimento das folhas indicam que aplicações semanais de BAP na concentração de 60 mg.Kg⁻¹ foram prejudiciais ao desenvolvimento foliar.

O desenvolvimento da folha é altamente dependente das condições ambientais, em particular da quantidade e qualidade da luz, assim como a disponibilidade hídrica. Variações no tamanho das folhas são atribuídas ao número de células ou ao tamanho das células, sendo a divisão celular correlacionada à disponibilidade de fotoassimilados e nutrientes. Adicionalmente os reguladores de crescimento e outros sinalizadores contribuem para o processo de expansão foliar (Volkenburgh, 1999). No entanto o efeito dos hormônios depende da concentração, do balanço entre esses e da interação com outros fatores. Em *Arabidopsis* transformada para elevada produção de citocininas verificou-se alterações no crescimento como nanismo, sendo o efeito dependente de luz e concentrações de sacarose no meio de cultivo das plantas (Guo et al, 2005). Em *Annona glabra* foi observado efeito da interação luz e citocininas sobre os teores de clorofila, onde diferentes fontes de citocinina atuaram distintamente no retardo da senescência foliar, sendo o BAP menos efetivo quando comparado a citocininas naturais como zeatina e cinetina (Oliveira et al, 2007).

Houve efeito significativo do ambiente de crescimento, frequência de aplicação e da interação ambiente de crescimento x frequência de aplicação sobre os valores SPAD. Plantas cultivadas na sombra apresentaram maiores valores SPAD, com média de 46,59, enquanto plantas cultivadas em condições de campo apresentaram valores médios de 33,74. O aumento do conteúdo de clorofila é uma resposta ao sombreamento como meio de ampliar a captação de

luz (Valladares e Niinemets, 2008). Plantas que não receberam BAP apresentaram SPAD significativamente superior aos demais tratamentos (média 40,53), os quais apresentaram valores médios de 34,04 e 35,55 para aplicação quinzenal e semanal, respectivamente. As aplicações quinzenais e semanais de BAP resultaram em redução dos valores SPAD de plantas cultivadas na sombra em comparação com valores encontrados nas plantas que não foram tratadas com o regulador de crescimento no mesmo ambiente (Tabela 6). Observa-se que a aplicação de citocinina em plantas sombreadas reduziu os valores SPAD, que são indicativos do teor de clorofila, em relação ao controle, porém esses valores são semelhantes aos verificados em condições de campo onde não houve restrição de intensidade luminosa. Isso indica que nas condições experimentais utilizadas o BAP reverteu os efeitos do sombreamento em relação ao teor de clorofila.

Tabela 8: Valores médios de SPAD em folhas de capim-limão, cultivado em condições de campo (SOL) e sob sombreamento (SOMBRA), em resposta à frequência de aplicação de BAP (quinzenal e semanal), após sete meses de cultivo.

TRATAMENTOS	SOL	SOMBRA
Controle	33,74 ^{Ba}	46,59 ^{Aa}
Quinzenal	35,03 ^{Aa}	33,88 ^{Ab}
Semanal	35,62 ^{Aa}	35,54 ^{Ab}
CV(%)	12,50	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

A frequência de aplicação de BAP não influenciou as características relacionadas às trocas gasosas, no entanto esta característica foi significativamente influenciada pelo ambiente de crescimento.

As plantas cultivadas sob sombreamento receberam, aproximadamente, 10% da radiação solar incidente na área de cultivo em condições de campo. Essa diferença resultou em efeitos significativos sobre as características avaliadas (Tabela 7). As temperaturas do ar e da folha apresentaram redução média de 22% no ambiente sombreado. A transpiração em plantas cultivadas em condições de campo foi 2,6 vezes superior àquela observada em plantas de sombra. Em

condições de campo também foram verificados valores superiores de DPV (em média, acréscimo de 28%). Sob sombreamento a condutância estomática foi reduzida à metade quando comparada aos valores verificados em plantas cultivadas em condições de campo. Já a concentração de carbono interno em plantas sombreadas foi de, aproximadamente, 1,8 vezes superior àquelas mensuradas em plantas não sombreadas. No entanto, a maior diferença ocorreu em relação à atividade fotossintética, onde plantas sombreadas apresentaram redução de 91,36% dessa característica. A redução da atividade fotossintética, da condutância estomática e demais aspectos relacionados às trocas gasosas são respostas típicas à redução da disponibilidade de luz (Valladares e Niinemets, 2008).

Tabela 9: Trocas gasosas de capim-limão cultivado em condições de campo (SOL) e sob sombreamento (SOMBRA), e submetido a diferentes freqüências de aplicação de BAP (60 mg.Kg⁻¹). *DPV (déficit de pressão de vapor)

VARIÁVEIS	SOL	SOMBRA
Temperatura do ar (°C)	31,38 ^A	25,04 ^B
Temperatura da folha (°C)	32,25 ^A	24,58 ^B
Fotossíntese (μmol m ⁻² s ⁻¹)	16,09 ^A	1,39 ^B
Condutância estomática (μmol m ⁻² s ⁻¹)	0,22 ^A	0,11 ^B
Carbono interno (μmol mol)	188,08 ^B	341,32 ^A
DPV* (KPa)	3,57 ^A	2,56 ^B
Transpiração (mmol m ⁻² s ⁻¹)	6,76 ^A	2,52 ^B

Médias seguidas da mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo Teste Tukey 5%.

Não houve efeito das freqüências de aplicações de BAP sobre o teor de óleo essencial (%) que foi de 1,18% em média (Tabela 8). No entanto, houve efeito da intensidade de radiação sobre a composição do óleo essencial, onde o teor de geraniol foi significativamente superior em plantas cultivadas sob sombreamento (Figura 4).

