

**Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**  
**Faculdade de Biociências**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

Título da Dissertação de Mestrado:

**AVALIAÇÃO DE ELICIADORES DO METABOLISMO DOS  
FENILPROPANÓIDES EM *MELISSA OFFICINALIS* L.  
(LAMIACEAE)**

Pós-Graduanda: *Siomara Dias da Costa Lemos*  
Orientador: *Prof. Dr. Leandro Vieira Astarita*

Porto Alegre/RS - Abril/2006

**Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**  
**Faculdade de Biociências**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

Título da Dissertação de Mestrado:

**AVALIAÇÃO DE ELICIADORES DO METABOLISMO DOS FENILPROPANÓIDES EM**  
***MELISSA OFFICINALIS L. (LAMIACEAE)***

Pós-Graduanda: *Siomara Dias da Costa Lemos*

Orientador: *Prof. Dr. Leandro Vieira Astarita*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal.

Porto Alegre  
Rio Grande do Sul – Brasil  
Abril/2006

*"As plantas movem seus corpos com uma liberdade, um desembaraço e uma graça tão grandes quanto os do homem ou do bicho mais capacitado - só não apreciamos isto pelo fato de as plantas se moverem a um passo bem mais lento que o nosso."*

**Raoul Francé - biólogo vienense, nos inícios do século XX**

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Leandro Vieira Astarita pela qualificada e presente orientação desta dissertação e das pesquisas realizadas para a conclusão deste mestrado. Devo a este professor uma grande parcela do meu desenvolvimento científico, sendo que levarei sempre comigo os seus exemplos de paciência, de incentivo, de dedicação à ciência, de profissionalismo e de ética profissional.

Aos demais professores do Instituto de Biociências, em especial aos professores André Arigony Souto, Eliane Diefenthaler Heuser, Clarisse Azevedo Machado e Eliane Romanato Santarém, pelas contribuições que renderam o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas do laboratório de Biotecnologia Vegetal, em especial aos biólogos Flávio Steigleder Martins, Thanise Nogueira Füller e Denise Pereira Müzell, que auxiliaram o meu desenvolvimento pessoal e as pesquisas deste mestrado.

À bióloga Janaína Belquis Pinto, funcionária do Departamento de Botânica, pela amizade, compreensão, conhecimento e enriquecedor convívio. Tenha certeza que a eficiência e a presteza do teu trabalho tornam a vida dos alunos e dos professores deste departamento bem mais fácil.

Aos colegas Paulo Raimann, Paula Heinen, Márcia Kober, Juliana Fredo, Matias Frizzo e Fábio Maito que foram companheiros em todos os momentos desde o nosso primeiro reencontro. Certamente são verdadeiros amigos que estarão sempre em minhas orações.

À Helena Dias da Costa Lemos, minha Mãe adorada, que durante este período teve a paciência de entender a minha ausência e distância, me incentivando durante todos os momentos, não permitindo que eu desistisse de mais um sonho em busca da minha realização profissional.

Ao Marcus Rutsatz, meu namorado, a pessoa que escolhi para viver comigo. Juntos encaramos mais um desafio, o mestrado. Sabemos o quanto foi difícil fazermos ao mesmo tempo o nosso mestrado, precisando agendar momentos para a utilização do computador, nos privando dos momentos de estarmos juntos para concluir as pesquisas, isso sem esquecer a paciência que tiveste comigo nos auxílios quando me sentia perdida. Saiba que parte disto também é teu!

Em fim, agradeço a Deus, pai eterno e de todas as horas, pois sem ele não alcançaria esta vitória... Sei que esta é uma entre tantas outras que estão por vir.

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação foi organizada na forma de capítulos. O Capítulo I apresenta uma Introdução Geral sobre o assunto envolvendo metabolismo secundário, eliciadores e micropropagação, assim como os objetivos deste trabalho. O Capítulo 2 apresenta os resultados e discussão dos experimentos.

O Capítulo 2 (*Melissa officinalis* (L.) and changes in phenylpropanoids metabolism in response to elicitors) foi organizado na forma de um artigo científico, redigido em inglês, seguindo as normas exigidas pelo periódico Brazilian Journal of Plant Physiology. Neste capítulo são abordadas as condições de cultivo *in vitro* para a otimização do protocolo de micropropagação, bem como a avaliação da síntese de compostos fenólicos e da atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase e polifenol oxidase em plantas cultivadas *in vitro* e em vaso, após a exposição a eliciadores bióticos e abióticos.

O artigo aqui apresentado discorre de forma ampla sobre os resultados obtidos. Após a avaliação da banca examinadora e as sugestões propostas, pretende-se otimizar a sua redação e tamanho para posterior publicação.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	07
<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>08</b>
<b>1. Fitoterápicos .....</b>	<b>08</b>
1.1 <i>Melissa officinalis</i> .....	08
<b>2. Metabólitos Secundários nos Vegetais .....</b>	<b>10</b>
2.1 <i>Fenilpropanóides</i> .....	11
2.2 <i>Fatores que interferem no Metabolismo Secundário</i> .....	13
2.3 <i>Elicidores</i> .....	15
2.3.1 Patógenos como eliciadores .....	16
2.3.2 Ação do Ácido Salicílico (AS) .....	17
2.4 <i>Atividade da Fenilalanina Amônia-liase (PAL)</i> .....	18
2.5 <i>Atividade da Polifenol oxidase (PPO)</i> .....	19
<b>3. Micropropagação .....</b>	<b>21</b>
3.1 <i>Indução de Metabólitos Secundários</i> .....	22
<b>4. Objetivos .....</b>	<b>23</b>
4.1 Objetivos Gerais .....	23
4.2 Objetivos Específicos .....	23
<b>5. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>23</b>
<b>CAPÍTULO II – “Changes in Phenylpropanoids Metabolism of <i>Melissa officinalis</i> (L.) in response to elicitors” .....</b>	<b>33</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>76</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>77</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>79</b>
<b>NORMAS PARA PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>80</b>

## RESUMO

### AVALIAÇÃO DE ELICIADORES DO METABOLISMO DOS FENILPROPANÓIDES EM *MELISSA OFFICINALIS* L. (LAMIACEAE) <sup>1</sup>

Pós-Graduanda: *Siomara Dias da Costa Lemos* <sup>2</sup>

Orientador: *Prof. Dr. Leandro Vieira Astarita* <sup>3</sup>

*Melissa officinalis* (melissa) apresenta elevados níveis de compostos fenólicos com reconhecida ação biológica, sendo utilizada na prevenção de várias doenças, como asma brônquica, úlcera, inflamações, viroses e arteriosclerose. A síntese de compostos com atividade biológica depende da qualidade da planta, sua origem geográfica, condições climáticas, período de colheita e métodos de estocagem. Neste trabalho pretendeu-se avaliar o uso de eliciadores em brotos cultivados *in vitro* e em plantas cultivadas em vaso, na promoção da síntese e acúmulo de fenilpropanóides, bem como analisar a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase e polifenol oxidase. Pretendeu-se, ainda, otimizar a micropropagação de *M. officinalis*, regenerando plantas-clone. Os meios de cultura suplementados com 0,2 mg.L<sup>-1</sup> BA, independente da presença de ANA, foram mais eficientes na formação de múltiplas brotações *in vitro*, sendo que a maior taxa de alongamento foi obtida no meio com 2 mg.L<sup>-1</sup> de BA. A maior taxa de formação e crescimento de raízes foi obtida utilizando-se 1 mg.L<sup>-1</sup> de AIB. O uso do eliciador ácido salicílico promoveu o aumento transitório dos níveis dos compostos fenólicos e flavonóides nas plântulas *in vitro*, entretanto não foi observada a mesma resposta em plantas envasadas. A suplementação do meio de cultura com suspensão de bactérias fitopatogênicas mortas, resultou na redução dos níveis dos compostos fenólicos e o espessamento de raízes e ramos. Contudo, nas plantas envasadas, a suspensão bacteriana ocasionou necrose nos bordos das folhas 24h após a aspersão. Os eliciadores não promoveram mudanças significativas na atividade da fenilalanina amônia-liase em ambos os experimentos. A atividade da polifenol oxidase teve um aumento transitório que coincidiu com a elevação dos fenólicos nas plantas eliciadas *in vitro*, fato este não observado nas plantas envasadas.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular (área de concentração Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal), Instituto de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

<sup>2</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular/PUCRS

<sup>3</sup> Orientador/Laboratório de Biotecnologia Vegetal/PUCRS

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. Fitoterápicos

Conhecidas desde os povos primitivos até os atuais, as plantas com atividade medicinal são tradicionalmente utilizadas na alimentação, na prevenção e no tratamento de doenças (Yunes e Calixto 2001). As plantas medicinais, desde árvores até ervas, são capazes de produzir moléculas biologicamente ativas através de seu metabolismo secundário. Estas moléculas, presentes em extratos vegetais, são consideradas como fitoterápicos (Yunes et al. 2001).

Os produtos naturais de origem vegetal têm sido utilizados tanto na terapêutica médica, como na indústria de cosméticos e de alimentos, servindo como aromatizantes, flavorizantes e antioxidantes. A maioria dos produtos naturais utilizados medicinalmente são os terpenóides, as quinonas, os lignanos, os flavonóides e os alcalóides e, de uma maneira geral, apresentam ação tranqüilizante, analgésica, antiinflamatória, citotóxica, anticoncepcional, antimicrobiana, antiviral, fungicida, entre outras (Phillipson 2001).

A utilização de fitoterápicos possibilita inúmeras vantagens para o ser humano, destacando-se o alto grau de confiança que muitos segmentos da população têm nestes medicamentos. Estudos sugerem que os fitoterápicos podem apresentar menos efeitos colaterais desagradáveis que as drogas sintéticas, já que os compostos ativos se apresentam em concentrações reduzidas (Schulz 2002). Vários autores destacam que os compostos com atividade biológica que apresentam semelhança a fármacos, podem atuar em alvos moleculares diferentes (Yunes et al. 2001; Darshan e Doreswamy 2004; Müller et al. 2004; Butterweck et al. 2004; Silano et al. 2004). Além disto, o desenvolvimento de novos fitoterápicos e os custos de sua pesquisa podem ser menores do que os empregados para a fabricação de fármacos (Yunes et al. 2001).

#### 1.1 *Melissa officinalis*

Caracterizando-se por ser uma planta herbácea perene, ramificada desde a base e ereta, a *Melissa officinalis* (L.) pode atingir de 30-60 cm de altura. É uma planta nativa



da Europa que é atualmente cultivada em vários países. As folhas são membranáceas e rugosas com aproximadamente 4 cm de comprimento, e suas flores apresentam coloração levemente esbranquiçada, sendo a sua multiplicação realizada por sementes ou por estaquia (Lorenzi e Matos 2002).

A *M. officinalis* pertence à família Lamiaceae, subfamília Nepetoideae (Janicsák et al. 1999), apresentando como principal caráter taxonômico a presença do ácido fenólico denominado de ácido rosmárico, um éster do ácido caféico (Wang et al. 2004). Em sua constituição também podem ser encontrados compostos fenólicos e óleos essenciais (Janicsák et al. 1999). A utilização na cultura popular das folhas secas e frescas desta planta é recomendada para casos de ansiedade, insônia, estados gripais, problemas digestivos e dores de origem reumática (Cuppett 1998; Lorenzi e Matos 2002).

Os óleos essenciais desta planta caracterizam-se por uma mistura de monoterpenos e sesquiterpenos voláteis (grupos de terpenos insolúveis em água e sintetizados a partir de acetil CoA ou intermediários glicosídeos biossintetizados a partir do metabolismo primário), com consistência semelhante ao óleo, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, que lhe conferem um aroma ou sabor característico (Wachowicz e Carvalho 2002).

Carnat et al. (1998), trabalhando com óleos essenciais de *M. officinalis*, observaram que dentre os fenilpropanóides, o ácido caféico e o ácido rosmárico, além de alguns flavonóides, eram os compostos mais abundantes.

Os óleos essenciais podem ser encontrados em estruturas especializadas da planta, como tricomas glandulares (Wachowicz e Carvalho 2002), apresentando propriedades repelentes de insetos e herbívoros, além de serem utilizados na indústria de cosméticos e alimentos (Li et al. 2005). Estes óleos podem apresentar ainda atividades antimicrobianas (Moreira et al. 2005) e agirem como moduladores sobre determinadas enzimas, como a acetilcolinesterase (Salah e Jäger 2005), apresentando um potencial interesse na área farmacêutica.

Mrlionová et al. (2002) destacam que existem variações nas constituições dos óleos essenciais nas diversas espécies de Lamiaceae, indicando que ocorre o aumento na produção de óleos e fenilpropanóides especialmente após o período de floração (Badi et al. 2004). Neste sentido, o cultivo de *M. officinalis* em solos salinos acarreta uma significativa redução no crescimento e na síntese de óleos essenciais (Ozturk et al. 2004), da mesma forma que o tipo de substrato e a época da colheita das partes aéreas podem resultar na alteração dos constituintes do óleo (Manukyan et al. 2004).

Além dos óleos, a presença de compostos fenólicos em plantas da família Lamiaceae (Wang et al. 2004; Kovatcheva et al. 1996) e Boraginaceae (Yamamoto et al. 2000) proporcionam uma eficaz defesa contra herbívoros e fungos, além de desempenhar função de pigmentação (Del Baño et al. 2004a).

Porém, assim como os óleos essenciais, a presença dos fenilpropanóides dependem da qualidade da planta, origem geográfica, condições climáticas às quais o vegetal está exposto, período de colheita e métodos de estocagem (Dixon e Paiva 1995; Areias et al. 2000; Santos-Gomes et al. 2002).

## **2. Metabólitos Secundários nos Vegetais**

Em todo o reino vegetal o metabolismo essencial da célula é realizado pelo metabolismo considerado primário, ou seja, responsável pelo crescimento e funcionamento celular. Este metabolismo produz substâncias como aminoácidos, proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, com função de manter as estruturas celulares, armazenamento e utilização de energia (Serafini et al. 2001; Maraschin e Verporte 1999; Taiz e Zeiger 2004).

Diferentemente do metabolismo primário, as plantas apresentam uma diversidade de moléculas biologicamente ativas, denominadas de metabólitos secundários, que não são comuns a todos os vegetais e que caracterizam determinados grupos taxonômicos (Chen e Chen 2000). Estes metabólitos não participam diretamente do crescimento e do desenvolvimento do vegetal, mas são responsáveis pela sobrevivência da planta no meio que a cerca (Serafini et al. 2001; Taiz e Zeiger 2004), promovendo proteção contra a herbivoria e a infecções por microrganismos patogênicos, bem como na atração de animais polinizadores e atuando como aleloquímicos na competição planta-planta, garantindo a adaptação da espécie no ecossistema (Maraschin e Verporte 1999). Estes metabólitos podem apresentar ainda atividades biológicas em baixas concentrações e estarem relacionados com aromas, sabores e corantes naturais (Brown et al. 1989), variando conforme o desenvolvimento da planta.

Durante o florescimento de *Rosmarinus officinalis* ocorre o aumento nos níveis do ácido carnósico (composto fenólico diterpênico) nas folhas e flores (Del Baño et al. 2004a), enquanto que a concentração de flavonóides nos ramos das folhas aumenta

durante o desenvolvimento das folhas (Del Baño et al. 2004b). Deste modo, a concentração de determinados metabólitos secundários pode estar relacionada aos estágios de desenvolvimento do vegetal, ocorrendo o acúmulo de diferentes compostos devido a processos de síntese e transporte nas diferentes etapas do desenvolvimento da planta. Dentre os metabólitos secundários produzidos pelos vegetais, os fenilpropanóides representam um dos grupos mais importantes que desempenham atividade protetora nas plantas, evitando o ataque de patógenos, herbivoria e parasitismo, principalmente nas condições de estresse (Dixon e Paiva 1995).

O uso de técnicas modernas como a engenharia genética e a biologia molecular, representa um avanço no conhecimento e na manipulação dos compostos produzidos no metabolismo secundário. Desta forma, pode-se alterar a quantidade de certos grupos de compostos (Verpoorte e Memelink 2002), como flavonóides em tricomas glandulares, que atuam reduzindo a herbivoria em *Medicago sativa* (Aziz et al. 2005), clonar enzimas importantes na rota de biossíntese de fenilpropanóides (Yu et al. 2001) e modificar o metabolismo da cisteína (Riemenschneider et al. 2005), bem como utilizar marcadores moleculares para a seleção de plantas medicinais com menores níveis de componentes tóxicos (Canter et al. 2005).

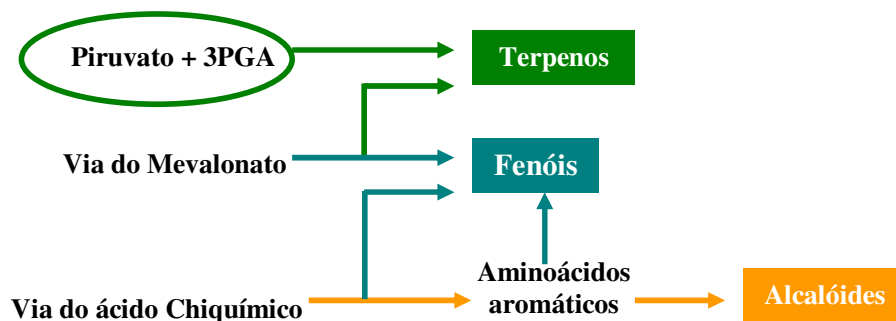
## 2.1 Fenilpropanóides

Os fenilpropanóides, também conhecidos como compostos fenólicos, são amplamente distribuídos no reino vegetal (Kurkin 2003; Kosar et al. 2004) e vem atraindo a atenção dos pesquisadores devido ao seu uso potencial como antioxidantes naturais (Cuppett 1998). Estas moléculas atuam como seqüestradoras de radicais livres, como o superóxido  $O_2^-$  e espécies reativas de nitrogênio (Sokmen et al. 2005), prevenindo a peroxidação de lipídeos (Dixon e Paiva 1995), agindo, na prevenção de doenças que envolvam a ação de radicais livres e a oxidação de lipoproteínas, como problemas cardiovasculares, arteriosclerose e trombose (Manach et al. 1998; Wang e Zhang 2005), além de agirem modulando respostas fisiológicas em animais, como a vasodilatação e a inflamação (Rice-Evans e Packer 2003).