Tabela 10: Teor de óleo essencial (%) em folhas de capim-limão cultivado em condições de campo (SOL) e sob sombreamento (SOMBRA) em resposta à frequência de aplicação de BAP (60 mg.Kg⁻¹ - quinzenal e semanal)

TRATAMENTOS	TEOR (%)	
	SOL	SOMBRA
CONTROLE	1,17 ^A	1,15 ^A
QUINZENAL	1,24 ^A	1,18 ^A
SEMANAL	1,22 ^A	1,10 ^A
MÉDIAS	1,21	1,14
	1,18	

Médias seguidas das mesmas letras na vertical não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.
Coeficiente de variação: 11,68%

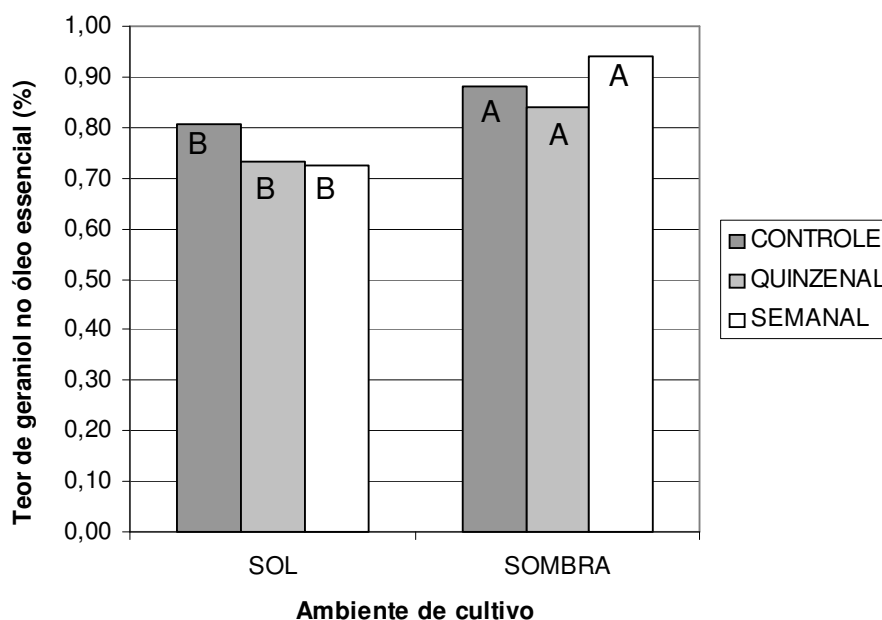


Figura 6: Teor (%) de geraniol no óleo essencial de capim-limão cultivado em condições de campo (SOL) e sob sombreamento (SOMBRA) em resposta à frequência de aplicação de BAP. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

A composição do óleo essencial pode variar de acordo com o desenvolvimento das plantas. O desenvolvimento de plantas cultivadas sob sombreamento é lento. No presente trabalho foi observado que o sombreamento alterou o crescimento, síntese de clorofila e trocas gasosas de capim-limão,

indicando alterações fisiológicas e bioquímicas que podem ter afetado também o metabolismo secundário da planta e, conseqüentemente, a síntese de óleo essencial. Dubey e Luthra (2001) verificaram em inflorescências imaturas de *Cymbopogon martinii* após a biossíntese onde o geraniol é convertido a geranil acetato, que posteriormente, com o amadurecimento das inflorescências, é hidrolisado para produzir o geraniol demonstrando que há variação no teor de substâncias do óleo essencial de acordo com o desenvolvimento dos órgãos de síntese. Em capim-limão, Prins (2007) observou que o teor de citral aumenta de acordo com a idade da planta tendendo a estabilizar-se após seis meses de cultivo, aproximadamente.

De acordo com Rodriguez-Concepción (2006), a biossíntese de monoterpenos ocorre através da rota MEP localizada nos cloroplastos a partir de gliceraldeído 3-fosfato e piruvato oriundos da fotossíntese. O crescimento lento observado sob sombreamento, o que disponibilizaria fotoassimilados para outras rotas, associado ao acúmulo de carbono interno verificado no presente trabalho (Tabela 7) podem ser indicativos de que a síntese de geraniol seria favorecida nessas condições, uma vez que o geraniol é produto imediato do geranil difosfato, precursor dos terpenos (Iijima et al, 2004), e que devido ao lento desenvolvimento da plantas não haveria maturidade fisiológica/bioquímica para a síntese de citral.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A produção de óleos essenciais, assim como de outros metabólitos secundários, pode ser influenciada por fatores como estágio de desenvolvimento de toda a planta (vegetativo e reprodutivo), ou de órgãos específicos, e por fatores ambientais (bióticos e abióticos).

As mudanças fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante a ontogenia da planta regulam de forma programada a expressão de genes e a atividade de enzimas envolvidas em rotas do metabolismo secundário. Esta programação genética pode ser influenciada por fatores exógenos que alteram o *status* fisiológico, induzem mudanças bioquímicas e/ou são sinalizadores que desencadeiam uma rede de respostas que culminarão na produção dos metabólitos secundários.

O capim-limão é uma espécie aromática cujo óleo essencial, rico em citral, é utilizado como aromatizante devido ao intenso aroma de limão, como matéria-prima para síntese de vitamina A e de iononas, que são substâncias com aroma de violeta utilizada em produtos de limpeza. Também produz geraniol, utilizado como fixador em perfumes, além de outros compostos minoritários como mirceno, que tem sido estudado por suas atividades analgésicas (Budavani et al, 1996; Paumgarten, 2003; Silva et al, 2005).

Hormônios vegetais são substâncias biossintetizadas pelas plantas e que possuem funções de coordenação do crescimento e desenvolvimento destas. Já o termo “Reguladores vegetais” engloba substâncias produzidas naturalmente ou sintetizadas em laboratório. Estas últimas podem ou não ser análogas aos hormônios vegetais, e atuam afetando o desenvolvimento vegetal interferindo na fisiologia da planta em processos de síntese de outros compostos, no transporte de substâncias pela planta, e que afetarão o desenvolvimento e crescimento dos vegetais.

Dentre os reguladores vegetais está a citocinina. Descoberta na década de 50, a citocinina está associada a processos como retardo da senescência foliar, síntese de pigmentos, produção de cloroplastos, diferenciação celular, regulação da expressão gênica e indiretamente influencia a síntese de compostos como jasmonato e ácido salicílico, ritmo circadiano, função dos fitocromos e modulação das respostas à luz (Sano et al, 1996; Brault e Maldiney, 1999; Chernyad`ev, 2000; Kulaeva e Kusnetsov, 2002; Chen et al, 2006; Hirose et al, 2007; Ioio et al, 2007; Naito et al, 2007; Yakir et al, 2007).

Neste trabalho objetivou-se avaliar o efeito de aplicações de N6-benzilaminopurina sobre a composição do óleo essencial e produção de *Cymbopogon citratus*. Para tanto, foram desenvolvidos dois experimentos nos períodos de janeiro a agosto de 2009 e novembro de 2009 a junho de 2010. Os experimentos foram conduzidos na Unidade de Apoio à Pesquisa do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UAP/CCTA/UENF), situada na cidade de Campos dos Goytacazes – RJ (21°45.229'S 41°19.538'O). As mudas de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) foram obtidas através de propagação vegetativa (divisão de touceiras) utilizando-se como matrizes plantas da coleção de plantas medicinais da UAP/CCTA/UENF.

As plantas foram cultivadas em vasos de 42 L preenchidos com substrato composto por mistura de solo, areia e esterco bovino curtido, na proporção de 1:1:1 v/v. Utilizou-se uma planta por vaso. Os vasos foram dispostos no espaçamento de 1 x 1 m. A variação de intensidade luminosa foi obtida através de cultivo em dois ambientes distintos: condições de campo (SOL), no qual os vasos foram dispostos no campo e sombreado (SOMBRA) com cultivo em casa de

vegetação revestida com tela do tipo sombrite de 35%, acrescida de tela sombrite 50%.

No primeiro experimento, aos 203 dias após o plantio, aproximadamente 7 meses, realizou-se a aplicação da citocinina sintética N6-benzilaminopurina (BAP) nas seguintes concentrações: 0; 30; 60; 90; 120; 150 e 180 mg.L⁻¹. Cada planta recebeu uma única aplicação de 50 mL da solução BAP acrescida de 3-4 gotas de Tween 80 uma semana antes da colheita pela manhã (8h). Nas plantas controle foram aspergidos apenas 50 mL de água deionizada acrescida de 3-4 gotas de Tween 80. Para as aplicações foram utilizados pulverizadores manuais Utrajet 500 mL, marca Guarany®. Uma semana após a aplicação realizou-se a colheita. Foram avaliadas a produção de matéria total fresca e seca, matéria de folhas fresca e seca, matéria de perfilhos fresca e seca, razão de peso de folhas, razão de peso de perfilhos, área foliar, razão de área foliar, teor de óleo essencial, composição do óleo essencial e concentração de proteínas totais em folhas de capim-limão. Observou-se que sob sombreamento o crescimento de capim-limão foi reduzido, com menor produção de matéria fresca e seca de perfilhos e menores valores de área foliar. O teor de óleo essencial não foi influenciado pelos tratamentos, no entanto a composição química foi alterada em função da aplicação de diferentes concentrações de N6-benzilaminopurina, onde os percentuais de citral e geranial diminuíram com aumento das concentrações do regulador de crescimento. Verificou-se também aumento da concentração de proteínas totais em resposta ao aumento das concentrações de N6-benzilaminopurina.

No segundo experimento, aos 175 dias após o plantio, aproximadamente 6 meses, iniciou-se a avaliação da frequência de aplicação de N6-benzilaminopurina. Quatro semanas antes da colheita foram aplicados os tratamentos. Cada planta recebeu 50 mL de solução de BAP (60 mg.L⁻¹) acrescida de 3-4 gotas de Tween 80. A solução foi aplicada com pulverizadores manuais Utrajet 500 mL, marca Guarany®. As plantas controle receberam apenas 50 mL de água deionizada acrescida de 3-4 gotas de Tween 80.

Após o início das aplicações foi realizada semanalmente avaliação do crescimento das lâminas foliares para determinação do alongamento foliar. No dia da colheita realizou-se avaliação da atividade fotossintética. Foram realizadas também medições do esverdeamento das folhas, como indicador do teor de

clorofila, utilizando-se o aparelho medidor de clorofila SPAD. Foram avaliados ainda a matéria seca de folhas, área foliar, teor de óleo essencial e composição do óleo essencial.

Observou-se que a matéria seca de folhas e a área foliar foram menores em plantas cultivadas sob sombreamento, assim como as trocas gasosas, sem efeito da frequência de aplicação de N6-benzilaminopurina. Plantas que receberam aplicações quinzenais de N6-benzilaminopurina apresentaram maior comprimento de nervura central de folhas no momento da colheita. Sob sombreamento as aplicações semanais e quinzenais do regulador de crescimento resultaram em valores SPAD inferiores aos observados nas plantas controle. O teor de óleo essencial não foi influenciado pelos tratamentos. No entanto o percentual de geraniol no óleo essencial foi superior em plantas cultivadas sob sombreamento.

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que o *C. citratus* apresentou redução do crescimento em resposta ao sombreamento sem, no entanto, prejuízo na produção de óleo essencial. Por outro lado a composição do óleo foi alterada. O aumento da concentração de proteínas totais pode indicar alteração da expressão protéica em resposta a N6-benzilaminopurina. Estudos relativos à expressão de proteínas, como proteômica comparativa, devem ser realizados para elucidação das proteínas envolvidas nas respostas observadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Affonso, V.R.; Bizzo, H.R.; Lage, C.L.S.; Sato, A. (2009) Influence of growth regulators in biomass production and volatile profile of in vitro plantlets of *Thymus vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 6392-6395.
- Akhila, A. (1985) Biosynthetic relationship of citral-trans and citral-cis in *Cymbopogon flexuosus* (lemongrass). *Phytochemistry*, 24(11): 2585-2587.
- Alizadeh, O.; Haghighi, B.J.; Ordookhani, K. (2010) The effect of exogenous cytokinin application on sink size in bread wheat (*Triticum aestivum*). *African Journal of Agricultural Research*, 5(21): 2893-2898.
- Arikat, N.A.; Jawad, F.M.; Karam, N.S.; Shibli, R.A. (2004) Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). *Scientia Horticulturae*, 100: 193-202.
- Arnold, T.M.; Schultz, J.C. (2002) Induced sink strength as a prerequisite for induced tannin biosynthesis in developing leaves of *Populus*. *Oecologia*, 130: 585-593.
- Ashour, M.; Wink, M.; Gershenzon, J. (2010) Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. *Annual Plant Reviews*, 40/: 258-303.
- Benincasa, M.M.P. (2003) Análise do crescimento de plantas (Noções básicas). 2ª edição. FUNEP: Jaboticabal. 41p.