Os fenilpropanóides são caracterizados por apresentarem um grupo fenol (grupo hidroxila funcional e um anel aromático), sendo produzidos pelo metabolismo secundário dos vegetais onde desempenham uma variedade de funções (Simões et al. 2000; Taiz e Zeiger 2004). Tal classe de compostos naturais encontra-se freqüentemente

conjugada a açúcares e ocasionalmente presentes em proteínas, alcalóides e terpenos (Harborne 1988).

Estes compostos podem ser formados através de duas rotas biogénéticas (Figura 1): pelo ácido chiquímico, a partir de carboidratos, ou pela via do mevalonato, que se inicia pela acetil-coenzima A e malonil-coenzima A. Esta última rota é a menos significativa devido a estar restrita aos fungos e bactérias (Taiz e Zeiger 2004).



**Figura 1:** Principais vias do metabolismo de fenilpropanóides e suas interligações (adaptado de Taiz e Zeiger 2004)

A via de formação dos fenilpropanóides é considerada uma das mais importantes rotas metabólicas responsável pela síntese de muitos produtos naturais em plantas, como os flavonóides e antocianinas, os taninos, as ligninas e os ácidos fenólicos. Os flavonóides são responsáveis pela coloração das flores, frutas e algumas folhas, possuindo ainda propriedades de inibir infecções causadas por patógenos, proteger a célula contra a radiação UV, induzir a germinação do pólen e regular o transporte de auxinas (Hao et al. 1996; Harborne e Williams 2000; Nugroho et al. 2002).

Os ácidos fenólicos apresentam duas diferentes classes, os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos, derivados respectivamente do ácido benzóico e do ácido cinâmico (Fleuriet e Macheix 2003). Dentre os ácidos fenólicos de maior importância para o homem, o ácido rosmárico e o ácido caféico, presentes em grandes quantidades nas espécies da família Lamiaceae, vêm chamando a atenção dos pesquisadores devido a uma série de atividades biológicas como propriedades antidepressiva (Takeda et al. 2002), antioxidante (Akowuah et al. 2004) e antiespasmódica (Darshan e Doreswamy 2004). Estes ácidos derivados da via do ácido cinâmico (Dixon e Paiva 1995), além de apresentarem potenciais terapêuticos, também são utilizados no tratamento de várias

doenças, entre elas a asma brônquica, úlcera, inflamações e hepatotoxicidade (Al-Sereitia et al. 1999).

O ácido caféico (AC), ocorrendo normalmente em concentrações menores que do ácido rosmárico, pode ser encontrado em várias partes da planta como folhas, flores e caule. Entretanto, também pode estar presente no solo, inibindo a germinação e o crescimento de plantas (Banthorpe et al. 1989; Janicsák et al. 1999), e juntamente com a lignina, fornecendo rigidez mecânica às plantas, impedindo o consumo e dificultando a digestão destas pelos herbívoros (Taiz e Zeiger 2004). Dentre as suas principais propriedades, destaca-se a antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (Kurkin 2003).

Considerado uma neolignina, o ácido rosmárico (AR) pode ser utilizado como um marcador de autenticidade e qualidade das plantas de *R. officinalis* e de *M. officinalis* (Kurkin 2003). Com estrutura de um dissacarídeo, este ácido atua como intermediário biossintético no metabolismo dos fenilpropanóides das dicotiledôneas (Moolgaard e Ravn 1988).

Vários trabalhos indicam que o AR possui a propriedade de reverter processos inflamatórios (Molnar e Garai 2005), inibindo a atividade enzimática de lipooxigenases, ciclooxigenases e xantina oxidase (Chung et al. 2004), além da ação antioxidativa (Al-Sereitia et al. 1999). Devido às propriedades antioxidantes, os compostos fenólicos, entre eles o AR, podem atuar como protetores contra o câncer humano (Al-Sereitia et al. 1999; Kovatcheva et al. 1996).

A síntese de AR pode ser promovida a partir da manipulação das condições do meio de cultura, como em culturas de células de *Coleus blumei* (Petersen e Simmonds 2003; Banthorpe et al. 1989; Yamamoto et al. 2000). Neste sentido, poderia-se promover a biossíntese do AR através da indução de respostas de defesa específicas do vegetal (Chen e Chen 2000; Petersen e Simmonds 2003).

## 2.2 Fatores que Interferem no Metabolismo Secundário

A biossíntese de metabólitos secundários está intimamente relacionada às condições ambientais. Estas condições promovem alterações tanto em rotas de síntese e degradação de compostos quanto na expressão gênica em resposta a algum tipo de estresse (Wilt e Miller 1992; Badi et al. 2004), promovendo alterações no crescimento e na quantidade ou qualidade dos compostos secundários produzidos pelos vegetais (Badi et al. 2004).

A tolerância das plantas ao estresse envolve respostas adaptativas relacionadas a processos moleculares e celulares, resultando na limitação do dano e na prevenção de doenças (Tester e Bacic 2005). Condições ambientais extremas, como a salinidade, a aridez e as temperaturas extremas, podem atuar com fatores limitantes do crescimento e da produtividade (Atienza et al. 2004). Estudos realizados com *Glycine max* indicam que as condições abióticas, como a baixa temperatura, o pH e a alta salinidade, promovem a alteração dos níveis de transcrição de genes de nodulação (genes *Nod*), promovendo a deformação de raízes (Duzan et al. 2004). No milho, tanto o frio quanto a deficiência de fósforo no solo promovem a síntese e o acúmulo de antocianinas (Christie et al. 1994).

Tester e Bacic (2005) observaram em cereais o efeito de condições ambientais como salinidade e acidez do solo, ocasionando a redução do crescimento e a resistência a condições de estresse; enquanto Georgiev et al. (2004) descreveram que a exposição de culturas *in vitro* de *Lavandula vera* a diferentes temperaturas promove alterações na síntese e acúmulo de AR.

As plantas respondem às condições de estresse abiótico e biótico alterando o perfil dos metabólitos secundários (Dixon e Paiva 1995), sendo os fenilpropanóides o grupo que apresenta as maiores alterações (Randhir et al. 2002). Sendo assim, os ácidos fenólicos estão diretamente implicados nas respostas a estresses mecânicos, químicos e biológicos, sendo que certas moléculas deste grupo podem ser sintetizadas *de novo* em resposta ao ataque de patógenos (Fleuriet e Macheix 2003).

Segundo Staniszewska et al. (2003), é possível promover a biossíntese de compostos secundários, como a umbeliferona, em raízes de *Ammi majus* cultivadas *in vitro*, eliciadas com células mortas de *Enterobacter sakazaki*. Já Dietrich et al. (2005) descrevem que a aplicação exógena da bactéria *Pseudomonas syringae* em *Arabidopsis sp.* promove respostas sistêmicas resultando no aumento da atividade de peroxidase e chitinase em folhas infectadas. Da mesma forma, a aplicação exógena de organismos fitopatogênicos em plantas pode desencadear o aumento da síntese de moléculas de interesse, como o ácido rosmárico em *Colleus sp.* (Petersen e Simmonds 2003), produção de precursores de dopamina em *Vicia faba* (Randhir et al. 2002), produção de fenilpropanóides em *Brassica napus L. var. oleifera* (Plazek et al. 2005), compostos oxidantes em *Triticum aestivum* (Ortmann et al. 2004) e escopolamina e hiosciamina em *Brugmansia candida* (Pitta-Alvarez et al. 2000).

Desta forma, pode-se promover a via dos fenilpropanóides utilizando-se de compostos (eliciadores) que simulem condições ambientais adversas.

### 2.3 Elicidores

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para melhorar a produtividade de compostos de interesse nos vegetais, incluindo a seleção de linhagens, otimização das condições de cultivo, uso de eliciadores e engenharia metabólica (Chen e Chen 2000). A utilização de moléculas eliciadoras representa uma abordagem eficiente para o aumento do metabolismo secundário. Estas moléculas podem ser endógenas ou exógenas, dependendo de como atuam no vegetal, e bióticas ou abióticas, dependendo de sua origem (Dörnenburg e Knorr 1995).

Segundo Pitta-Alvarez et al. (2000), extratos de diversos micro organismos (como bactérias e fungos patogênicos) e moléculas sinalizadoras dos mecanismos de defesa das plantas (como ácido salicílico, ácido jasmônico, etc.), bem como enzimas (celulase, pectinase, etc.), são considerados eliciadores bióticos. Segundo os mesmos autores, os eliciadores abióticos incluem radiação ultravioleta, metais pesados e compostos químicos.

A utilização de técnicas biotecnológicas, como a cultura de tecidos e células *in vitro*, possibilita a identificação de eliciadores bióticos e abióticos capazes de estimular a produção de metabólitos de interesse agrícola, farmacêutico e alimentar (Altman 1999; Qin e Lan 2004). Além da determinação de moléculas eliciadoras, tais técnicas possibilitam ainda estudos voltados para o conhecimento dos mecanismos de infecção de patógenos em plantas (Puchooa 2004) e vias de síntese de metabólitos, como a do ácido rosmárico (Petersen 1997).

A suplementação de eliciadores como o metil jasmonato e o quitosano induzem o aumento na síntese de paclitaxel em culturas celulares de *Taxus chinensis* (Luo e He 2004). Plantas envasadas de *Hypericum perforatum* inoculadas com esporos de fungo dobram a produção de hipericina, uma antraquinona com ação farmacológica (Sirvent e Gibson 2002), existindo vários trabalhos que relatam o aumento na síntese e acúmulo de compostos de interesse em resposta a ação de eliciadores, como a produção de berberina (Brodelius et al. 1989), do taxol (Ciddi et al. 1995; Dörnenburg e Knorr 1995) e de novas umbelíferonas em *Ammi majus* L. (Staniszewska et al. 2003).

### 2.3.1 Patógenos como eliciadores

A invasão de uma planta intacta por patógenos ativa inúmeros mecanismos de defesa vegetal, incluindo a síntese de metabólitos antimicrobianos (Dörnenburg e Knorr 1995).

Em geral, os vegetais se defendem naturalmente contra patógenos utilizando uma combinação de duas estratégias: (i) estrutural, desenvolvendo barreiras físicas que impedem tanto a entrada do patógeno quanto a disseminação pelos tecidos da planta; (ii) reações bioquímicas das células e tecidos, produzindo compostos tóxicos que impedem o desenvolvimento do patógeno na planta (Medeiros et al. 2003). As reações bioquímicas locais, que levam a morte celular localizada e a formação de lesões necróticas no sítio de penetração do patógeno, são consideradas como respostas de hipersensibilidade (RH) (Sticher et al. 1997).

Entretanto, tanto a RH quanto outro mecanismo de resposta ao ataque do patógeno pode induzir no vegetal uma resistência de longa duração e de amplo espectro a infecções subseqüentes. Esta resposta de resistência induzida a doenças é conhecida há muitos anos como resistência sistêmica adquirida – SAR (do inglês, Systemic Acquired Resistance) (Ryals et al. 1994). A indução de SAR pode ocorrer após o tratamento de plantas com substâncias de origem biótica e abiótica, podendo ou não ser acompanhada de acúmulo de marcadores moleculares, como o ácido salicílico (Curtis et al. 2004).

Os flavonóides, as cumarinas e os ácidos fenólicos como o caféico, o clorogênico e o ferúlico, correspondem às defesas químicas dos vegetais. Estes compostos podem estar presentes constitutivamente ou serem sintetizados *de novo* devido à presença de patógenos (Friedman 1997). Estas moléculas que não estavam presentes antes da infecção são denominadas de fitoalexinas e possuem propriedades antimicrobianas.

Dentre as fitobactérias de interesse para eliciação de plantas a fim de induzir a SAR, destaca-se a utilização da *Erwinia carotovora*. Esta bactéria gram negativa é a mais severa no ataque em *Solanum tuberosum*, podendo causar sintomas em várias partes da planta, como folhas, raízes, ramos, tecidos e tubérculos. No ataque desta bactéria, o acúmulo de fitoalexinas é considerado um dos mais importantes mecanismos de defesa, estando relacionada com a redução da susceptibilidade de plantas a esta bactéria (Abenthum et al. 1995).



### 2.3.2 Ação do Ácido Salicílico (AS)

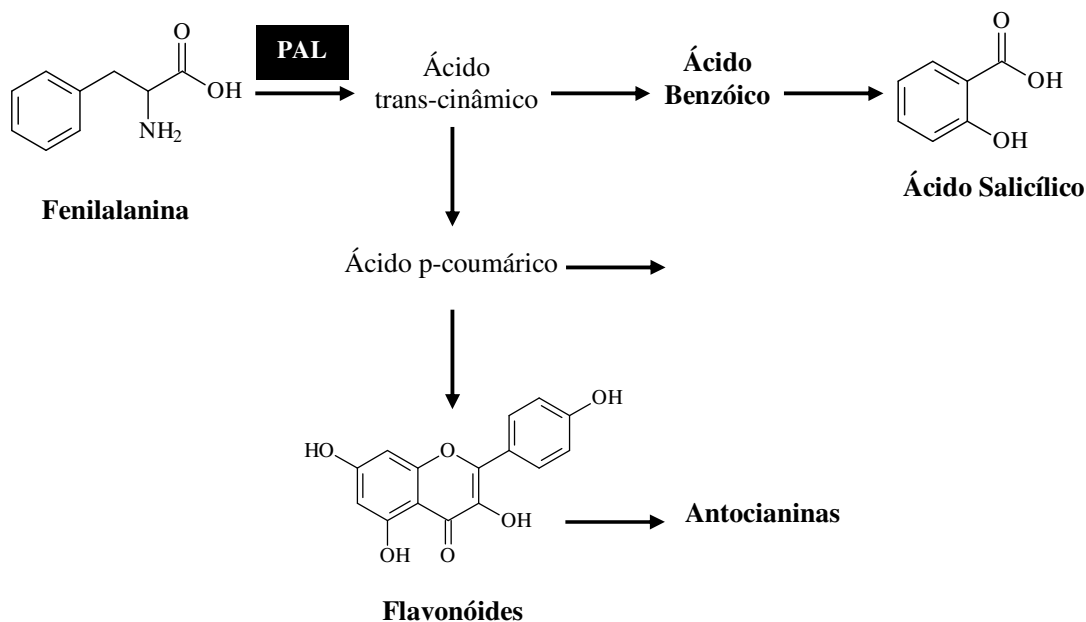
A aplicação exógena do ácido salicílico (AS) nas plantas desencadeia rotas biossintéticas para o crescimento e o desenvolvimento, assim como a expressão de genes de defesa, que são ativados quando ocorre a infecção por patógenos. Tanto o AS quanto o metil jasmonato estão envolvidos em sistemas de transdução de sinais que induzem a produção de compostos de defesa, como alcalóides, polifenóis e proteínas relacionadas com a patogênese. Esta resposta resulta na defesa, na proteção e na resistência da planta contra patógenos (Yao e Tian 2005).

O ácido salicílico (AS) pode induzir a floração em Lamiaceae (Hatayama e Takeno 2003), proteger *Triticum aestivum* contra o estresse hídrico (Singh e Usha 2003) e promover RH, essencial para a resistência local e sistêmica contra patógenos (Pastírová et al. 2004). O AS e seus derivados químicos, como o ácido acetilsalicílico (ASA), podem atuar ainda como agentes indutores do metabolismo dos tropanos em células e tecidos de *Atropa belladonna* cultivados *in vitro* (Lee et al. 2001), de antraquinonas em *Morinda citrifolia* (Komaraiah et al. 2005), modular a atividade da glutationa-S-transferase (Gong et al. 2005), além de promover a atividade da fenilalanina amônia-liase, das peroxidases e a lignificação em plantas envasadas de *Asparagus officinalis* (He e Wolyn 2005).

O AS pode regular a via de formação dos flavonóides, sendo considerado por alguns autores como um fitohormônio envolvido nas reações de defesa da planta (Gutiérrez-Conrado et al. 1998; Nugroho et al. 2002), induzindo a resposta sistêmica adquirida (Gutiérrez-Conrado et al. 1998; Nugroho et al. 2002; Verpoorte e Memelink 2002; Curtis et al. 2004). Além de desencadear tais respostas, o AS também está envolvido na ativação de genes relacionados a respostas de estresse a seca, ao frio, ao calor, a salinidade e a radiação UV (Peng e Jiang 2006); e atuando ao nível da biossíntese de etileno, na despolarização da membrana, no aumento da atividade fotossintética e a da quantidade de clorofila em algumas plantas, como a soja (Gutiérrez-Conrado et al. 1998).