- Brault, M.; Maldiney, R. (1999) Mechanisms of cytokinin action. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(5): 403-412.
- Boonman, A.; Prinsen, E.; Gilmer, F.; Schurr, U.; Peeters, A.J.M.; Voesenec, A.C.J; Pons, T.L. (2007) Cytokinin import rate as a signal for photosynthetic acclimation to canopy light gradients. *Plant Physiology*, 143: 1841-1852.
- Boonman, A.; Pons, T.L. (2007) Canopy light gradient perception by cytokinin. *Plant Signaling & Behavior*, 2(6): 1-3.
- Budavani, S. O'Neil, M. J.; Smith, A.; Heckelman, P. E.; Kinneary, J.F. (ed.) (1996) The Merck Index – an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. New Jersey:Merck Research Laboratories. 1741p.
- Chen, D.; Li, Z.; Pan, R.; Wang, X. (2006) Anthocyanin accumulation mediated by blue light and cytokinin in *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(4): 420-425.
- Cheng, A.X.; Lou, Y.G.; Mao, Y.B.; Lu, S.; Wang, L.J.; Chen, X.Y. (2007) Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology* 49(2): 179-186.
- Chernyad`ev, I.I. (2000) Ontogenetic changes in the photosynthetic apparatus and effects of cytokinins (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36(6): 527-539.
- Chernyad`ev, I.I. (2002) Effect of preparations exhibiting cytokine-like activity on the specific density of leaf in grass. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38(6): 593-601.
- Decendit, A.; Petit, G.; Andreu, F.; Doireau, P.; Mérillon, J.M.; Rideau, M. (1993) Putative sites of cytokinin action during their enhancing effect on indole alkaloid accumulation in periwinkle cell suspensions. *Plant Cell Reports*, 12: 710-712.
- Doust, A.N. (2007) Grass architecture: genetic and environmental control of branching. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 21-25.
- Dubey, V.S.; Luthra, R. (2001) Biotransformation of geranyl acetate to geraniol during palmarosa (*Cymbopogon martini* Roxb. wax. var. motia) inflorescence development. *Phytochemistry*, 57: 675-680.
- El-Keltawi, N.E.; Croteau, R. (1987a) Influence of foliar applied cytokinins on growth and essential oil content of several members of the lamiaceae. *Phytochemistry*, 26(4): 891-895.
- El-Keltawi, N.E.; Croteau, R. (1987b). Salinity depression of growth and essential oil formation in spearmint and marjoram and its reversal by foliar applied cytokinin *Phytochemistry*, 26(5): 1333-1334.

- Farooqi, A.H.A.; Khan, A.; Sharma, S. (2003) Effect of kinetin and chlormequat chloride on growth, leaf abscission and essential oil yield in *Mentha arvensis*. *Indian Perfumer*, 47(4): 359-363.
- Farooqi, A.H.A.; Sharma, S.; Naqvi, A.A.; Khan, A. (1993) The effect of kinetin on flower and oil production in *Rosa damascena*. *Journal of Essential Oil Research*, 5: 305-309.
- Farooqi, A.H.A.; Shukla, A. (1990) Utilization of plant growth regulators in aromatic plant production. *Cromatography*, 12: 152-157.
- Figueiredo, R.O.; Delachiave, M.E.A.; Ming, L.C. (2006) Reguladores vegetais na produção de biomassa e teor de óleos essenciais em *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, em diferentes épocas do ano. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8(3): 31-35.
- Gershenzon, J. (1994) Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. *Journal of Chemical Ecology*, 20(6): 1281-1328.
- Gharib, F.A.E. (2005) Changes in regeneration and oil accumulation of *Pelargonium nervosum* under various culture conditions. *Journal of Biological Sciences*, 5(5): 670-677.
- Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P. (2007) Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quimica Nova*, 30(2): 374-381.
- Gomes, E.C.; Negrelle, R.R.B. (2003) *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: aspectos botânicos e ecológicos. *Visão Acadêmica*, 4(2): 137-144.
- Gomes, E.C.; Rücker, N.G.A.; Negrelle, R.R.B. (2004) Estudo prospectivo da cadeia produtiva do capim-limão – Estado do Paraná. *RER*, 42(4): 709-731.
- Gomes, P.A.; Souza, M.F.; Souza Júnior, I.T.; Carvalho Júnior, W.G.O.; Figueiredo, L.S.; Martins, E.R. (2009) Influencia do sombreamento na produção de biomassa, óleo essencial e quantidade de tricomas glandulares em cidrão (*Lippia citriodora* Lam.). *Biotemas*, 22(4): 9-14.
- Gonçalves, L.A.; Barbosa, L.C.A.; Azevedo, A.A.; Casali, V.W.D.; Nascimento, E.A. (2003) Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth) em resposta a dois níveis de radiação solar. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 6(1): 8-14.
- Guo, J.; Hu, X.; Duan, R. (2005) Interactive effects of cytokinins, light, and sucrose on the phenotypes and the synthesis of anthocyanins and ligninins in cytokinin overproducing transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24: 93-101.
- Harrison, M.A.; Kaufman, P.B. (1980) Hormonal regulation of lateral bud (tiller) release in oats (*Avena sativa* L.). *Plant Physiology*, 66: 1123-1127.