A aplicação exógena do AS pode reduzir o crescimento dos vegetais. Sendo assim, Gutiérrez-Conrado et al. (1998) descrevem que diferentes concentrações de AS podem resultar em diminuição de 20% a 23% no crescimento de *Glycine max*, sendo que o efeito mais dramático é observado nas raízes, as quais foram reduzidas em aproximadamente 45%.

Existe uma estreita relação entre a atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL) e a biossíntese de AS (Figura 2), sendo que o aumento da atividade desta enzima pode promover a inibição da sinalização pelo AS (Pastírová et al. 2004; Peng e Jiang 2006; Yao e Tian 2005).



**Figura 2:** Rota de síntese dos compostos fenólicos derivados da via da fenilalanina amônia-liase (PAL) (adaptado de Taiz e Zeiger 2004).

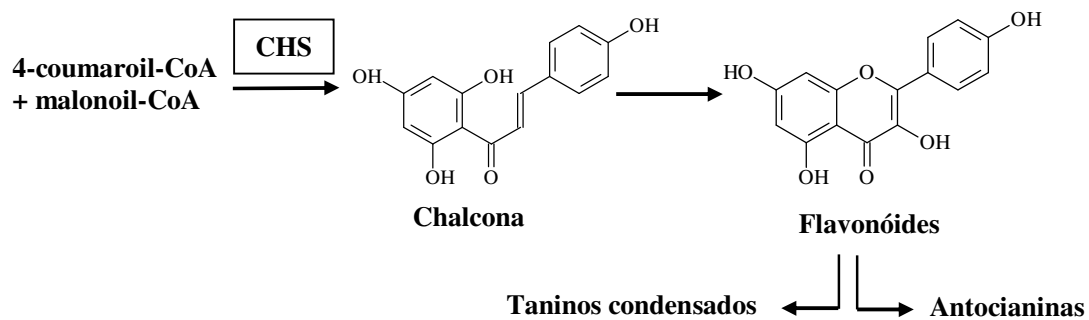
#### 2.4 Atividade da Fenilalanina Amônia-liase (PAL)

A indução de estresse em organismos vegetais promovidos por fatores bióticos e abióticos resulta em respostas de defesa. A produção de moléculas de defesa, como antocianinas, os flavonóides, os taninos condensados e os isoflavonóides, representa a reação denominada RH, que pode levar a morte localizada de células do vegetal situadas nos locais onde o agressor penetra (Pastírová et al. 2004).

A RH é desencadeada por enzimas da rota dos fenilpropanóides, ativadas principalmente pela fenilalanina amônia-liase (PAL, ou do inglês PAL), a primeira e mais importante enzima envolvida nesta rota (Figura 2) (Pastírová et al. 2004; Yao e Tian 2005). A PAL é uma enzima que utiliza a L-fenilalanina como substrato produzindo o ácido trans-cinâmico (Hao et al. 1996).

Estando relacionada ao sistema de defesa da planta, a atividade da PAL pode ser induzida pela suplementação exógena de eliciadores como o ácido salicílico e o metil jasmonato (Yao e Tian 2005) resultando no aumento da produção de compostos fenólicos (Taiz e Zeiger 2004). Neste sentido, o ataque de vírus em leguminosas promove a rápida elevação da atividade da PAL, estando esta atividade intimamente relacionada com o estado fisiológico da planta (Nugroho et al. 2002).

Além da PAL, a atividade da enzima chalcona sintase (CHS) pode ser também promovida por condições de estresse. A CHS é uma enzima chave na síntese de flavonóides (Figura 3), formando antocianinas, flavonóides, taninos condensados e isoflavonóides. Os flavonóides, como a quercetina, e flavonas são importantes não só como agentes antipatogênicos, mas também para a proteção das plantas contra a radiação UVB (280-320 nm). Mutantes de *Arabidopsis thaliana* que não expressam esta enzima são mais sensíveis à radiação UVB, crescendo pouco sob condições normais devido à ausência da produção de flavonóides (Dixon e Paiva 1995).



**Figura 3:** Rota de síntese dos flavonóides, na qual a chalcona sintase (CHS) é a principal enzima envolvida na biossíntese de antocianinas, isoflavonóides e taninos (adaptado de Taiz e Zeiger 2004).

### 2.5 Atividade da Polifenol oxidase (PPO)

A polifenol oxidase (PPO) é uma enzima amplamente distribuída na natureza, conhecida por fazer parte de um grupo de enzimas que estão relacionadas com o escurecimento de frutas e vegetais danificados (Gauillard et al. 1993), assim como a melanização em animais (Shi et al. 2001). Este grupo de enzimas catalisa dois eventos distintos relacionados com o oxigênio molecular, denominados (a) a hidroxilação de

monofenóis em difenóis, e (b) a subsequente oxidação de difenóis em quinonas (Valero e García-Carmona 1992; Gauillard et al. 1993; Shi et al. 2001).

Os compostos fenólicos, localizados nos vacúolos, são intermediários do metabolismo de fenilpropanóides e estão envolvidos na formação das paredes celulares, tecidos e órgãos vegetais. Precusores para a síntese de lignina, a deposição de fenilpropanóides na parede celular após a infecção por patógeno apresenta-se como um importante mecanismo de defesa vegetal. Por outro lado, a PPO está localizada nos cloroplastos, nas membranas dos tilacóides, e em algumas espécies, pode apresentar uma forma latente (Valero e García-Carmona 1992). Ao ocorrer a lesão no tecido vegetal, inicia a oxidação destes compostos fenólicos pela PPO (Felton et al. 1992). Cvikrova e colaboradores (1996) observaram em alfafa que a atividade máxima da PPO estava relacionada com a presença de compostos fenólicos livres.

A fim de esclarecer as suas várias funções biológicas, muitas rotas de síntese vêm sendo propostas. Autores sugerem que funções desta enzima podem estar relacionadas à resistência vegetal contra patologias (Constabel et al. 1995; Ray e Hammerschmidt 1998), bem como contra a herbivoria e insetos (Felton et al. 1992). Em algumas plantas o incremento da atividade da PPO está relacionado com a produção de compostos secundários, como ácido jasmônico e metil jasmonato, envolvidos na transdução de sinais de defesa. Entretanto, este fato não é generalizado nos vegetais, pois algumas plantas apresentam pouca ou nenhuma indução desta enzima quando ocorre o ferimento ou eliciação (Constabel et al. 1995).

Mazzafera e Robinson (2000) trabalhando com *Coffea arabica*, descrevem um aumento na atividade da PPO em resposta ao ataque de patógeno, induzindo a defesa antinutritiva. Neste sentido, durante o ferimento no vegetal quinonas são formadas pela oxidação de fenóis induzida pela PPO, podendo modificar proteínas vegetais, reduzindo o valor nutritivo destas para os herbívoros. Estes mesmos autores relatam que folhas jovens desta planta apresentam grande atividade desta enzima, sendo que esta atividade declina concomitante com o desenvolvimento foliar.

### 3. Micropropagação

Dentre as diversas técnicas biotecnológicas utilizadas nos vegetais, a micropropagação destaca-se devido ao uso potencial no controle do crescimento e no desenvolvimento vegetal, possibilitando estudos aprofundados das áreas bioquímica, farmacêutica e alimentar, através do controle da síntese de produtos naturais.

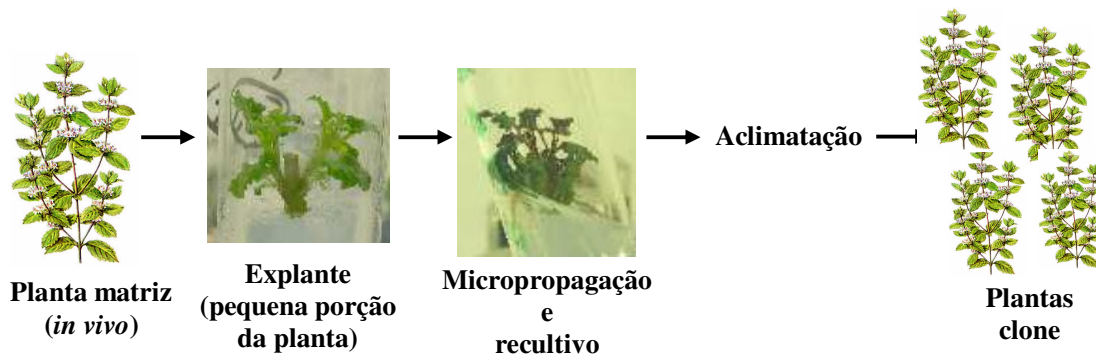
A micropropagação caracteriza-se por ser uma técnica que não necessita de muita tecnologia e pertence a uma categoria de técnicas de baixo custo (Puchooa 2004). Através desta técnica, obtém-se um grande número de clones de plantas com alta qualidade, podendo-se propagar, rapidamente e em larga escala, novos genótipos a partir de uma pequena amostra de germoplasma (Altman 1999).

É extremamente difícil comparar a quantidade de uma substância produzida em células e tecidos cultivados com aquelas produzidas pela planta *in vivo*, pois alguns metabólitos são freqüentemente sintetizados em um tecido e transportados para outros, onde são acumulados. Apesar desta limitação, existem vantagens para o uso da cultura de tecidos como fonte de compostos biologicamente importantes, como por exemplo, a independência de fatores ambientais, incluindo clima, pragas, doenças e limitações geográficas (Mantell et al. 1994).

Existem vários protocolos para a regeneração das mais diversas espécies vegetais de interesse, sendo estes baseados em variações e combinações de reguladores de crescimento suplementados ao meio de cultura (Djilianov et al. 2005).

As técnicas empregadas na cultura de tecidos permitem a produção de diversas moléculas de interesse, como flavorizantes e corantes empregados na indústria (Millam et al. 2005). Devido a esta capacidade, plantas têm sido geneticamente modificadas visando à produção de moléculas mais complexas, como anticorpos ou vacinas, abrindo uma nova era para a agricultura molecular (Puchooa 2004).

Com o objetivo de produzir mudas uniformes e com identidade genética conhecida, a cultura de nós e ápices caulinares (Figura 4) permite a obtenção de grande quantidade de indivíduos idênticos a partir de plantas selecionadas (homogeneidade), produção de mudas durante todo o ano, além de desenvolver técnicas para a conservação de germoplasma e o melhoramento genético (Serafini et al. 2001).



**Figura 4:** Etapas da micropropagação (adaptado de George 1993).

### 3.1 Indução de Metabólitos Secundários

A produção de metabólitos secundários *in vitro* apresenta um grande potencial para o conhecimento dos processos de biossíntese. Tal fato é compreendido porque as culturas celulares podem ser submetidas a distintas condições físicas e químicas, como o uso de precursores, eliciadores, estresses e bloqueadores de vias de síntese, levando a mudanças na produção de um determinado metabólito (Djilianov et al. 2005).

Muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos na cultura de tecidos de várias espécies vegetais de interesse comercial. Alguns destes, realizados com *Salvia officinalis*, permitiram estudar o efeito da concentração de cinetina na produção de diterpenos fenólicos, principalmente do carnosol (Santos-Gomes et al. 2002). Segundo Staniszewska et al. (2003), o uso de eliciadores como fungos e sílica promovem a síntese de metabólitos secundários em células e raízes cultivadas *in vitro* de *Ammi majus*. Em países europeus destaca-se esta alternativa de manipulação e cultivo, visto que a aclimação de determinadas espécies vegetais nestas regiões é difícil (Staniszewska et al. 2003). Além destes estudos, Amaral e Silva (2003) destacam os trabalhos realizados para a produção de clones de *Aloe vera*, produção de híbridos por hibridização somática em *Nicotiana tabacum*, haplóides em *Hyoscyamus niger* e plantas geradoras de vacinas em *Solanum tuberosum*.

A técnica de cultura de tecidos permite ainda utilizar eliciadores (agentes químicos e estressantes), para alterar as rotas metabólicas afetando qualitativamente e quantitativamente as moléculas bioativas produzidas. Neste sentido, trabalhos com *Atropa belladonna* e *Lithospermum erythrorhizon* apresentam bons resultados quanto à produção de metabólitos com propriedades terapêuticas (Lee et al. 2001, Yamamoto et al. 2000).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. *Objetivos Gerais*

Avaliar a ação eliciadora do ácido salicílico e de suspensão bacteriana no metabolismo dos fenilpropanóides em plantas de *Melissa officinalis* cultivadas *in vitro* e em vaso.

### 4.2. *Objetivos Específicos:*

- a) Induzir a organogênese *in vitro* de *Melissa officinalis*;
- b) Avaliar o efeito de diferentes reguladores de crescimento na micropropagação de *M. officinalis*;
- c) Avaliar o efeito eliciador do ácido salicílico e da suspensão de bactéria *Erwinia carotovora* no metabolismo dos fenilpropanóides;
- d) Promover o aumento da síntese e acúmulo de compostos fenólicos e flavonóides em brotos cultivados *in vitro* e plantas cultivadas em vaso;
- e) Avaliar a atividade da PAL (fenilalanina amônia-liase) e da PPO (polifenol oxidase) em brotos cultivados *in vitro* e em plantas cultivadas em vaso;

## 5. Referências Bibliográficas

Abenthum, K.; Hildenbrand, S.; Ninnemann, H. 1995. Elicitation and accumulation of phytoalexin in stems, stolons and roots of *Erwinia*-infected potato plants.

**Physiological and Molecular Plant Pathology** **46**: 349-359.

Amaral, C.L.F. e Silva, A.B. 2003. Melhoramento biotecnológico em plantas medicinais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** **30**: 55-59.

Akowuah, G.A.; Zhari, I.; Norhayati, I.; Sadikun, A.; Khamsah, S.M. 2004. Sinensetin, eupatorin, 30-hydroxy-5, 6, 7, 40-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of *Orthosiphon stamineus* from Malaysia. **Food Chemistry** **87**: 559-566.

- Al-Sereitia, M.R.; Abu-Amerb, K.M.; Sena, P. 1999. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. **Indian Journal of Experimental Biology** **37**: 124-131.
- Altman, A. 1999. Plant biotechnology in the 21<sup>st</sup> century: the challenges ahead. **Electronic Journal of Biotechnology** **2** (2): 51-55.
- Areias, F.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Ferreres, F.; Seabra, R.M. 2000. Flavonoids and phenolic acids of sage: Influence of some agricultural factors. **Journal Agriculture Food Chemistry** **48**: 6081-6084.
- Atienza, S.G.; Faccioli, P.; Perrotta, G.; Dalfino, G.; Zschiesche, W.; Humbeck, K.; Stanca, M. A.; Cattivelli, L. 2004. Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions. **Plant Science** **167**: 1359-1365.
- Aziz, N.; Paiva, N.L.; May, G.D.; Dixon, R.A. 2005. Transcriptome analysis of alfalfa glandular trichomes. **Planta** **221**: 28–38.
- Badi, H.N.; Yazdani, D.; Ali, S.M.; Nazari, F. 2004. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products** **19**: 231-236.
- Banthorpe, D.V.; Bilyard, H.J.; Brown, G.D. 1989. Enol Esters of caffeic acid in several genera of the labitae. **Phytochemistry** **28** (88): 2109-2113.
- Brodelius, P.; Funk, C.; Haner, A.; Villegas, M. 1989. A procedure for the determination of optimas chitosan concentrations for elicitation of cultured plant-cells. **Phytochemistry** **28** (10): 2651-2654.
- Brown, C.M.; Campbell, I.; Priest, F.G. 1989. **Introducción a la biotecnología**. Zaragoza, Espanha. Editora Acribia S.A. 167p.
- Butterweck, V.; Derendorf, H.; Gaus, W.; Nahrstedt, A.; Schulz, V.; Unger, M. 2004. Pharmacokinetic herb-drug interactions – are preventive screenings necessary and appropriate? **Planta Medica** **70**: 784-791.
- Canter, P.H.; Thomas, H.; Ernst, E. 2005. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. **Trends in Biotechnology** **23** (4): 180-185.
- Carnat, A.P.; Carnat, A.; Fraisse, D.; Lamaison, J.L. 1998. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. **Pharmaceutica Acta Helvetiae** **72**: 301-305.



- Chen, H. e Chen, F. 2000. Effects of yeast elicitor on the grown and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture. **Process Biochemistry** **35**: 837-840.
- Christie, P. J.; Alfenito, M. R.; Walbot, V. 1994. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. **Planta** **194**: 541-549.
- Chung, T-W.; Moon, S-K.; Chang, Y-C.; Ko, J-H.; Lee, Y-C.; Cho, G.; Kim, S-H.; Kim, J-G.; Kim, C-H. 2004. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. **The FASEB Journal** **18**: 1670-1681.
- Ciddi, V.; Srinivasan, V.; Shuler, M.L. 1995. Elicitation of *Taxus* sp cell cultures for production of taxol. **Biotechnology Letters** **17** (12): 1343-1346.
- Constabel, C.P.; Bergey, D.R.; Rian, C.A. 1995. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. **Plant Biology** **92**: 407-411.
- Cuppett, S. L. 1998. Antioxidant activity of Lamiaceae. **Advances in Food and Nutrition Research** **42**: 245-271.
- Curtis, H.; Noll, U.; Stormann, J.; Slusarenko, A.J. 2004. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **65** (2): 79-89.
- Cvikrova, M.; Hrubcova, M.; Eder, J.; Binarova, P. 1996. Changes in the levels of endogenous phenolics, aromatic monoamines, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and auxin oxidase activities during initiation of alfafa embryogenic and non-embryogenic calli. **Plant Physiology Biochemistry** **34**: 853-861.
- Darshan, S. e Doreswamy, R. 2004. Patented anti-inflammatory plant drug development from traditional medicine. **Phytotherapy Research** **18**: 343-357.
- Del Baño, M.J.; Lorente, J.; Castillo, J.; Benavente-Garcia, O.; Del Rio, J.A.; Ortuno, A.; Quirin, K-W.; Gerard, D. 2004a. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flower, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **51**: 4247-4253.
- Del Baño, M.J.; Lorente, J.; Castillo, J.; Benavente-Garcia, O.; Marin, M.P.; Del Rio, J.A.; Ortuno, A.; Ibarra, I. 2004b. Flavonoid distribution during the development of

- leaves, flower, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Postulation of a biosynthetic pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **52**: 4987-4992.
- Dietrich, R.; Ploss, K.; Heil, M. 2005. Growth responses and fitness costs after induction of pathogen resistance depend on environmental conditions. **Plant, Cell and Environment** **28**: 211-222.
- Dixon, R. A. e Paiva, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell** **7**: 1085-1097.
- Djilianov, D.; Genova, G.; Parvanova, D.; Zapryanova, N.; Konstantinova, T.; Atanassov, A. 2005. *In vitro* culture of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **80**: 115-118.
- Dörnenburg, H. e Knorr, D. 1995. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant-cell cultures. **Enzyme and Microbial Technology** **17** (8): 674-684.
- Duzan, H.M.; Zhou, X.; Souleimanov, A.; Smith, D.L. 2004. Perception of *Bradyrhizobium japonicum* Nod factor by soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] root hairs under abiotic stress conditions. **Journal of Experimental Botany** **55** (408): 2641-2646.
- Felton, G.W.; Donato, K.K.; Broadway, R.M.; Duffey, S.S. 1992. Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dietary protein to a noctuid herbivore, *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology** **38**: 277-285.
- Fleuriot, A. e Macheix, J-J. 2003. Phenolic acids in fruits and vegetables. 2003. *In*: Rice-Evans, C. A.; Parcker, L. **Flavonoids in health and disease**. Marcel Dekker. Inc. New York. pp.1-41.
- Friedman, M. 1997. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols: a review. **Journal Agriculture and Food Chemistry** **45**: 1523-1540.
- Gauillard, F.; Richard-Forget, F.; Nicolas, J. 1993. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. **Analytical Biochemistry** **215**: 59-65.
- George, E.F. 1993. **Plant Propagation by Tissue culture: part 1 – the technology**. England. Ed. Exegetics Ltd. 574p.
- Georgiev, M.; Pavlov, A.; Ilieva, M. 2004. Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension – the effect of temperature. **Biotechnology Letters** **26**: 855-856

- Gong, H.; Jiao, Y.; Hu, W-w; Pua, E-C. 2005. Expression of glutathione-S-transferase and its role in plant growth and development in vivo and shoot morphogenesis in vitro. **Plant Molecular Biology** **57**: 53-66.
- Gutiérrez-Conrado, M.A.; Trejo-Lopes, C.; Larque-Saavedra, A. 1998. Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. **Plant Physiology Biochemistry** **36** (8): 563-565.
- Hao, Z.; Charles, D.J.; Yu, L.; Somin, J.E. 1996. Purification and characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Ocimum basilicum*. **Phytochemistry** **43** (4): 735-739.
- Harborne, J.B. 1988. **Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis**. Chapman e Hall. London. 302p.
- Harborne, J.B. e Williams, C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry** **55**: 481-504.
- Hatayama, T. e Takeno, K. 2003. The metabolic pathway of salicylic acid rather than of chlorogenic acid is involved in the stress-induced flowering of *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Physiology** **160**: 461-467.
- He, C.Y. e Wolyn, D. J. 2005. Potential role for salicylic acid in induced resistance of asparagus roots to *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi*. **Plant Pathology** **54**: 227-232.
- Janicsák, G.; Mathé, I.; Miklóssy-Vári, V.; Blunden, G. 1999. Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species. **Biochemical Systematics and Ecology** **27**: 733-738.
- Komaraiah, P.; Kavi Kishor, P.B.; Carlsson, M.; Magnusson, K-E.; Mandenius, C-F. 2005. Enhancement of anthraquinone accumulation in *Morinda citrifolia* suspension cultures. **Plant Science** **168**: 1337-1344.
- Kosar, M.; Dorman, D.; Baser, K.; Hiltunen, R. 2004. An improved HPLC post-column methodology for the identification of free radical scavenging phytochemicals in complex mixtures. **Chromatographia** **60**: 635-638.
- Kovatcheva, E.; Pavlov, A.; Koleva, I.; Ilieva, M.; Mihneva, M. 1996. Rosmarinic acid from *Lavandula vera* MM cell culture. **Phytochemistry** **43** (6): 1243-1244.
- Kurkin, V.A. 2003. Phenylpropanoids from medicinal plants: distribution, classification, structural analysis, and biological activity. **Chemistry of Natural Compounds** **39** (2): 123-153.

- Lee, K.; Hirano, H.; Yamakawa, T.; Kodama, T.; Igarashi, Y.; Shimomura, K. 2001. Responses of transformed root culture of *Atropa belladonna* to salicylic acid stress. **Journal of Bioscience and Bioengineering** **91** (6): 586-589.
- Li, W.; Koike, K.; Asada, Y.; Yoshikawa, T.; Nikaido, T. 2005. Rosmarinic acid production by *Coleus forskohlii* hairy root cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **80**: 151-155.
- Lorenzi, H. e Matos, F. J. A. 2002. Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas. **Nova Odessa**, SP. Ed. Instituto Plantarum, 511p.
- Luo, J. e He, G. 2004. Optimization of elicitors and precursors for paclitaxel production in cell suspension culture of *Taxus chinensis* in the presence of nutrient feeding. **Process Biochemistry** **39**: 1073-1079.
- Manach, C.; Morand, C.; Crespy, V.; Demigné, C.; Texier, O.; Régéat, F.; Rémésy, C. 1998. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. **FEBS Letters** **426**: 331-336.
- Mantell, S.H.; Matthaeus, J.A.; McKee, R.A. 1994. **Princípios de Biotecnologia em plantas – uma introdução a engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética. 333p.
- Manukyan, A.E.; Heuberger, H.T.; Schnitzler, A.H. 2004. Yield and quality of some herbs of the Lamiaceae family under soilless greenhouse production. **Journal of Applied Botany and Food Quality-Angewandte Botanik** **78** (3): 193-199.
- Maraschin, M. e Verporte, R. 1999. Engenharia do Metabolismo Secundário. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** **10**: 24-28.
- Mazzafera, P. e Robinson, S.P. 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. **Phytochemistry** **55**: 285-296.
- Medeiros, R. B.; Ferreira, M. A. S.V.; Dianese, J.C. 2003. **Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno**. Ed. UnB, Brasília.
- Millam, S.; Obert, B.; Pret'ová, A. 2005. Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* – a review. **Plant Cell, Tissue e Organ Culture** **82**: 93-103.
- Moolgaard, P. e Ravn, H. 1988. Evolutionary aspects of caffeoyl ester distribution in dicotyledons. **Phytochemistry** **27** (8): 2411-2421.
- Molnar, V. e Garai, J. 2005. Plant-derived anti-inflammatory compounds affect MIF tautomerase activity. **International Immunopharmacology** **5**: 849-856.
- Moreira, M.R.; Ponce, A.G.; del Valle, C.E.; Roura, S.I. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT** **38**: 565-570.

- Mrljanová, M.; Tekel'ova, D.; Felklova, M.; Reinohl, V.; Toth, J. 2002. The influence of the harvest cut height on the quality of the herbal drugs *melissae folium* and *melissae herba*. **Planta Medica** **68**: 178-180.
- Müller, R.S.; Breitschütz, J.; Groning, R. 2004. Interactions between aqueous *Hypericum perforatum* extracts and drugs: *in vitro* studies. **Phytotherapy Research** **18**: 1019-1023.
- Nugroho, L.H.; Verberne, M.C.; Verpoorte, R. 2002. Activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in constitutively salicylic acid-producing tobacco plants. **Plant Physiology Biochemistry** **40**: 755-760.
- Ortmann, I.; Sumowski, G.; Bauknecht, H.; Moerschbacher, B. M. 2004. Establishment of a reliable protocol for the quantification of an oxidative burst in suspension-cultured wheat cells upon elicitation. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **64**: 227-232.
- Ozturk, A.; Unlukara, A.; Ipek, A.; Gurbuz, B. 2004. Effects of salt stress and water deficit on plant growth and essential oil content of lemon balm. **Pakistan Journal of Botany** **36** (4): 787-792.
- Pastírová, A.; Repčák, M.; Eliasová, A. 2004. Salicylic acid induces changes of coumarin metabolites in *Matricaria chamomilla* L. **Plant Science** **167**: 819-824.
- Peng, L. e Jiang, Y. 2006. Exogenous salicylic acid inhibits browning of fresh-cut Chinese water chestnut. **Food Chemistry** **94** (4): 535-540.
- Petersen, M. 1997. Cytochrome P450: dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*. **Phytochemistry** **45**: 1165-1172.
- Petersen, M. e Simmonds, M.S.J. 2003. Rosmarinic acid. **Phytochemistry** **62**: 121-125.
- Phillipson, J.D. 2001. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry** **56** (3): 237-243.
- Pitta-Alvarez, S.I.; Spollansky, T.C.; Giulietti, A.M. 2000. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. **Enzyme and Microbial Technology** **26**: 252-258.
- Plazek, A.; Hura, K.; Zur, I. 2005. Influence of chitosan, pectinase and fungal metabolites on activation of phenylpropanoid pathway and antioxidant activity in oilseed rape callus. **Acta Physiologia Plantarum** **27** (1): 95-102 .
- Puchooa, D. 2004. Biotechnology in Mauritius: current status and constraints. **Electronic Journal of Biotechnology** **7** (2): 104-114.

- Qin, W.M. e Lan, W.Z. 2004. Fungal elicitor-induced cell death in *Taxus chinensis* suspension cells is mediated by ethylene and polyamines. **Plant Science** **166**: 989-995.
- Randhir, R.; Shetty, P.; Shetty, K. 2002. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochemistry** **37**: 1247-1256.
- Ray, H. e Hammerschmidt, R. 1998. Responses of potato tuber to infection by *Fusarium sambucinum*. **Physiology and Molecular Plant Pathology** **53**: 81-92.
- Rice-Evans, C.A. e Packer, L. 2003. **Flavonoids in health and disease**. Marcel Dekker, Inc. New York. 468p.
- Riemenschneider, A.; Riedel, K.; Hoefgen, R.; Papenbrock, J.; Hesse, H. 2005. Impact of reduced *O*-acetylserine(thiol)lyase isoform contents on potato plant metabolism. **Plant Physiology** **137**: 892-900.
- Ryals, J.; Uknes, S.; Ward, E. 1994. Systemic Acquired Resistance. **Plant Physiology** **104**: 1109-1112.
- Salah, S.M. e Jäger, A.K. 2005. Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. **Journal of Ethnopharmacology** **97**: 145-149.
- Santos-Gomes, P.C.; Seabra, R.M.; Andrade, P.B.; Fernandes-Ferreira, M. 2002. Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). **Plant Science** **162**: 981-987.
- Schulz, V. 2002. **Fitoterapia Racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. Barueri. Ed. Manole. 386p.
- Serafini, L.A.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L. 2001. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba. Ed. Agropecuária. 463 p.
- Silano, M.; De Vincenzi, M.; De Vincenzi, A.; Silano, V. 2004. The new European legislation on traditional herbal medicines: main features and perspectives. **Fitoterapia** **75**: 107-116.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. 2000. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC. pp. 433-449.
- Singh, B. e Usha, K. 2003. Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. **Plant Growth Regulation** **39**: 137-141.

- Sirvent, T. e Gibson, D. 2002. Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. **Physiological and Molecular Plant Biology** **60**: 311-320.
- Shi, C.; Dai, Y.; Xia, B.; Xu, X.; Xie, Y.; Liu, Q. 2001. The purification and spectral properties of polyphenol oxidase I from *Nicotiana tabacum*. **Plant Molecular Biology Reporter** **19**: 318a-318h.
- Sokmen, M.; Angelovab, M.; Krumova, E.; Pashova, S.; Ivancheva, S.; Sokmen, A.; Serkedjieva, J. 2005. In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. **Life Sciences** **76**: 2981–2993.
- Staniszewska, I.; Królicka, A.; Malinski, E.; Lojkowska, E.; Szafranek, J. 2003. Elicitation of secondary metabolites in *in vitro* cultures of *Ammi majus* L. **Enzyme and Microbial Technology** **33**: 565-568.
- Sticher, L.; Mauch-Mani, B.; Métraux, J.P. 1997. Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology** **35**: 235-270.
- Taiz, L. e Zeiger, E. 2004. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre. Ed. Artmed. 719p.
- Takeda, H.; Tsuji, M.; Inazu, M.; Egashira, T.; Matsumiya, T. 2002. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. **European Journal of Pharmacology** **449**: 261-267.
- Tester, M. e Bacic, A. 2005. Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. **Plant Physiology** **137**: 791-793.
- Valero, E. e García-Carmona, F. 1992. Hysteresis and cooperative behavior of a latent plant polyphenoloxidase. **Plant Physiology** **98**: 774-776.
- Verpoorte, R. e Memelink, J. 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. **Current Opinion in Biotechnology** **13**: 181-187.
- Wang, H.; Provan, G.J.; Helliwell, K. 2004. Determination of rosmarinic and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. **Food Chemistry** **87**: 307-311.
- Wang, L. e Zhang, H. 2005. A theoretical study of the different radical-scavenging activities of catechin, quercetin, and a rationally designed planar catechin. **Bioorganic Chemistry** **33**: 108-115.
- Wachowicz, C.M. e Carvalho, R.I.N. 2002. **Fisiologia Vegetal: produção e pós-colheita**. Editora Champagnat: Curitiba, PR. 424p.
- Wilt, F.M. e Miller, G.C. 1992. Seasonal variation of coumarin and flavonoid concentrations in persistent leaves of wyoming big sagebrush (*Artemisia tridentata*

- ssp. wyomingensis* – Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology** **20** (1): 53-67.
- Yamamoto, H.; Inoue, K.; Yazaki, K. 2000. Caffeic acid oligomers in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. **Phytochemistry** **53**: 651-657.
- Yao, H. e Tian, S. 2005. Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. **Postharvest Biology and Technology** **35**: 253-262.
- Yu, L-J.; Lan, W-Z.; Qin, W-M.; Xu, H-B. 2001. Effects of salicylic acid on fungal elicitor-induced membrane-lipid peroxidation and taxol production in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. **Process Biochemistry** **37**: 477-482.
- Yunes, R.A. e Calixto, J.B. 2001. **Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó. Ed. Argos. 523 p.
- Yunes, R.A.; Pedrosa, R.C.; Cechinel Fº, V. 2001. Fármacos e Fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de Fitoterápicos e Fitofármacos no Brasil. **Química Nova** **24** (1): 147-152.
- Zheng, Z. e Shetty, K. 2000. Azo dye-mediated regulation of total phenolics and peroxidase activity in thyme (*Thymus vulgaris* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clonal lines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **48**: 932-937.



# CHANGES IN THE PHENYLPROPANOIDS METABOLISM OF *MELISSA OFFICINALIS* (L.) IN RESPONSE TO ELICITORS

Siomara Dias da Costa Lemos<sup>1\*</sup>; Lucas Macedo Félix<sup>1</sup>; Leandro Vieira Astarita<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Instituto de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (sidicole@ibest.com.br).*

**Changes in phenylpropanoids metabolism of *Melissa officinalis* (L.) in response to elicitors:** *Melissa officinalis* (lemon balm) has essential oils and polyphenols with reported biological activity. Micropropagation represents an important tool for the standardization and selection of elite plants. Production of secondary metabolites in plants depends on the biotic and abiotic conditions of the culture environment. Plants induced to produce specific biologically active compounds by exogenous molecules may have their nutraceutical value increased. The present work intended to micropropagate and evaluate the effect of salicylic acid and lysed phyto-bacteria suspension elicitors in polyphenols and flavonoids metabolism of *in vitro* shoots and envased plants of *M. officinalis*. Culture media supplemented with 2 mg.L<sup>-1</sup> benzyladenine (BA) and 0.2 mg.L<sup>-1</sup> naphthaleneacetic acid (NAA) or only 0.2 mg.L<sup>-1</sup> BA were the most efficient for shoot proliferation. The linear shoot growth was obtained in medium containing 2 mg.L<sup>-1</sup> NAA, while the highest rooting frequency and

root growth were obtained using 1 mg.L<sup>-1</sup> indolebutyric acid (IBA). In culture *in vitro*, elicitor salicylic acid (AS) induced transient increment of phenolic compounds and flavonoids. However, medium supplementation with lysed phyto-bacteria suspension reduced phenolic compounds levels and lead to development of thick roots and stems. The medium supplementation with elicitors promoted no significant changes in phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and the polyphenol oxidase (PPO) activity showed a transitory increase which coincided with the increase of phenolic compounds levels. No significant differences were observed in the PAL activity either along the time culture or among treatments used on envased plants. However, PPO activity changed when plants were sprayed with lysed bacteria suspension. In this treatment, necrose in the leaf edges occurred 24h after spraying. No significant differences were observed in the level of phenolic compounds and flavonoids in response to elicitors. However, the synthesis of these compounds was reduced in all envased plants after 10 and 20 days, which may be attributed to environmental changes.