- Helsper, J.P.F.G.; Davies, J.A.; Bouwmeester, H.J.; Krol, A.F.; Kampen, M.H. (1998) Circadian rhythmicity in emission of volatile compounds by flowers of *Rosa hybrida* L. cv. Honesty. *Planta*, 207: 88-95.
- Hirose, N.; Takei, K.; Kuroha, T.; Kamada-Nobusada, T.; Hayashi, H.; Sakakibara, H. (2007) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization, and translocation. *Journal of Experimental Botany*, 14: 1-9.
- Iijima, Y.; Gang, D.R.; Fridman, E.; Lewinsohn, E.; Pichersky, E. (2004) Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. *Plant Physiology*, 134: 370-379.
- Ioio, R.D.; Linhares, F.S.; Sabatini, S. (2007) Emerging role of cytokinin as a regulator of cellular differentiation. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 1-5.
- Khandelwal, S.K.; Gupta, N.K.; Sahu, M.P. (2002) Effect of plant growth regulators on growth, yield and essential oil production of henna (*Lawsonia inermis* L.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 77(1): 67-72.
- Kebrom, TH; Brutnell, tp; Finlayson, SA. (2010) Suppression of sorghum axillary bud outgrowth by shade, phyB and defoliation signaling pathways. *Plant, Cell and Environment*, 33: 48-58.
- Kieber, J.J. (2002) Cytokinin. *The Arabidopsis Book*. 25p. Acesso em: 10 de julho de 2007. Disponível em: <<http://www.google.com/scholar>>.
- Kim, H.J.; Ryu, H.; Hong, S.H.; Woo, H.R.; Lim, P.O.; Lee, I.C.; Sheen, J.; Nam, H.G.; Hwang, I. (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis. *PNAS*, 103(3): 814-819.
- Kulaeva, O,N.; Kusnetsov, V.V. (2002) Recent advances and horizons of the cytokinin studyng. *Russian Journal of Plant Physiology*, 49(4): 561-574.
- Leal, T.C.A.B. (1998) *Produção de óleo essencial de capim cidreira (Cymbopogon citratus (DC) Stapf) em função de fatores endógenos e exógenos*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense. 64p.
- Lee, H.; Auh, C.-K; Kim, D.; Lee, T.-K.; Lee, S. (2006) Exogenous cytokinin treatment maintains cyclin homeostasis in rice seedlings that show changes of cyclin expression when the photoperiod is rapidly changed. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44: 248-252.
- Lewinsohn, E.; Dudai, N.; Tadmor, Y.; Katzir, I.; Ravid, U.; Putievsky, E.; Joel, D.M. (1998) Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae). *Annals of Botany*, 81: 35-39.
- Lima, H.R.P.; Kaplan, M.A.C.; Cruz, A.V.M. (2003) Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. *Floresta e Ambiente*, 10(2): 71-77.

- Manzano, D.; Busquets, A.; Closa, M.; Hoyerová, K.; Schaller, H.; Kamínek, M.; Arró, M.; Ferrer, A. (2006) Overexpression of farnesyl diphosphate synthase in *Arabidopsis* mitochondria triggers light-dependent lesion formation and alters cytokinin homeostasis. *Plant Molecular Biology*, 61: 195-213.
- Martins, M.B.G.; Martins, A.R.; Telascrêa, M.; Cavalheiro, A.J. (2004) Caracterização anatômica da folha de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Poaceae) e perfil químico do óleo essencial. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 6(3): 20-29.
- Martuscello, J.A.; Jank, L.; Neto, M.M.G.; Laura, V.A.; Cunha, D.N.F.V. (2009) Produção de gramíneas do gênero *Brachiaria* sob níveis de sombreamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(7): 1183-1190.
- Masferrer, A.; Arró, M.; Manzano, D.; Schaller, H.; Fernández-Busquets, X.; Moncaleán, P.; Fernández, B.; Cunillera, N.; Boronat, A.; Ferrer, A. (2002) Overexpression of *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase (FPS1S) in transgenic *Arabidopsis* induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *The Plant Journal* 30(2): 123-132.
- Mendonça, J.C.; Sousa, E.L.F.; Bernardo, S.; Sugawara, M.T.; Peçanha, A.L.; Gottardo, R.D. (2007) Determinação do coeficiente cultural (Kc) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), em Campos dos Goytacazes, RJ. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 11(5): 471-475.
- Mizuno, T. (2004) Plant response regulators implicated in signal transduction and circadian rhythm. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 499-505.
- Mujer, C.V.; Smigocki, A.C. (2001) Cytokinin - and wound-inducible cytochrome P450 from *Nicotiana plumbaginifolia*. *Physiologia Plantarum*, 111: 172-181.
- Nagegowda, D.A. (2010) Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Lettes*, 584: 2965-2973.
- Naito, T.; Kiba, T.; Koizumi, N.; Yamashino, T.; Mizuno, T. (2007) Characterization of a unique GATA family gene that responds to both light and cytokinin in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71(6): 1557-1560.
- Nakamura, A.; Shimada, H.; Masuda, T.; Ohta, H.; Takamiya, K. (2001) Two distinct isopentenyl diphosphate isomerases in cytosol and plastid are differentially induced by environmental stresses in tobacco. *FEBS Letters*, 506: 61-64.
- Neto, D.D.; Dario, G.J.A.; Vieira Júnior, P.A. (2004) Aplicação e influencia do fitorregulador no crescimento das plantas de milho. *Revista da FZVA*, 11(1): 1-9.

- Oliveira, L.M.; Paiva, R.; Santana, J.R.F.; Nogueira, R.C.; Soares, F.P.; Silva, L.C. (2007) Efeito de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29(1): 25-30.
- Oudin, A.; Mahroug, S.; Courdavault, V.; Hervouet, N.; Zelwer, C.; Rodríguez-Concepción, M.; St-Pierre, B.; Burlat, V. (2007) Spatial distribution and hormonal regulation of gene products from methyl erythritol phosphate and monoterpene-secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus*. *Plant Molecular Biology*, 65:13-30.
- Papon, N.; Bremer, J.; Vansiri, A.; Andreu, F.; Rideau, M.; Crèche, J. (2005) Cytokinin and ethylene control indole alkaloid production at the level of the MEP/Terpenoid pathway in *Catharanthus roseus* suspension cells. *Planta Med*, 71(6): 572-574.
- Paumgarten, F.J.R. (2003) Estudo toxicológico pré-clínico do beta-mirceno; substância analgésica obtida do capim-limão (*Cymbopogon citratus*, Stapf). Acesso em 31 de março de 2003. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/catalogos/prodprocessos/estoxicp.html>.
- Pinto, J.E.B.P.; Cardoso, J.C.W.; Castro, E.M.; Bertolucci, S.K.; Melo, L.A.; Douseau, S. (2007) Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema do Brasil em função de níveis de sombreamento. *Horticultura Brasileira*, 25: 210-214.
- Povh, J.A.; Ono, E.O. (2006) Rendimento de óleo essencial de *Salvia officinalis* L. sob ação de reguladores vegetais. *Acta Sci. Biol. Sci.*, 28(3): 189-193.
- Prins, C.L. (2007) *Efeito do confinamento do sistema radicular sobre as medidas biométricas, trocas gasosas e produção de óleo essencial em capim-limão*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense. 50p.
- Rios-Esteva, R.; Turner, G.W.; Lee, J.M.; Croteau, R.B.; Lange, B.M. (2008) A systems biology approach identifies the biochemical mechanisms regulating monoterpene essential oil composition in peppermint. *PNAS*, 105(8): 2818-2823.
- Sanches, R.R. (2000) *Aplicação de biorreguladores vegetais: aspectos fisiológicos e aplicações práticas na citricultura mundial*. Jaboticabal:Funep. 160p.
- Rodríguez-Concepción, M. (2006) Early steps in isoprenoid biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochemistry Reviews*, 5: 1-15.
- Sales, J.F.; Pinto, J.E.B.P.; Ferri, P.H.; Silva, F.G.; Oliveira, C.B.A.; Botrel, P.P. (2009). Influência do nível de irradiância no crescimento, produção e composição química do óleo essencial de hortelã do campo (*Hyptis marruboides* Epl.). *Ciências Agrárias*, 30(2): 389-396.