**Keywords:** salicylic acid, *Erwinia carotovora*, phenylalanine ammonia-lyase, micropropagation, organogenesis, polyphenol oxidase.

## INTRODUCTION

Constituents of *Melissa officinalis* (L.) (lemon balm) have been used in the treatment of anxiety, epilepsy, reumatism pains and also are known for antispasmodic properties (Carnat et al. 1998; Mészáros et al. 1999; Lorenzi and Matos 2002; Ivanova et al. 2005; Salah and Jäger 2005). This plant has essential oils which are largely applied as food flavours (Gbolade and Lockwood 1989), as well as in the treatment of diseases (Sadraei et al. 2003). Besides the essential oils, *M. officinalis* is rich in

hydroxycinnamic acid derivatives and flavonoid derivatives, as rosmarinic acid and luteolin, respectively (Carnat et al. 1998; Janicsák et al. 1999). The high polyphenols contents in the leaves constitute the major biologically active fraction, presenting antispasmodic and antiinflammatory action (Carnat et al. 1998; Petersen and Simmonds 2003) and high antioxidant properties (Ivanova et al. 2005).

Polyphenols levels in plants change according to the biotic and abiotic conditions of the environment and depend on light type, phenological stage and presence of pathogens (Randhir et al. 2002). Pathogen attack may lead to production of specific secondary metabolites for defense, which might present biological properties (Pasternak et al. 2005), e.g. scopolamine in *Brugmansia candida* (Pitta-Alvarez et al. 2000), hypericin in *Hypericum perforatum* (Sirvent and Gibson 2002) and scopoletin in *Ammi majus* (Staniszewska et al. 2003). Elicitors of the secondary metabolism have been used to produce valuable compounds (Pasternak et al. 2005). Exogenous use of elicitors like salicylic acid enhanced synthesis of coumarins in *Matricaria chamomilla* (Pastírová et al. 2004). It is also known that elicitors may promote *Glycine max* growth (Gutiérrez-Coronado et al. 1998), reduce the activity of enzymes related to the synthesis of defense secondary metabolites in *Eleocharis tuberosa* (Peng and Jiang 2006) and promote phenylalanine ammonia-lyase activity in *Prunus avivum* (Yao and Tian 2005).

Since the amounts of compounds with biological activity differ significantly in each plant, the main goal of breeding is to select highly productive individuals and to propagate them vegetatively in order to maintain their valuable characteristics (Mészáros et al. 1999). *In vitro* regeneration of adventitious shoots can be an effective tool either for mass cloning of selected genotypes or to establish a model of metabolic pathway in order to enhance production of natural products and synthesis of novel materials (Capell and Christou 2004).

Aiming the synthesis of essential oils (Arikat et al. 2004) and antioxidant compounds (Santos-Gomes et al. 2002), micropropagation procedures have been applied to many species of the Lamiaceae family, like *Salvia officinalis* (Santos-Gomes et al. 2002); *Hedeoma multiflorum*, utilized in the folk medicine (Koroch et al. 1997) and *Mentha arvensis*, as a menthol source (Bhat et al. 2001). Optimization of *in vitro* culture conditions for *M. officinalis* has been reported by many authors (Tavares et al. 1996; Gbolade and Lockwood 1989; Mészáros et al. 1999), establishing efficient procedures for cells and multiple shoot cultures of this species.

Therefore, exposing *in vitro* cultures to elicitors may provide a tool to promote changes on secondary metabolism aiming to determine the necessary conditions to stimulate the production of specific groups of biologically active compounds (Pasternak et al. 2005).

The aim of the present work was to develop a micropropagation protocol for *Melissa officinalis* and evaluate the phenolic compounds and flavonoids content, and the enzymatic activities of phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase, induced by the elicitors salicylic acid and lysed phyto-bacteria suspension in *in vitro* shoots and envased plants.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Plant Material*

Nodal segments from 2 months old commercial *M. officinalis* were used as explants for the establishment of the *in vitro* cultures. Plants were maintained at the greenhouse until use as source of explants. Plants were watered as needed.

Explants desinfestation consisted of a pre-treatment of the plants, during three days, using the fungicide Benlate® (3 g.L<sup>-1</sup>). Following the pre-treatment, branches were collected and desinfested by immersion in NaOCl (0.5 % active chlorine) followed by Benlate® (3 g.L<sup>-1</sup>), being kept 10 minutes in each solution. After rinsed three times with sterilized water, nodal segments (1 cm long) were excised from the branches and placed in tubes with MS culture medium (Murashige and Skoog 1962), supplemented with 30 g.L<sup>-1</sup> sucrose and different cytokinin and auxin concentrations. With pH adjusted to 5.8 before autoclaving (1 atm, 15 minutes). After inoculation, explants were kept in the culture room at 16h photoperiod and 25 ± 2°C, under cool-white light (26 µmol. m<sup>2</sup>. s<sup>-1</sup>).

For the experiment of spraying, plants of *Melissa officinalis*, approximately 2 months old and about 20 cm height, were grown on plastic pots (4L) filled with a mixture of red loam:organic soil (1:2) during the spring season. Plants were maintained at the greenhouse under natural light and regular watering during the experiments.

### *Organogenesis*

Nodal segments (1 cm) were cultivated on MS medium supplemented with 0.2, 2, 3 or 4 mg.L<sup>-1</sup> benzyladenine (BA) and 0.2 mg.L<sup>-1</sup> naphthaleneacetic acid (NAA). This was denominated as induction phase. Culture medium without growth regulators was considered as control. Nodal segments were kept on induction medium for 30 days. Percentage, of shoot formation and length of formed shoots in each treatment were evaluated at this timepoint.

Shoots formed on induction phase were transferred to MS medium supplemented with 1 mg.L<sup>-1</sup> BA and 0.1 mg.L<sup>-1</sup> NAA, on multiplication phase. Experimental design was fully randomized with five replicates and two explants per replicate.

Shoots longer than 3 cm were transferred to MS culture medium supplemented with combinations among 0.5 mg.L<sup>-1</sup> BA, 1 mg.L<sup>-1</sup> NAA and 3 mg.L<sup>-1</sup> indolebutyric acid (IBA) to induce rooting. Melissa shoots were kept on this medium for 40 days. Number of roots formed, and root length were evaluated at the end of this period. Plantlets were then transferred to MS medium, without growth regulators, supplemented with 1% sucrose and 0.3 % activated charcoal. Rooted shoots were transferred to plastic pots covered with transparent plastic bags, containing a sterile mixture of soil : vermiculite (1:1). The plastic bags were used to ensure high humidity around the plants at the initial stage of growth and were daily opened along the acclimatization period. Cover was removed after 15 days. Survival of acclimatized plants was recorded as percentage after 30 days.

Experimental design was fully randomized with three replicates and nine shoots per replicate.

#### *Treatments with elicitors*

The biotic elicitor consisted of a suspension of lysed phyto-bacteria not compatible *Erwinia carotovora* spp. *atroseptica* pv. Potato, supplied by Dr. Valmir Duarte from the Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, UFRGS. Bacteria were cultivated in nutrient broth with 2% agar and 2 g.L<sup>-1</sup> soy tryptone.

Bacteria were lysed with chloroform, according to Rodriguez and Pfender (1997) and Langley et al. (2003), and subsequently exposed to ultraviolet light (UV) for 45 minutes. Cells were suspended in sterile saline solution (0.85%). Lysed bacterial suspension was centrifuged at 1,000g for 10 minutes, the supernatant was discarded and the precipitate was resuspended in saline solution. This procedure was repeated three times.

The optical density of the lysed bacterial suspension was adjusted to O.D.  $_{600\text{ nm}} = 0.3$  and added to the culture medium ( $2\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Inactivity of the bacteria was confirmed by culturing the bacterial suspension in nutrient broth. While salicylic acid (SA) solution was filter sterilized and supplemented to the culture medium, aerial parts of envased plants were sprayed with SA.

#### *Treatments in vitro with Elicitors*

Shoots used for the treatments with elicitors were selected from cultures previously micropropagated for six months on MS medium supplemented with  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA and  $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA. Treatments with elicitors consisted of MS medium growth regulators free and supplemented with  $100\text{ }\mu\text{M}$ ,  $500\text{ }\mu\text{M}$  of SA or  $2\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  of lysed bacteria suspension. No elicitors were added to the control treatment. Shoots were kept on these medium for 25 days. Activity of the enzymes phenylalanine ammonia-lyase (PAL; EC 4.3.1.5) and polyphenol oxidase (PPO; EC 1.10.3.2), as well as production and accumulation of phenolic compounds and flavonoids, were analysed at 0, 2, 10, 15, 20 e 25 days. Experimental design was fully randomized with three replicates and two shoots per replicate.

Aerial parts of envased plants were sprayed with lysed bacteria suspension and salicylic acid solutions ( $500$  and  $1,000\text{ }\mu\text{M}$  SA). Plants from the control treatment were sprayed with distilled water. Surfactant Agral™ was used at  $0.1\%$  in aspersion solutions and the soil was isolated with plastic film along the spraying.

Only one aspersion was conducted in each envased plant, and the activities of the enzymes PAL and PPO were evaluated, as well as leaf content of polyphenols at 0, 1, 2, 5, 10 and 20 days after spraying. Experimental design was fully randomized with three replicates and two plants per replicate.

### *Quercetin Derivates*

Fresh leaves (1g) were extracted with methanol 80 %, followed by filtration and centrifugation at 1,000g for 10 min.

Flavonoid content from different fractions was determined using a colorimetric assay (Maia 1997; Park et al. 1998). A known volume (100  $\mu$ L) of extract was added to  $\text{AlNO}_3$  (10%) and  $\text{CH}_3\text{COOK}$  1 M. Absorbance was read at 415 nm against the blank (methanol 80%) and flavonoid content was calculated using a standard calibration curve established with quercetin. Flavonoid content was expressed as  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  of fresh weight.

### *Total Phenolics*

Total phenolics were measured using Folin-Ciocalteu reagent. A known volume (250  $\mu$ L) of extract was oxidized with Folin-Ciocalteu and the reaction neutralized with  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20 % w/v). Reaction was vortexed and incubated at 25<sup>0</sup>C on darkness for 30 min. Absorbance was measured at 765 nm against blank (methanol 80 %). Phenolics contents were calculated using a standard calibration curve established with galic acid. Phenolic was expressed as  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  of fresh weight.

### *PAL activity*

Fresh leaves were grounded at 4<sup>0</sup>C in 25 mM sodium borate buffer, pH 8.8, containing 1.4 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 5 % (w/v) polyvinyl pirrolidone and 500 mM ascorbic acid. Homogenate was filtered and centrifuged at 1,000g for 30 min at 5<sup>0</sup>C. Supernatant was used for enzymatic assay. Protein content was determined according to the method of Bradford (Bradford 1976), with bovine serum albumine as standard.

PAL activity was determined by measuring the increase of absorbance (290 nm) due to the formation of cinnamic acid over a period of 60 min at 37<sup>0</sup>C. The reaction



mixture consisted of 25 mM sodium borate buffer, pH 8.8, containing 300  $\mu$ M L-phenylalanine (Camacho-Cristóbal et al. 2002). A sample without L-phenylalanine was used as a blank. The activity was expressed as  $\mu$ M cinnamic acid formed per min per mg of protein.

#### *PPO activity*

Fresh leaves were grounded at 4<sup>0</sup>C in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 2 % Triton X-100 (v/v). Homogenate was filtered and centrifuged at 1,000g for 30 min at 5<sup>0</sup>C. Supernatante was used for enzymatic assay. Protein content was measured by the method of Bradford (Bradford 1976), with bovine albumine as standard.

PPO activity was determined in spectrophotometer (370 nm) from a reaction mixture containing 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, and 1 mM caffeic acid. A sample without caffeic acid was used as blank, and the reaction which was maintained at 30<sup>0</sup>C for 30 min.

The increase in absorbance ( $\Delta$ Abs) was used to determine the PPO activity. The enzyme activity unit was defined as the change in  $\Delta$ Abs per min per mg protein extracted.

#### *Statistical analysis*

Phenolics and flavonoids contents and enzymes activities were analysed by one-way ANOVA ( $p \leq 0.05$ ). Means were separated using Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). When necessary, data were transformed by  $\sqrt{x+0.5}$  or arc-sen  $\sqrt{x}/100$  in order to homogeneity of variances.

## RESULTS

### *Organogenesis*

All explants produced shoots on induction medium. Although the highest organogenic frequency was obtained when explants were cultivated either on BA ( $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) and NAA used individually or in combination of both regulators (Table 1). When the level of BA was increased in the presence of NAA, a decrease in shoot formation was observed (ranging from 100 to 33.3 %).

Addition of either  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  BA +  $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$  NAA or  $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$  BA alone, resulted in the highest responses for shoots formation per explant (3.1 and 3.8 shoots, respectively) (Table 1). However, concentrations higher than  $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$  BA induced morphological abnormalities (vitrification) in shoots, regardless of NAA concentration (Figure 1A). In the lowest cytokinin concentration ( $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$ ), shoots showed the characteristic healthy aspect of the mature plant (Figure 1B). When vitrified shoots were transferred to MS medium without growth regulators, normal growth was recovered after 30 days.

Longest shoots (4.3 cm length) were observed on medium supplemented with  $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$  NAA (Table 1). However, culture medium without growth regulators or supplemented with  $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$  BA + NAA also promoted shoot elongation (2.7 cm).

The analysis of root formation and growth showed that highest number (13.11 roots per shoot) and length (2.57 cm) of roots were obtained in the medium supplemented with  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  IBA (Figures 1C; 2 and 3). On the other hand, the highest IBA concentrations ( $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) inhibited both rhizogenesis and rooting growth (Figures 2 and 3). Rooting rate was not different for shoots placed on MS supplemented with NAA or IBA when these regulators were combined with BA (ranging from 4.56 to 7.56 roots per shoot) (Figure 2 and 3). When three months-old shoots were cultivated onto

medium without growth regulators, they showed the ability to root and increase in length.

Plants from the best rooting treatments were transferred to plastic pots covered with plastic bags containing a sterile mixture of soil:vermiculite (1:1). When established *ex vitro*, 100% of plantlets from treatments with 1 mg.L<sup>-1</sup> IBA and BA + IBA survived (Figure 1D), against only 50% of plantlets rooted in presence of BA + NAA, regardless the concentration used.

#### *Elicitors activity*

Salicylic acid and lysed bacteria suspension were not efficient as elicitors to increase the polyphenols and flavonoids contents in both *in vitro* shoots (Figure 4 and Table 2) and envased plants (Tables 3 and 4).

#### *Phenylpropanoids - production and accumulation*

Treatment supplemented with lysed bacteria suspension showed no significant change in phenolic compounds (PC) content, whose production did not change during cultivation period, when compared to the control (Figure 4).

Inoculation of shoots in fresh medium caused drastic reduction in PC levels in all treatments, except in the bacteria suspension (Figure 4). In the treatment with 100 μM SA, after this initial reduction (reaching 1.67 mg.g<sup>-1</sup> FW), PC levels raised to 11.68 and 12.45 mg.g<sup>-1</sup> FW at 10 and 20 days, respectively. After this period, no significant variation was observed.

Treatment with lysed bacteria showed a different response in PC content when compared with others treatments (Figure 4). Bacteria suspension did not reduce the PC

level at the day two. However, it promoted a slow increasing in PC content along the culture time.

Significant and transient increase in flavonoids content was observed either on the treatment with 100  $\mu\text{M}$  SA (1,92  $\text{mg.g}^{-1}$  FW) after 10 days or with 500  $\mu\text{M}$  SA (1.83  $\text{mg.g}^{-1}$  FW) after 20 days in culture. Generally, treatments with SA or lysed bacteria had no effect on flavonoids synthesis along cultivation (Table 2).

Content of PC in envased plants did not vary significantly among the tested treatments (Table 3). However, drastic reduction in the levels of these compounds was observed 10 days after the aspersion in all treatments, ranging from 70.24 at day 2 to 15.4  $\text{mg.g}^{-1}$  FW at day 20. These differences could be attributed to changes on temperature at the greenhouse.

Nevertheless, flavonoids content from envased plants decreased 10 days after spraying in all treatments (Table 4), changing from 2.93 at day 0 to 0.52  $\text{mg.g}^{-1}$  FW at day 20. No significant differences were observed among the treatments.

#### *Phenylpropanoids and related enzymes*

No significant differences were observed in PAL activity during *in vitro* cultivation time or among the treatments with different elicitors (Table 5), ranging from 0.35 at the day zero to 0.74  $\text{mg.g}^{-1}$  FW at day 25. Nevertheless, PPO activity from *in vitro* shoots varied significantly, showing a transient peak at 10 days in treatment with 100  $\mu\text{M}$  SA (0,0103  $\Delta\text{abs.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  protein) (Table 6). Addition of 500  $\mu\text{M}$  SA to culture medium leads to reduction in PPO activity in the shoots after 20 days in the culture (from 0.0083 at the day 15 to 0.0033  $\Delta\text{Abs.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  protein at day 20).

In the envased plants, salicylic acid at 500  $\mu\text{M}$  promoted a transient elevation of PAL activity (0,4228  $\mu\text{Mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  protein) 24 hours after spraying (Table 7), but

the highest activity ( $0,4530 \mu\text{Mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein) was observed 20 days after aspersion with  $1,000 \mu\text{M}$  SA. Spraying with bacteria suspension resulted in no significant changes in PAL activity, as compared to the other treatments. However, 24 hours after aspersion with bacterial suspension necrose in leaf edges appeared (Figure 5).