- Sangwan, N.S.; Farooqi, A.H.A.; Shabih, F.; Sangwan, R.S. (2001) Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, 34: 03-21.
- Sano H.; Seo, S.; Koizumi, N.; Niki, T.; Iwamura, H.; Ohashi, Y. (1996) Regulation by cytokinins of endogenous levels of jasmonic acid and salicylic acids in mechanically wounded tobacco plants. *Plant and Cell Physiology*, 37(6): 762-769.
- Schaneberg, B.T.; Khan, I.A. (2002) Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemongrass by GC. *Journal of Agricultural Foods and Chemistry*, 50: 1345-1349.
- Scravoni, J.; Vasconcellos, M.C.; Valmorbidia, J.; Ferri, A.F.; Marques, M.O.M.; Ono, E.O.; Rodriguez, J.D. (2006) Rendimento e composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* L. submetida a aplicações de giberelina e citocinina. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8(4): 40-43.
- Shah, S.H. (2007) Effect of kinetin spray on growth and productivity of Black cumin Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54(5): 702-705.
- Silva, S.; Sato, A.; Lage, C.L.S.; Gil, R.A.S.S.; Azevedo, D.A.; Esquibel, M.A. (2005) Essential oil composition of *Melissa officinalis* L. in vitro produced under the influence of growth regulators. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 16(6B): 1387-1390.
- Singh, N.; Luthra, R.; Sangwan, R.S. (1989) Effect of leaf position and age on the essential oil quantity and quality in lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*). *Planta Medica*, 55: 254-256.
- Singh-Sangwan, N.; Sangwan, R.S.; Luthra, R.; Thakur, R.S. (1993) Geraniol dehydrogenase: a determinant of essential oil quality in lemongrass. *Planta Medica*, 59: 168-170.
- Spíchal, L.; Kristof, V.; Paprskárová, M.; Lenobel, R.; Stykala, J.; Binarová, P.; Cenklová, B.; De Veylder, L.; Inzé, D.; Kontopidis, G.; Fischer, P.M.; Schmölling, T.; Strnad, M. (2007) Classical anticytokinin do not interact with cytokinin receptors but inhibit cyclin-dependent kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(19): 14356-14363.
- Stamp, N. (2003) Out of quagmire of plant defense hypothesis. *The Quarterly Review of Biology*, 78(1): 23-55.
- Stoeva, T.; Iliev, L. (1997) Influence of some phenylureia cytokinins on spearmint essential oil composition. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 23(3-4): 66-71.
- Sudriá, C.; Piñol, M.T.; Palazón, J.; Cusidó, R.M.; Vila, R.; Morales, C.; Bonfill, M.; Cañigueral, S. (1999) Influence of plant growth regulators on the growth and essential oil content of cultured *Lavandula dentata* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58: 177-184.

- Sudriá, C.; Palazón, J.; Cusidó, R.; Bonfill, M.; Piñol, M.T.; Morales, C. (2004) Effect of benzyladenine and indolebutyric acid on ultrastructure, glands formation, and essential oil accumulation in *Lavandula dentata* plantlets. *Physiologia Plantarum*, 44(1): 1-6.
- Suge, H.; Iwamura, H. (1993) Effect of cytokinin and anticytokinin on the tillering of Barley. *Japanese Journal of Crop Science*, 62(4): 595-600.
- To, J.P.C.; Kieber, J.J. (2008) Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends in Plant Science*, 13(2): 85-92.
- Tscherning, K.; Leihner, D.E.; Hilger, T.H.; Müller-Sämann, K.M.; El Sharkawy, M.A. (1995) Grass barriers in cassava hillside cultivation: root patterns and root growth dynamics. *Field Crops Research*, 43/; 134-140.
- Valladares, F.; Niinemets, Ü. (2008) Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 39: 237-57.
- Vieira, M.M.M.; Mochel Filho, W.J.E. (2010) Influência dos fatores abióticos no fluxo de biomassa e na estrutura do dossel. *Arch. Zootec.*, 59(R): 15-24.
- Ventrella, M.C.; Ambrósio, C.P.M. (1999) Anatomia foliar quantitativa e produção de óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf.). *UNIMAR Ciências*, 8(4): 83-88.
- Voirin, B.; Bayet, C. (1996) Developmental changes in the monoterpene composition of *Mentha x piperita* leaves from individual peltate trichomes. *Phytochemistry*, 43(3): 573-580.
- Volkenburgh, E.V. (1999) Leaf expansion – an integrating plant behaviour. *Plant, Cell and Environment*, 22: 1463-1473
- Weathers, P.J.; Bunk, G.; McCoy, M.C. (2005) The effect of phytohormones on growth and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*, 41: 47-53.
- Weiss, E.A. (1997) *Essential Oil Crops*. CAB International: New York. 600 p.
- Yakir, E.; Hilman, D.; Harir, Y.; Green, R.M. (2007) Regulation of output from the plant circadian clock. *FEBS Journal*, 274: 335-345.
- Yu, G.H.; An, G. (2000) Regulatory roles of benzyl adenine and sucrose during wound response of the ribosomal protein gene, rpL34. *Plant, Cell and Environment*, 23: 1363-1371.
- Zheng, B.; Deng, Y.; Mu, J.; Ji, Z.; Xiang, T.; Niu, Q-W.; Chua, N-H.; Zuo, J. (2006) Cytokinins affects circadian-clock oscillation in a phytochrome B- and Arabidopsis response regulator 4-dependent manner. *Physiologia Plantarum*, 127: 277-292.