The sprayed treatments did not promote significative change in PPO activity among treatments (Table 8), ranging from  $0.018$  to  $0.029 \Delta\text{Abs}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein.

Althought SA and lysed bacteria suspension were not efficient as elicitors to increase the phenolic pathway; they induced the highest rooting frequency in shoots cultivated on medium supplemented with elicitors and without any growth regulators (Table 9). The addition of bacterial suspension resulted in the highest rooting frequency reaching average of 24.3 roots per shoot, approximately twice as much as shoots treated with  $100 \mu\text{M}$  SA.

Rooted shoots from the medium with bacterial suspension showed morphological abnormalities, with branches and roots thicker than in treatments with SA, but without vitrification morphology. One year-old shoots cultured on medium without elicitors and growth regulators were not able to form roots.

## **DISCUSSION**

### *Organogenesis*

Results suggest a close relation between the number of shoots formed and the concentration of BA, regardless the presence of auxin. Lemon balm explants showed higher regeneration in presence of either  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA or  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA combined with  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA. BA and NAA are known to be effective phyto regulators in nodal

segments and leaves cultures of lemon balm (Mészáros et al. 1999) and many medicinal plants as *Mentha arvensis* (Bhat et al. 2001), *Pueraria lobata* (Thiem 2003) and the *Salvia fruticosa* (Arikat et al. 2004).

Faisal and Anis (2005) reported that low BA concentrations increase shoot regeneration in *Tylophora indica*. The same has been reported by Koroch et al. (1997) in *Hedeoma multiflorum* (*Lamiaceae*), showing that increasing BA concentration lead to reduction of shoot elongation. In lemon balm, Mészáros et al. (1999) described significant increase in the number of shoots promoted by BA concentrations higher than  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ . However, Misra and Chaturvedi (1984) observed that the concentration of  $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$  BA resulted in the formation of approximately 6.8 shoots per explant in *Rosmarinus officinalis*, while Santos-Gomes et al. (2002) obtained shoot proliferation and growth in *Salvia officinalis* with  $1.5 \text{ mg.L}^{-1}$  BA.

Lemon balm shoots formed on medium supplemented with combination of  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  BA +  $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$  NAA showed vitreous aspect. Vitrification is a morphological, anatomical and physiological malformation which has been correlated to water availability, microelements and/or hormonal imbalance in the tissue culture medium (Ueno and Shetty 1997; Lai et al. 2005). Ibáñez et al. (2003) observed that increasing BA concentration in culture of *Vitis vinifera* resulted in 100% vitrified shoots. In *Dianthus caryophyllus*,  $0.05 \text{ mg.L}^{-1}$  BA inhibited vitrification (Cuzzuol et al. 1995), while medium without BA was recommended to obtain healthy, vigorous and non-vitrified plants in *Maranta leuconeura* (Ebrahim and Ibrahim 2000). Normal morphology of vitrified shoots of *M. officinalis* was recovered when they were transferred to medium without growth regulators.

Shoot length was affected by the presence of NAA ( $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Moura et al. (2001) reported that NAA promoted shoot elongation and high rooting (80%) in *Citrus*.

According to Thiem (2003), *Pueraria lobata* shoots rooted with NAA were thicker and shorter, without branches, and had reduced capacity to survive when transferred to soil with vermiculite (1:1). Lemon balm shoots rooted with IBA exhibited higher acclimatization percentage (100%) the presence of BA, compared to those rooted with NAA and BA (50%).

Besides NAA, IBA is largely used to induce adventitious roots because of its effect on inhibiting ethylene synthesis, which inhibits longitudinal growth of plant (Peres and Kerbauy 2000). In lemon balm, the highest rooting rate (13.1 roots) has been obtained in medium supplemented with 1 mg.L<sup>-1</sup> IBA. Caruso et al (2000), working with *Rosmarinus officinalis*, used 3 mg.L<sup>-1</sup> IBA to increase rooting in callus, while Jabbarzadeh and Khosh-Khui (2005) applied 2.5 to 3 mg.L<sup>-1</sup> IBA for root proliferation of *Rosa damascena*.

Explants cultivated for a long period in presence of BA show inhibition of shoot elongation, leaf expansion and rooting, along with increased vitrification (Arigita et al. 2005). In this study, similar effect has been observed in lemon balm where one year-old shoots had lost the capacity of rooting on medium without growth regulators. On the other hand, three month-old shoots were able to root even in absence of growth regulators. Ibáñez et al. (2003) observed that after multiple subcultures the plants maintained *in vitro* lack the capacity of shooting. General decrease in proliferation rate after first subculture and continuous subcultures has been observed in *Rosa damascena* (Jabbarzadeh and Khosh-Khui 2005).

Culture medium supplemented with salicylic acid at 100 µM promoted transient increase of PC levels and PPO activity after 10 days. These may be related to the stress caused by SA, characterizing a defense response associated to pathogen attacks, which

promote quinones formation through the oxidation of phenols by PPO (Mazzafera and Robinson 2000).

Envased plants sprayed with 500  $\mu\text{M}$  AS showed an induction of PAL activity 24 hours after aspersion, the same occurring at day 20 of treatment with 1,000  $\mu\text{M}$  SA. Exogenous utilization of SA in *Matricaria chamomilla* and *Pisum sativum* induced resistance to diseases by raising PC levels (Mazzafera and Robinson 2000; McCue et al. 2000), which are the intermediary pathway to flavonoid synthesis. Sirvent and Gibson (2002) reported that SA led to growth and biomass decrease in *Hypericum perforatum*, while promoted the synthesis of hypericins and hyperforin. Chen and Chen (2000) reported inhibition of the synthesis of some PC, as rosmarinic acid in *Salvia miltiorrhiza* cultured *in vitro* in the presence of fungal elicitors.

Peng and Jiang (2006) and Campos et al. (2003) reported increase in PAL activity in *Eleocharis tuberosa* and *Phaseolus vulgaris*, respectively, following exogenous use of SA. According to Yao and Tian (2005), SA induces responses of defense, protection and resistance in plants and it is also involved in signal transduction systems that induce synthesis of defense specific compounds. The increase of PAL activity, an enzyme related to the synthesis of phenylpropanoids (Pastírová et al. 2004), may be related to the inhibition of the stress caused by SA (Yao and Tian 2005; Peng and Jiang 2006). This kind of response suggests that exogenous SA could work as a stress signal in *M. officinalis*.

Rooting was higher (24.3 roots) in shoots cultured for one year and treated with bacterial suspension than in three month-old shoots treated with 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA (13.1 roots). These responses may be related to natural production and accumulation of ethylene in the culture vessel (Dietrich et al. 2005) or due to ethylene synthesis is up-regulated by biotic and abiotic stress (Cao et al. 2006). Pasternak et al. (2005) working



with *Arabidopsis thaliana*, reported that many hormones, like ethylene, are related to cell elongation and reorientation of vegetal growth, playing a key role in primary and lateral roots formation. On the other hand, oxidative stress may be involved in morphological abnormalities observed on rooted shoots from the culture medium supplemented with bacterial suspension. Oxidative metabolism promotes hydrogen peroxide production, which is a substrate to peroxidase (Malassiotis et al. 2004). Furthermore, the necrose in leaf edges, observed 24 hours after aspersion of envased plants with bacteria suspension, reinforce an oxidative response of *M. officinalis*. This effect was not studied in this work. Treatment with lysed bacteria suspension has not changed PC content in shoots. Low PC concentrations and intense formation of thick branches and roots suggest the deviation of these compounds to the thickening of cell walls.

Reduction of PC content on envased plants occurred in every treatment 10 days after aspersion. Biosynthesis of secondary metabolites is tightly related to environmental conditions, which are therefore able to alter synthesis and degradation pathways, as well as gene expression (Wilt and Miller 1992; Badi et al. 2004). Plants used in this work were subjected to sudden temperature variation after the 5<sup>th</sup> day from aspersion, which was reflected in the analysis done by day 10 and 20. During this period, ambient temperature raised over 35°C, incurring in hydric stress. It is likely that under such severe environmental conditions which the plants were exposed to, changes in metabolism occurred, resulting in the responses observed.

Environmental conditions affect growth as well as quantity and quality of secondary metabolites produced (Badi et al. 2004). Areias et al. (2000), working with *Salvia officinalis*, observed that season and temperature affected the quality of the

essential oils. According to Atienza et al. (2004), environmental conditions, such as high temperatures, are considered the most stressing situation to plants.

PPO activity showed no significant change on envased plants, while PAL activity decreased ( $0,1941 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein), what is related to the low synthesis of flavonoids. Abenthum et al. (1995) reported that the bacterium *E. carotovora* may cause severe hypersensitivity responses, with oxidative burst in various parts of the plant, and this effect was more significative in *Solanum tuberosum*.

It is extremely difficult to compare quantities of compounds produced in cultivated cells or tissues with quantities produced by envased plants, since some metabolites are commonly synthetized in one tissue and transported to others, where they are accumulated. Despite this limitation, there are advantages in using tissue culture for studing plant metabolism and interaction plant-pathogen, such as a more controlled environment, with reduction of external disturbs, and a smaller experimental area and amount of biological material.

## REFERENCES

- Abenthum K, Hildenbrand S, Ninnemann H (1995) Elicitation and accumulation of phytoalexin in stems, stolons and roots of *Erwinia*-infected potato plants. *Physiol. Mol. Plant Path.* 46: 349-359.
- Atienza SG, Faccioli P, Perrotta G, Dalfino G, Zschiesche W, Humbeck K, Stanca MA, Cattivelli L (2004) Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions. *Plant Sci.* 167: 1359-1365.

- Areias F, Valentão P, Andrade PB, Ferreres F, Seabra RM (2000) Flavonoids and phenolic acids of sage: Influence of some agricultural factors. *J. Agric. Food Chem.* 48: 6081-6084.
- Arigita L, Fernández B, Gonzáles A, Tamés RS (2005) Effect of the application of benzyladenine pulse on organogenesis, acclimatisation and endogenous phytohormone content in kiwi explants cultured under autotrophic conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 43: 161-167.
- Arikat NA, Jawad FM, Karam NA, Shibli RA (2004) Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). *Sci. Hortic.* 100: 193-202.
- Badi HN, Yazdani D, Ali SM, Nazari F (2004) Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Ind. Crops Products* 19: 231-236.
- Bhat S, Gupta SK, Tuli R, Khanuja SPS, Sharma S, Bagchi GD, Kumar A, Kumar S (2001) Photoregulation of adventitious and axillary shoot proliferation in menthol mint, *Mentha arvensis*. *Curr. Sci.* 80 (7): 878-880.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Camacho-Cristóbal JJ, Anzellotti D, Gonzalez-Fontes A (2002) Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency. *Plant Physiol. Biochem.* 6: 997-1002.
- Campos AD, Ferreira AG, Hampe MMV, Antunes IF, Brancão N, Silveira EP, Silva JB, Osório VA (2003) Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase

- by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. Braz. J. Plant Physiol. 15: 129-134.
- Capell T, Christou P (2004) Progress in plant metabolic engineering. Curr. Opin. Biotechnol. 15:148–154.
- Carnat AP, Carnat A, Fraisse D, Lamaison JL (1998) The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. Pharmaceutica Acta Helvetiae 72: 301-305.
- Caruso JL, Callahan J, DeChant C, Jayasimhulu K, Winget GD (2000) Carnosic acid in green callus and regenerated shoots of *Rosmarinus officinalis*. Plant Cell Rep. 19: 500-503.
- Chen H, Chen F (2000) Effects of yeast elicitor on the grown and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture. Process Biochem. 35: 837-840.
- Cao Y, Songa F, Goodman RM, Zheng Z (2006) Molecular characterization of four rice genes encoding ethylene-responsive transcriptional factors and their expressions in response to biotic and abiotic stress. J. Plant Physiol. (IN PRESS)
- Cuzzuol GRF, Gallo LA, Almeida M, Crocomo OJ (1995) Controle da vitrificação do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. Sci. Agric. 52: 604-614.
- Dietrich R, Ploss K, Heil M (2005) Growth responses and fitness costs after induction of pathogen resistance depend on environmental conditions. Plant Cell Environ. 28: 211-222.
- Ebrahim MKH, Ibrahim IA (2000) Influence of medium solidification and pH value on *in vitro* propagation of *Maranta leuconeura* cv. Kerchoviana. Sci. Horticulturae 86: 211-221.

- Faisal M, Anis M (2005) An efficient *in vitro* method for mass propagation of *Tylophora indica*. Biol. Plant. 49 (2): 257-260.
- Gbolade AA, Lockwood G (1989) The constituents of *Melissa officinalis* cell cultures. Planta Med. 55: 228.
- Gutiérrez-Conrado MA, Trejo-Lopes C, Larque-Saavedra A (1998) Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. Plant Physiol. Biochem. 36 (8): 563-565.
- Ibáñez A, Valero M, Morte A (2003) Influence of cytokinins and subculturing on proliferation capacity of single-axillary-bud microcuttings of *Vitis vinifera* L. cv. Napoleón. Anales Biol. 25: 81-90.
- Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Yankova T (2005) Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. J. Ethnopharmacol. 96: 145–150.
- Jabbarzadeh Z, Khosh-Khui M (2005) Factors affecting tissue culture of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.). Sci. Horticulturae 105: 475-482.
- Janicsák G, Mathé I, Miklóssy-Vári V, Blunden G (1999) Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species. Biochem. Systemat. Ecol. 27: 733-738.
- Koroch AR, Juliani Jr. HR, Juliani HR, Trippi VS (1997) Micropropagation and acclimatization of *Hedeoma multiflorum*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 48: 213-217.
- Lai C-C, Lin H-M, Nalawade SM, Fang W, Tsay H-S (2005) Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. J. Plant Physiol. 162: 355-361.
- Langley R, Kenna DT, Vandamme P, Ure R, Govan JRW (2003) Lysogeny and bacteriophage host range within the Burkholderia cepacia complex. J. Medic. Microbiol. 52: 483–490.

- Lorenzi H, Matos FJA (2002) Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP.
- Maia ABRA (1997) Isolamento e caracterização de princípios ativos em própolis e produtos. Relatório Técnico. RHAE-BIOMINAS, Belo Horizonte.
- Malassiotis AN, Dimassi K, Diamantidis G, Therios I (2004) Changes in peroxidase and catalases activity during *in vitro* rooting. Biol. Plant. 48: 1-5.
- Mazzafera P, Robinson SP (2000) Characterization of polyphenol oxidase in coffee. Phytochem. 55: 285-296.
- McCue P, Zuoxing Z, Pinkham JL, Shetty K (2000) A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments. Process Biochem. 35: 603-613.
- Mészáros A, Bellon A, Pintér E, Horváth G (1999) Micropropagation of lemon balm. Plant Cell Tissue Organ Cult. 57: 149-152.
- Misra P, Chaturvedi HC (1984) Micropropagation of *Rosmarinus officinalis*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 3: 163-168.
- Moura TL, Almeida WAB, Madalena B, Mendes J, Mourão Filho FAZ (2001) Organogênese *in vitro* de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. Rev. Bras. Fruticult. 23 (2): 240-245.
- Murashige T, Skoog FA (1962) A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473-497.
- Park YK, Ikegaki M, Abreu JAS, Alcici F (1998) Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. Ciênc. Tecnol. Aliment. 18 (3): 313-318.
- Pasternak T, Rudas V, Potters G, Jansen MAK (2005) Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Environ. Exp.Bot. 53 (3): 299-314.

- Pastírová A, Repčák M, Eliasová A (2004) Salicylic acid induces changes of coumarin metabolites in *Matricaria chamomilla* L. *Plant Sci.* 167: 819-824.
- Peng L, Jiang Y (2006) Exogenous salicylic acid inhibits browning of fresh-cut Chinese water chestnut. *Food Chem.* 94 (4): 535-540.
- Peres LEP, Kerbauy GB (2000) Controle hormonal do desenvolvimento das raízes. *Universa* 8: 181-195.
- Petersen M, Simmonds MSJ (2003) Rosmarinic acid. *Phytochem.* 62: 121-125.
- Pitta-Alvarez SI, Spollansky TC, Giulietti AM (2000) The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enz. Microb. Technol.* 26: 252-258.
- Randhir R, Shetty P, Shetty K (2002) L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochem.* 37: 1247-1256.
- Rodriguez F, Pfender WF (1997) Antibiosis and Antagonism of *Sclerotinia homoeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 In Vitro and In Planta. *Phytopathol.* 87 (6): 614-621.
- Sadraei H, Ghannadi A, Malekshahi K (2003) Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions *Fitoterapia* 74: 445-452.
- Salah SM, Jäger AK (2005) Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J. Ethnopharmacol.* 97: 145-149.
- Santos-Gomes PC, Seabra RM, Andrade PB, Fernandes-Ferreira M (2002) Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Sci.* 162: 981-987.

- Sirvent T, Gibson D (2002) Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. *Physiological and Molecular Plant Biol.* 60: 311-320.
- Staniszewska I, Królicka A, Malinski E, Lojkowska E, Szafranek J (2003) Elicitation of secondary metabolites in *in vitro* cultures of *Ammi majus* L. *Enz. Microb. Technol.* 33: 565-568.
- Tavares AC, Pimenta MC, Goncalves MT (1996) Micropropagation of *Melissa officinalis* L. through proliferation of axillary shoots. *Plant Cell Rep.* 15: 441-444
- Thiem B (2003) *In vitro* propagation of isoflavone-producing *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *Plant Sci.* 165: 1123-1128.
- Ueno K-I, Shetty K (1997) Effect of selected polysaccharide-producing soil bacteria on hyperhydricity control in oregano tissue cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 767-770.
- Wilt FM, Miller GC (1992) Seasonal variation of coumarin and flavonoid concentrations in persistent leaves of wyoming big sagebrush (*Artemisia tridentata* ssp. *wyomingensis* – Asteraceae). *Biochem. Systemat. Ecol.* 20 (1): 53-67.
- Yao H, Tian S (2005) Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. *Postharvest Biol. Technol.* 35: 253-262.



**Figure 1.** Organogenesis of *M. officinalis*. (A) adventitious shoots on MS medium supplemented with 2 mg.L<sup>-1</sup> BA + 0.2 mg.L<sup>-1</sup> NAA showing vitrification (Bar represents 2.4 cm); (B) healthy shoots on medium supplemented with 0.2 mg.L<sup>-1</sup> BA (Bar represents 2.4 cm); (C) rooted plants on medium supplemented with 1 mg.L<sup>-1</sup> IBA (Bar represents 1.3 cm); (D) acclimatization of plants from treatment with 1 mg.L<sup>-1</sup> IBA (Bar represents 0.42 cm).

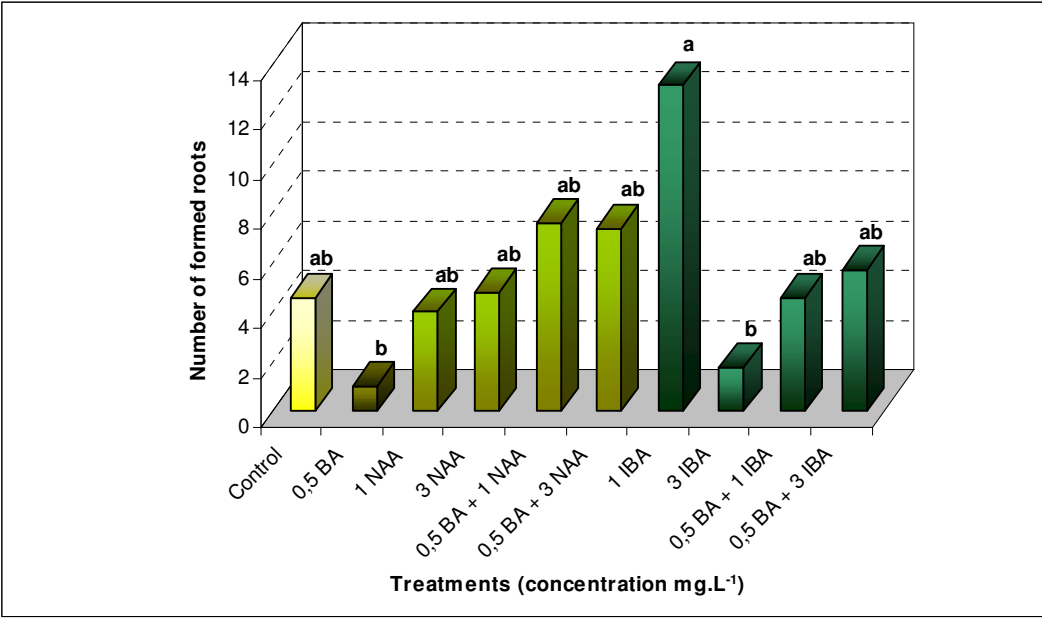


**Table 1.** Shoot formation on nodal segments of *M. officinalis* cultured on different types and concentrations of growth regulators for 30 days. BA, benzyladenine; NAA, naphthaleneacetic acid.

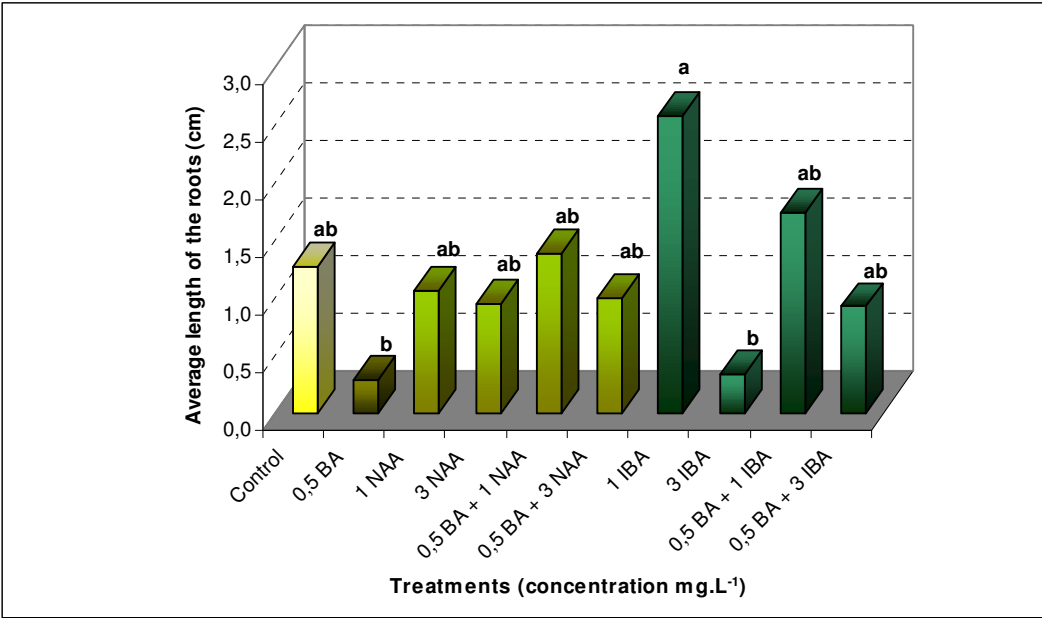
<b>Growth regulators (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Explants formed shoots<sup>1</sup> (%)</b>	<b>Number of formed shoots<sup>2</sup></b>	<b>Shoot length<sup>2</sup> (cm)</b>
<b>No regulators</b>	83.3 ab*	1.6 ab	2.7 ab
<b>0.2 BA</b>	100.0 a	3.1 a	1.9 bc
<b>2.0 BA</b>	80.0 ab	2.8 ab	1.0 cd
<b>3.0 BA</b>	16.6 c	1.5 ab	0.5 cd
<b>4.0 BA</b>	80.0 ab	2.0 ab	1.4 bc
<b>0.2 NAA</b>	100.0 a	1.8 ab	4.3 a
<b>0.2 BA + 0.2 NAA</b>	100.0 a	2.0 ab	2.7 ab
<b>2.0 BA + 0.2 NAA</b>	90.0 ab	3.8 a	1.3 bc
<b>3.0 BA + 0.2 NAA</b>	50.0 abc	1.6 ab	0.7 cd
<b>4.0 BA + 0.2 NAA</b>	33.3 bc	0.3 b	0.1 cd

\* Means within a column followed by the same letters are not different according to Tukey's test at the probability level  $p \leq 0.05$ . Data was transformed by <sup>(1)</sup>arc-sen and <sup>(2)</sup>square root.

**Figure 2.** Shoots of *M. officinalis* cultivated for 40 days in different rooting treatments with growth regulators. BA, benzyladenine; NAA, naphthaleneacetic acid; IBA, indolebutyric acid. Means followed by the same letters are not different according to Tukey's test at the probability level  $p \leq 0.05$ . Data was transformed by square root.

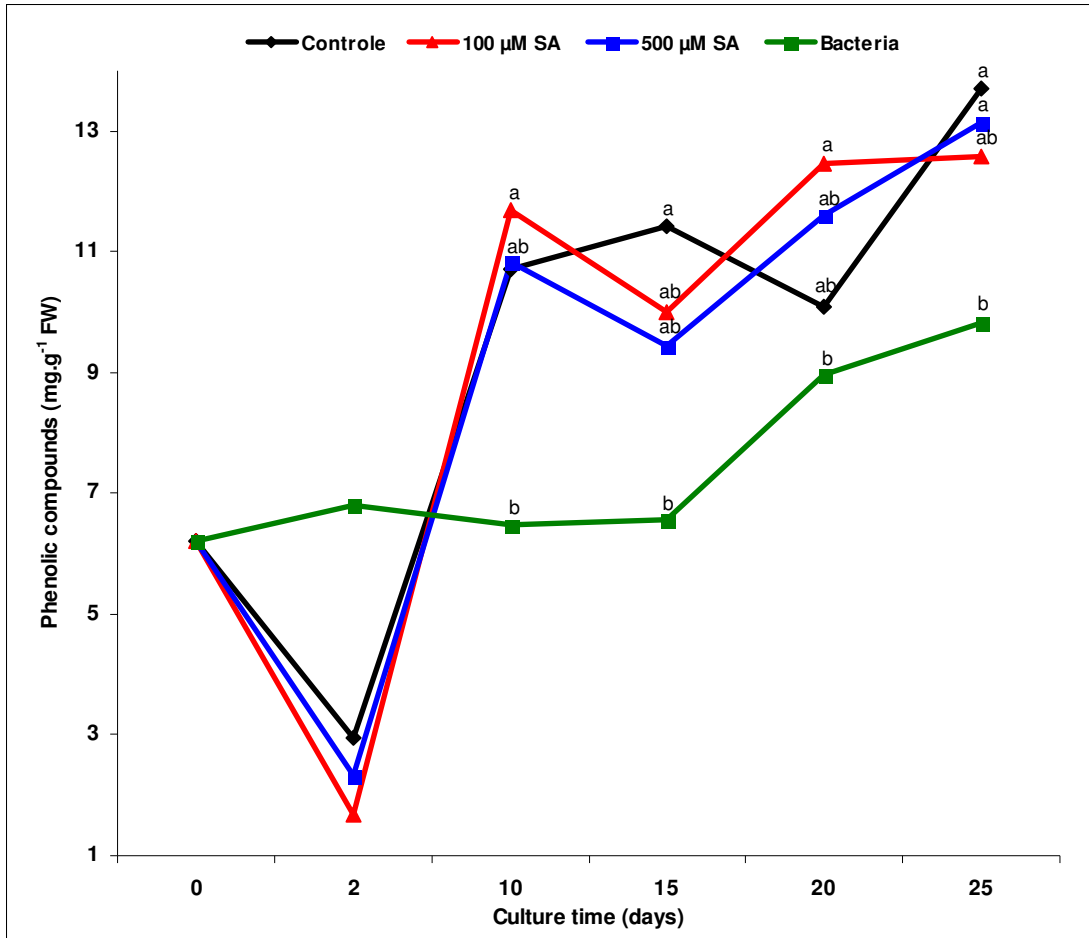


**Figure 3.** Root length of *M. officinalis* induced from shoots cultivated 40 days on different growth regulators. Means followed by the same letters are not different according to Tukey's test at the probability level  $p \leq 0.05$ . Data was transformed by square root.



**Figure 4.** Phenolic compounds content in *M. officinalis* shoot cultivated *in vitro* under different treatments with salicylic acid (SA) and lysed bacteria suspension (*E. carotovora*). Means followed by the same letters within the evaluated time points are not different according to Tukey's test at the probability level  $p \leq 0.05$ . Data was transformed by square root.





**Table 2.** Flavonoids content ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  FW) in shoots of *M. officinalis* cultivated on medium supplemented with salicylic acid (SA) and lysed bacteria suspension (*E. carotovora*).

Treatments	Days					
	0	2	10	15	20	25
<b>Control</b>	0,68 aB*	1,95 aA	1,33 aAB	1,28 aAB	1,18 abAB	1,53 aAB
<b>100 <math>\mu\text{M}</math> SA</b>	0,68 aB	1,20 aAB	1,92 aA	1,28 aAB	1,33 abAB	1,79 aA
<b>500 <math>\mu\text{M}</math> SA</b>	0,68 aA	0,95 aA	1,47 aA	1,25 aA	1,83 aA	1,76 aA
<b>Bacteria</b>	0,68 aA	1,22 aA	0,79 aA	0,66 aA	0,77 bA	0,87 aA

\* Means followed by the same capital letters in line or the same small letters in column are not different according to Tukey's test at the probability level  $p \leq 0.05$ . Data was transformed by square root.

**Table 3.** Phenolic compounds levels (mg.g<sup>-1</sup> FW) in envased plants of *M. officinalis* sprayed with salicylic acid (SA) and lysed bacteria suspension (*E. carotovora*).

Treatments	Days					
	0	1	2	5	10	20
<b>Control</b>	70.08 aA*	66.18 aA	70.24 aA	68.24 aA	18.68 aB	16.99 aB
<b>500 µM SA</b>	70.08 aA	60.82 aA	62.25 aA	59.23 aA	19.18 aB	15.40 aB
<b>1000 µM SA</b>	70.08 aA	66.45 aA	61.10 aA	49.60 aA	22.47 aB	17.15 aB
<b>Bacteria</b>	70.08 aA	43.24 aA	64.00 aA	51.73 aA	15.71 aB	15.79 aB

\* Means followed by the same capital letters in line or the same small letters in column are not different according to Tukey's test at the probability level  $p \leq 0.05$ . Data was transformed by square root.

**Table 4.** Flavonoids content (mg.g<sup>-1</sup> FW) in envased plants of *M. officinalis* sprayed with salicylic acid (SA) and lysed bacteria suspension (*E. carotovora*).

Treatments	Days					
	0	1	2	5	10	20
<b>Control</b>	2.93 aA*	2.51 aA	2.44 aA	1.88 aAB	0.67 aBC	0.52 aC
<b>500 µM SA</b>	2.93 aA	1.79 aAB	2.03 aA	1.78 aAB	0.58 aB	0.53 aB
<b>1000 µM SA</b>	2.93 aA	2.81 aA	2.08 aAB	1.29 aAB	0.63 aB	0.69 aB
<b>Bacteria</b>	2.93 aA	1.09 aB	1.39 aAB	1.37 aAB	0.66 aB	0.62 aB

\* Means followed by the same capital letters in line or the same small letters in column are not different according to Tukey's test at the probability level  $p \leq 0.05$ . Data was transformed by square root.

**Table 5.** Phenylalanine ammonia-lyase activity ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein) in *M. officinalis* shoots submitted to different treatments with salicylic acid (SA) and lysed bacteria suspension (*E. carotovora*).

Treatments	Days					
	0	2	10	15	20	25
<b>Control</b>	0.3508 aA*	0.5588 aA	0.6325 aA	0.3762 aA	0.2763 aA	0.5186 aA
<b>100 <math>\mu\text{M}</math> SA</b>	0.3508 aA	0.6816 aA	0.6026 aA	0.3788 aA	0.4811 aA	0.2681 aA
<b>500 <math>\mu\text{M}</math> SA</b>	0.3508 aA	0.5627 aA	0.3561 aA	0.3249 aA	0.3603 aA	0.5525 aA
<b>Bacteria</b>	0.3508 aA	0.4652 aA	0.5024 aA	0.6369 aA	0.4445 aA	0.7471 aA

\* Means followed by the same capital letters in line or the same small letters in column are not different according to Tukey's test at the probability level  $p \leq 0.05$ . Data was transformed by square root.

**Table 6.** Polyphenol oxidase activity ( $\Delta\text{Abs} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein) in *in vitro* shoots of *M. officinalis* submitted to different treatments with salicylic acid (SA) and lysed bacteria suspension (*E. carotovora*).

Treatments	Days					
	0	2	10	15	20	25
<b>Control</b>	0.0069 aA*	0.0040 aB	0.0058 bA	0.0056 aA	0.0061 aA	0.0053 aA
<b>100 <math>\mu\text{M}</math> SA</b>	0.0069 aAB	0.0047 aB	0.0103 aA	0.0074 aAB	0.0053 aB	0.0040 aB
<b>500 <math>\mu\text{M}</math> SA</b>	0.0069 aA	0.0055 aB	0.0056 bB	0.0083 aA	0.0027 aC	0.0033 aC
<b>Bacteria</b>	0.0069 aA	0.0043 aB	0.0048 bB	0.0088 aA	0.0029 aB	0.0071 aA

\* Means followed by the same capital letters in line or the same small letters in column are not different according to Tukey's test at the probability level  $p \leq 0.05$ . Data was transformed by square root.

**Table 7.** Phenylalanine ammonia-lyase activity ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein) in plants of *M. officinalis* sprayed with different treatments with salicylic acid (SA) and lysed bacteria suspension (*E. carotovora*).

Treatments	Days					
	0	1	2	5	10	20
<b>Control</b>	0.1882 aA*	0.1277 bA	0.2718 aA	0.2051 aA	0.1915 aA	0.1467 bA
<b>500 <math>\mu\text{M}</math> SA</b>	0.1882 aA	0.4228 aA	0.3785 aA	0.2463 aA	0.2426 aA	0.0443 bA
<b>1000 <math>\mu\text{M}</math> SA</b>	0.1882 aA	0.1633 bA	0.0834 aA	0.2686 aA	0.2321 aA	0.4530 aA
<b>Bacteria</b>	0.1882 aA	0.1941 bA	0.2019 aA	0.3623 aA	0.2087 aA	0.2082 abA

\* Means followed by the same capital letters in line or the same small letters in column are not different according to Tukey's test at the probability level  $p \leq 0.05$ . Data was transformed by square root.