APÊNDICE

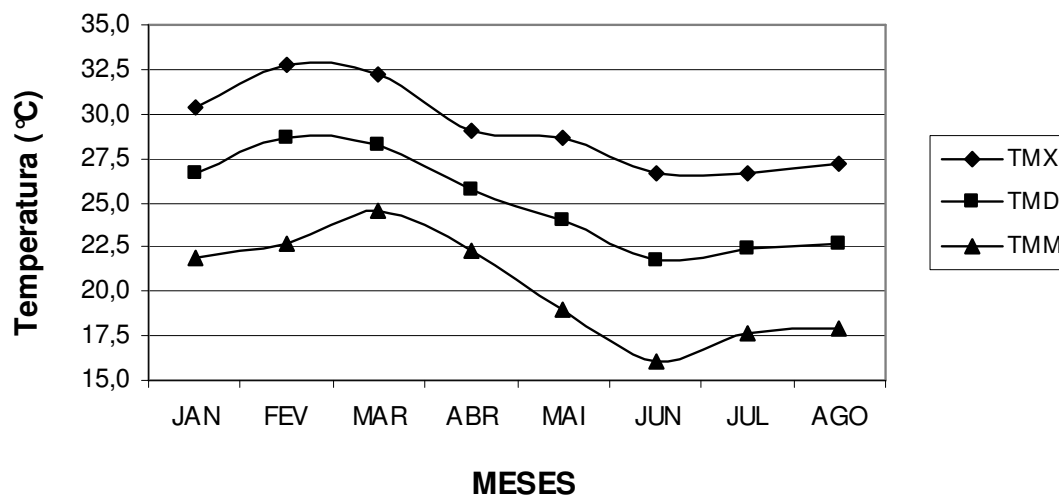


Figura 1A: Temperaturas máxima (TMX), média (TMD) e mínima (TMM) (°C) observadas nos meses de janeiro a agosto de 2009, período correspondente ao experimento “aplicação de diferentes concentrações de BAP”. Dados obtidos da Estação Experimental da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Campus Leonel Miranda.

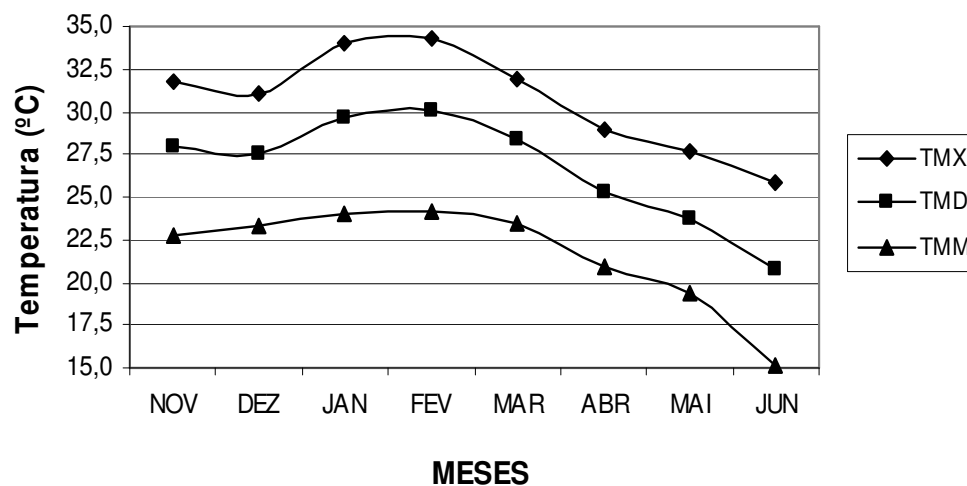


Figura 2A: Temperaturas máxima (TMX), média (TMD) e mínima (TMM) (°C) observadas nos meses de novembro de 2009 a junho de 2010, período correspondente ao experimento “frequência de aplicação de BAP”. Dados obtidos da Estação Experimental da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Campus Leonel Miranda.

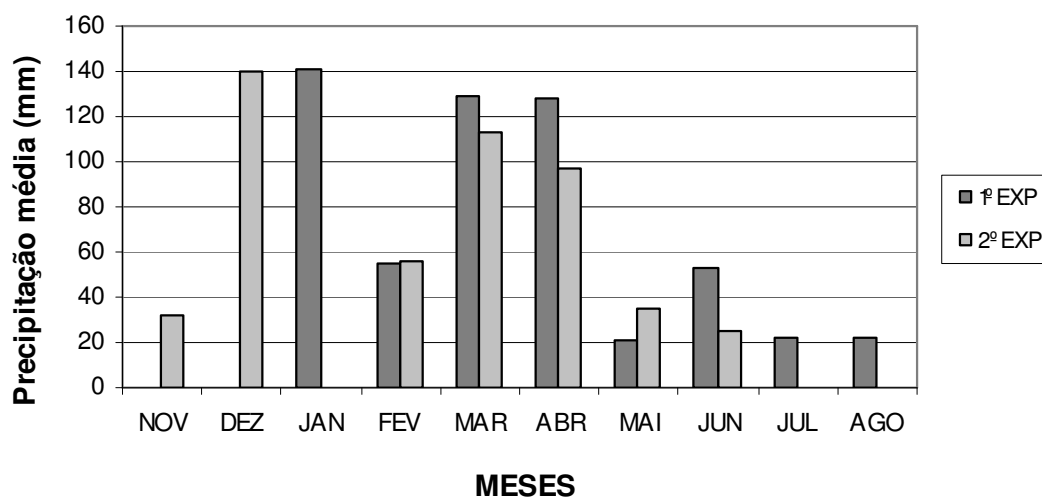


Figura 3A: Precipitação média mensal (mm) observada nos meses de novembro de 2009 a agosto de 2010. Dados obtidos da Estação Experimental da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Campus Leonel Miranda.