**Figure 5.** *M. officinalis* envased. (A) Plant sprayed with distilled water; (B) plants sprayed with lysed bacteria suspension. Arrow points to necrose spot. Bars represent 1.5 cm.





**Table 8.** Polyphenol oxidase activity ( $\Delta\text{Abs} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein) in *M. officinalis* sprayed submitted to different treatments with salicylic acid (SA) and lysed bacteria suspension (*E. carotovora*).

Treatments	Days					
	0	1	2	5	10	20
<b>Control</b>	0.0276 Aa*	0.0227 Aa	0.0240 Aa	0.0275 Aa	0.0237 Aa	0.0272 Aa
<b>500 <math>\mu\text{M}</math> SA</b>	0.0276 Aa	0.0237 Aa	0.0215 Aa	0.0226 Aa	0.0248 Aa	0.0287 Aa
<b>1000 <math>\mu\text{M}</math> SA</b>	0.0276 Aa	0.0239 Aa	0.0188 Aa	0.0217 Aa	0.0227 Aa	0.0260 Aa
<b>Bacteria</b>	0.0276 Aa	0.0180 Ba	0.0273 Aa	0.0254 ABa	0.0235 ABa	0.0291 Aa

\* Means followed by the same capital letters in line or the same small letters in column are not different according to Tukey's test at the probability level  $p \leq 0.05$ . Data was transformed by square root.

**Table 9.** Average number of roots induced in *M. officinalis* shoots cultivated *in vitro* submitted to treatments with salicylic acid (SA) and lysed bacteria suspension (*E. carotovora*).

Treatments	Days			
	10	15	20	25
<b>Control</b>	0 bcA*	0 bA	0 bcA	0 bA
<b>100 <math>\mu</math>M SA</b>	2.6 bcB	5.8 aAB	3.8 bAB	12.5 abA
<b>500 <math>\mu</math>M SA</b>	7.8 aA	11.2 aA	13.0 abA	0.5 abA
<b>Bacteria</b>	5.5 abB	12.4 aAB	16.0 aAB	24.3 aA

\* Means followed by the same capital letters in line or the same small letters in column are not different according to Tukey's test at the probability level  $p \leq 0.05$ . Data was transformed by square root.

## CONCLUSÃO GERAL

- Brotos multiplicados *in vitro* por 3 meses mostraram-se competentes em enraizar, mesmo na ausência de reguladores de crescimento, enquanto que brotos multiplicados por 12 meses perderam esta capacidade.
- As maiores taxas de formação de brotos em melissa ocorreram no meio suplementado com 0.2 mg.L<sup>-1</sup> BA, independente da presença de ANA.
- O meio de cultura suplementado com 1 mg.L<sup>-1</sup> IBA resultou na maior taxa de produção de raízes, assim como no melhor desenvolvimento destas aos 40 dias de cultivo.
- As plantas regeneradas no meio suplementado com IBA exibiram as maiores porcentagens de aclimatização do que as plantas regeneradas em meio suplementado com NAA.
- O uso do eliciador AS promoveu o aumento transitório dos níveis dos compostos fenólicos e flavonóides em brotos cultivados *in vitro*, entretanto não foi observada a mesma resposta em plantas envasadas.
- A suplementação do meio de cultura com suspensão de bactérias fitopatogênicas mortas promoveu a redução dos níveis dos compostos fenólicos e o espessamento de raízes e ramos dos brotos. Contudo, nas plantas envasadas, a suspensão bacteriana ocasionou necrose nos bordos das folhas 24h após a aspersão.
- Os eliciadores não promoveram mudanças significativas na atividade da PAL tanto nos brotos *in vitro* quanto nas plantas envasadas.
- A atividade da PPO teve um aumento transitório que coincidiu com a elevação dos compostos fenólicos nas plantas *in vitro*, fato este não observado nas plantas envasadas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram avaliados vários aspectos referentes ao metabolismo dos fenilpropanóides, principalmente à síntese e atividade das enzimas envolvidas neste processo, assim como na otimização da técnica de micropropagação de *Melissa officinalis*.

Em um primeiro momento otimizou-se a técnica de micropropagação desta espécie, através da utilização de fitorreguladores em concentração adequada para obterem-se clones, com capacidade de regeneração e aclimação. Esta otimização possibilitou a obtenção de plantas clone com aspecto normal e homogeneidade genética, possibilitando à realização de futuros experimentos, sem haver a interferência de caracteres genotípicos. Além destes fatores, a micropropagação pode permitir a futura seleção de plantas com alta atividade metabólica.

Em segundo momento direcionam-se todas as atenções para a utilização de eliciadores bióticos. Plantas envasadas de *M. officinalis* apresentaram resposta de hipersensibilidade a bactéria *E. carotovora*, evidenciada pela rápida necrose nos bordos das folhas.

Por outro lado, a suspensão bacteriana promoveu uma inesperada resposta de formação de raízes nos brotos cultivados *in vitro*, indicando uma possível reação de estresse pela presença de fragmentos de bactérias incompatíveis. Esta resposta de formação de raízes, juntamente com a formação de plantas com órgãos espessados, indica uma alteração na atividade de lignificação, podendo envolver mecanismos de estresse oxidativo.

Apesar do ácido salicílico fazer parte do mecanismo de sinalização contra patógenos em diversas espécies vegetais, as concentrações testadas em *M. officinalis*

não promoveram alterações perceptíveis nas atividades da fenilalanina amônia-liase e polifenol oxidase, bem como nos níveis de polifenóis, tanto nas condições *in vitro*, quanto nas plantas envasadas. Contudo, o ácido salicílico pode ter representado um agente estressante, pois na sua presença ocorreu a formação de raízes.

Em conclusão, é importante ressaltar que os estudos aqui realizados apontam para uma resposta diferenciada entre as plantas cultivadas *in vitro* e em vaso. Tal fato incentiva a utilização de técnicas biotecnológicas para a obtenção de respostas específicas no cultivo de plantas de interesse nutracêutico e medicinal, principalmente no Brasil.

## PERPECTIVAS

Este trabalho destacou a possibilidade e investigação, através de técnicas alternativas e modernas, da produção de determinados metabólitos secundários em plantas de *Melissa officinalis* tratadas com eliciadores. Acredita-se ser importante através da cromatografia de alta eficiência (CLAE), possa ser interessante a separação e identificação de compostos de interesse produzidos em resposta a agentes indutores do metabolismo secundário.

Outra perspectiva aberta por este trabalho, e também colocada em prática no Laboratório, e identificar o fator estressante que promoveu a formação de raízes em plantas de *M. officinalis* expostas ao eliciador fitobactéria. Acredita-se que o etileno, gás produzido pelas plantas em situação de estresse, esteja envolvido nesta resposta. No entanto, falta adaptar a técnica de micropropagação a fim de identificar a presença e ação deste hormônio.

Por último, e não menos importante, a perspectiva de estudos de manipulação genética visando à clonagem e caracterização de genes envolvidos com a resposta ao estresse.

## NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

#### **Correspondence to:**

Paulo Mazzafera  
Editor-in-Chief BJPP  
Departamento de Fisiologia Vegetal – IB  
CP 6109, Unicamp  
13083-970, Campinas, SP, Brazil  
E-mail: bjpp@unicamp.br

#### **AIMS AND SCOPE**

The **Brazilian Journal of Plant Physiology (BJPP)** is the official journal of the **Brazilian Society of Plant Physiology** and is devoted to publish original research contributions in various fields of plant physiology. BJPP publishes **regular papers, short communications, minireviews and Brazilian minireviews**. Minireviews are published upon invitation but authors may also propose to the Editor-in-Chief a topic for submission. Brazilian minireviews should focus on the physiology of plants of tropical natural ecosystems. These minireviews are not intended for articles in taxonomy, anatomy, systematics and ecology unless they have a physiological approach. BJPP publishes articles in the following sections:

**Biochemical Processes** (primary and secondary metabolism, and biochemistry)

**Photobiology and Photosynthesis Processes**

**Gene Regulation, Transformation, Cell and Molecular Biology**

**Plant Nutrition**

**Development, Growth and Differentiation** (seed physiology, hormonal physiology and morphogenesis)

**Post-harvest Physiology**

**Ecophysiology/Crop Physiology and Stress Physiology**

**Plant-Microbe and Plant-Insect Interactions**

**Instrumentation in Plant Physiology**

Contributions should present new and significant findings. This is particularly important for manuscripts on Plant Cell, Tissue and Organ Culture that should rely on the basis of novelty and potential contribution to the understanding of plant physiology. Simple experiments on applications of existing methods or methodological and technical procedures will not be considered for publication as well as data from dose-response experiments without physiological discussion. BJPP publishes three issues per year.

#### **SUBMISSION AND REVIEWING**

Submission of a manuscript to the Editor-in-Chief implies that it has not yet been published nor is it being considered for publication elsewhere. Submission of multi-authored manuscripts implies that the senior corresponding author has obtained the approval of all their co-authors to submit the manuscript to BJPP. BJPP assumes that all information contained in an article is full responsibility of the authors, including the accuracy of the data and the conclusions resulting from them.



Authors are requested to send the manuscript by e-mail to the Editor-in-Chief. Photographs that are important/essential for the understanding of the results should be attached as separate files and must have high quality. On submitting a manuscript, the Editor-in-Chief will check if it fits the scope of the journal and if it follows the journal guidelines. Submissions which do not conform to these guidelines will be returned immediately to the authors for correction before being sent for review. The manuscripts are sent to an Associate Editor and reviewers will be selected based on their competence in specialized areas of plant physiology. On submission, the authors may indicate up to five potential reviewers with recognized competence in the research area of the manuscript. However, the Associate Editors reserve the right to not follow these suggestions. The authors will receive a letter from the Editor-in-Chief together with the reports of the reviewers. Manuscripts where revision was requested should be returned to the Editor within 30 days; otherwise they will be considered as new submissions. The revised version should be sent by email and accompanied with a letter responding to the reviewer's and editor's comments. Disregarded comments must be justified. Authors are requested to use Microsoft Word Windows 95-2000 as word processor. Rejected manuscripts will only be returned to the authors if they contain important comments from the reviewers which may contribute to the [author's](#) research.

### MANUSCRIPT GUIDELINES

Manuscripts that do not follow these guidelines will be promptly returned to authors before reviewing. BJPP only accepts manuscripts written in clear, concise and fluent English. It is strongly recommended that the text be checked by a native English-speaker who is familiar with scientific writing and terminology. Arrange the manuscript in the following order:

**Manuscript.** To format the manuscript, please check a recent issue of BJPP. The pages must be numbered consecutively, including figures and tables (see an example of this page at the end of these instructions). The lines of each page must be numbered to aid reviewers. In the first page include the title of the manuscript (in bold, capital letters, font size 16, justified), author's names (Size 12, justified) and affiliation (size 12, italicized and justified) on this page. The senior corresponding author may be indicated by an asterisk. Abstracts should not exceed more than 300 words. Authors should suggest three to six key words (in alphabetical order) which do not appear in the title. Texts should be double-spaced type written using Times New Roman font, on one side of Letter-size paper, with 3 cm margins throughout. Scientific names should be in italics. Main headings (**Introduction, Material and methods, Results, Discussion, Acknowledgments, and References**) should be in bold type, justified and separated from the text. They should be presented continuously. Results and Discussion may be presented together only in exceptional circumstances. There should be no repetition of results in the discussion. Main headings of sections should be typed in italics and not separated from the text. Literature citations in the text should be cited in chronological order and then sorted by author and year (ex. Styles, 1978; Meier and Bowling, 1995; Meier et al., 1997). Do not italicize et al. References in the reference list should be in alphabetical order. Unpublished observations or personal communications should be mentioned in the text (e.g., T. Carter, personal communication; T. Carter and J. Spanning, unpublished data). Avoid citing theses. Titles of periodicals should be abbreviated according to the *Bibliographic Guide for Editors and Authors* – BIOSIS). The homepage of the BJPP contains abbreviations for most journals in plant science.

Short communications are not intended to publish preliminary results. They should be concise but also contain significant findings. Short communications must not have more than ten double-spaced type-written pages, including tables and figures. They should be sent with the first and second pages, (ta estranho) as for regular manuscripts, but they do not have main headings. References should follow the text.

In Minireviews, authors are free to suggest the article structure, but tables and figures should follow the guidelines for manuscript publication in BJPP. Minireviews will be submitted to referees. They must be written concisely focusing on topical research problems, with emphasis on the state of the art, and should serve as reference for further research. They must not have more than twenty double-spaced type-written pages,

#### Journal references

Vitória AP, Lea P, Azevedo RA (2001) Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57:701-710.

#### Book references

Salisbury FB, Ross CW (1992) *Plant Physiology*. 4th edn. Wadsworth Publishing Company, Belmont.

#### Book chapter references

Fujiwara K, Kozai T (1995) Physical and microenvironment and its effects. In: Aitken-Christie A, Kozai T, Smith MAL (eds), *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*, pp.301-318. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

#### Conference proceedings, Annals and published Abstracts

Prisco JT, Pahlich E (1989) Recent advances on the physiology and salt stresses. In: *Annals (or Proceedings/Abstracts) of the II Reunião Brasileira de Fisiologia Vegetal*. Piracicaba, Brazil, pp.23-24.

#### Thesis

Melotto E (1992) Characterization of endogenous pectin oligomers in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) fruit. Davis, University of California. PhD thesis.

### **Tables and Figures**

Figures and tables should not repeat data and should be reduced to a minimum. When possible, data should be included in the text. Tables and figures should be numbered consecutively with arabic numbers and in the text, calls for tables and figures should appear as: "These data are shown in table 1 and figure 1A....." Table and figure headings should be double spaced. Only horizontal lines are to be used for table divisions. Footnotes to tables should be in font size 10 and indicated by lowercase superscript letters, beginning with a in each table. Figure legends should be sent on a separate page preceding figure pages. Text and numbers in figure ordinates should be typed using font size no smaller than 12. All figures should be of a size permitting direct reproduction for printing. It is recommended that they fit to the column width and length (8 cm x 20 cm), including legend. The publishers reserve the right to reduce figure sizes.

### **Units, symbols and abbreviations that can be used without definitions**

Scientific International units should be used throughout. For a comprehensive and detailed description of the units, symbols and terminology in plant science, consult *Units, Symbols and Terminology for Plant Physiology*, edited by F.B. Salisbury, Oxford University Press, Oxford. Briefly, use pascal (Pa) for pressure, mM for concentration, L for liter, mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> for irradiance, becquerel (Bq) for radioactivity, *g<sub>n</sub>* (the g is italicized) for acceleration due to gravity, s for second, min for minute, h for hour, Da for indication of molecular mass, which is represented by *m* (relative molecular mass of proteins is the same as molecular weight, *M<sub>r</sub>*, and should not be accompanied by Da; e.g., the relative molecular mass *M<sub>r</sub>* = 10,000),  $\Psi_w$  for water potential (italicized –  $\Psi_p$  for pressure potential,  $\Psi_s$  for solute potential and  $\Psi_m$  for matrix potential). All abbreviations should be indicated immediately

after the first time a term is used. The identification number of enzymes should be shown the first time an enzyme is cited. Please consult the BJPP home page for a broader range of units and symbols.

**Illustrations**

Photographs should have high quality and included at the end of the text. The number of photographs should be reduced to a minimum. Line drawings should be of uniform thickness. Text and numbers should be of proper dimensions.

**Proofs**

Authors should return the galley proofs of their manuscripts within three days of receipt. Extensive alterations will be not accepted.

**Reprints**

The authors will receive a PDF file as reprint.

**Page Charge:** There is no parge charge to publish in BJPP.

# TITLE MUST BE IN CAPITAL LETTERS, SIZE 16 AND CENTERED, WITH *Scientific names* IN ITALICS

Authors' Names Should Be Typed<sup>1</sup>, With Font Size 14 And Justified<sup>2,\*</sup>

*1Affiliations should be italicized, font size 12, justified; 2Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, CP 6109, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brasil (e-mail: cxds@univer.br – fax may also be included)*

## Abstract (font size 12 and bold)

Abstract must contain a maximum of 250 words. The text should be typed in regular letters, font size 12 and justified.

**Key words (bold):** Authors may suggest 3-6 key words, in alphabetical order and separated by commas.

## Portuguese title (font size 12 and bold)

Authors should provide a version of the abstract in Portuguese. Authors not fluent in Portuguese may ask for a translation of the abstract. Resumo may contain a maximum of 250 words. The text should be typed in regular letters, font size 12 and justified.

**Palavras-chave (bold):** Authors may suggest 3-6 key words, in alphabetical order and separated by commas.

## INTRODUCTION (font size 12)

Text should be double-spaced type written using Times New Roman font size 12, on one side of Letter-size paper with 3 cm margins throughout. The lines of each page must be numbered to aid reviewers.

**Acknowledgements :** Acknowledge here any kind of technical and financial support

## REFERENCES

Reference list should be in alphabetical order. See guidelines for citation styles of journals, books, book chapters, etc.

The homepage of the BJPP presents abbreviations for the most used journals in plant science. Align to the third letter.

**Table 1.** Table headings should be concise. Tables and figures should be numbered consecutively with arabic numbers. Center numerals in the cells.

Ion	Actual activity	Calculated activity <sup>a</sup>
	(μ Eq.g <sup>-1</sup> )	
K <sup>+</sup>	62	64
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	26	0.026

<sup>a</sup> Footnotes to tables should be in font size 10

**Figure 1.** Figure legends must be presented in a separated page. It is very important that text and numbers in figure ordinates are typed in font size no smaller than 12.