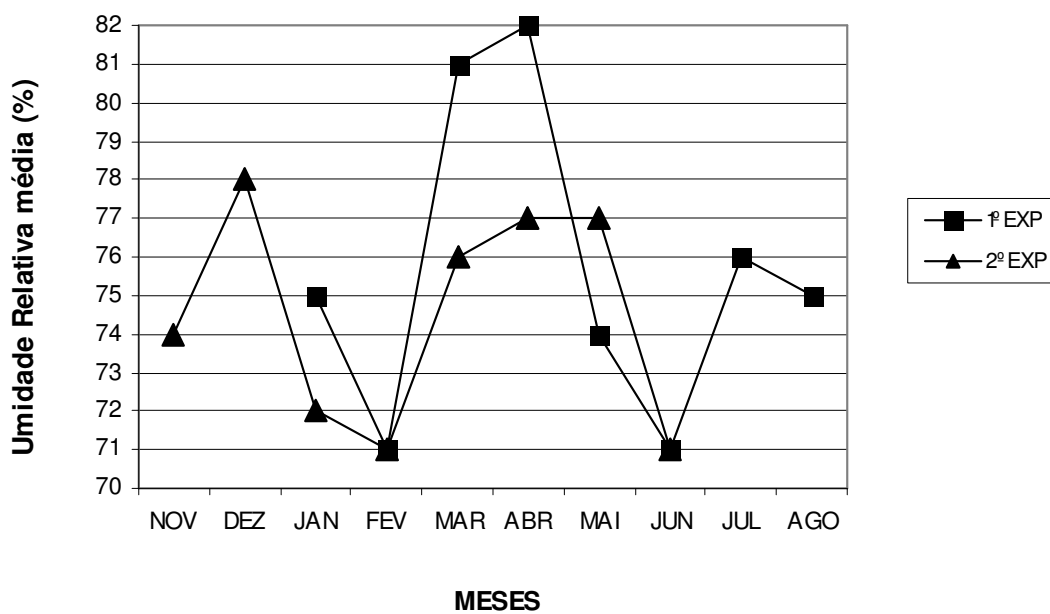


Figura 4A: Umidade relativa do ar média (%) observada nos meses de novembro de 2009 a agosto de 2010. Dados obtidos da Estação Experimental da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Campus Leonel Miranda.

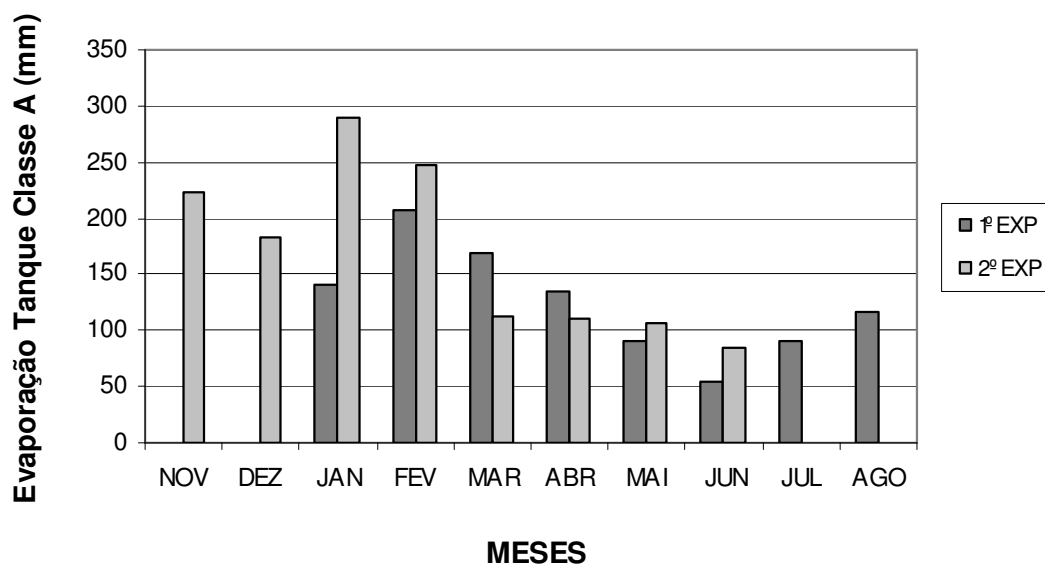


Figura 5A: Evaporação Tanque Classe A (mm) observada nos meses de novembro de 2009 a agosto de 2010. Dados obtidos da Estação Experimental da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Campus Leonel Miranda.

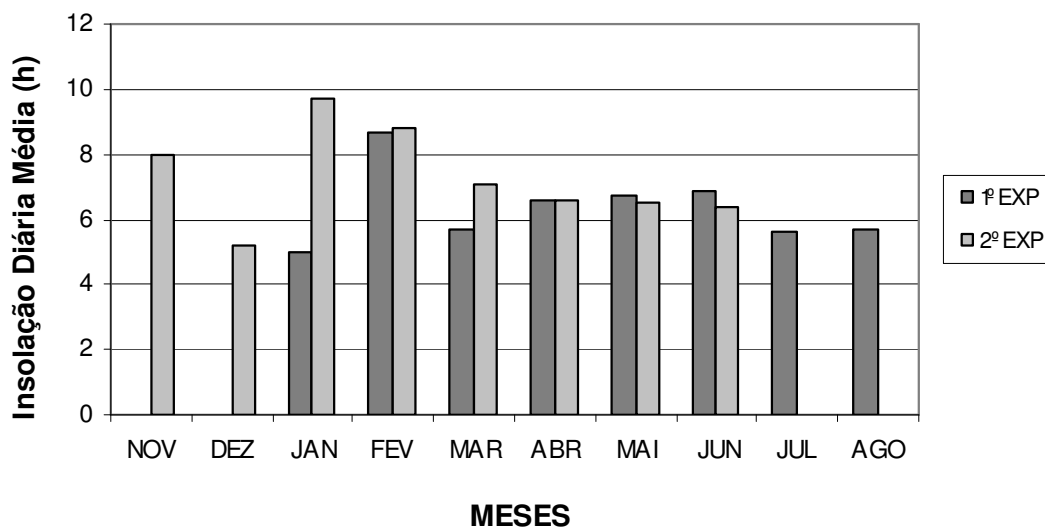


Figura 6A: Insolação Diária média (h) observada nos meses de novembro de 2009 a agosto de 2010. Dados obtidos da Estação Experimental da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Campus Leonel Miranda.