

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARÍLIA PEREIRA MACHADO

**MICROPROPAGAÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Lavandula angustifolia* MILLER**

CURITIBA

2011

MARÍLIA PEREIRA MACHADO

**MICROPROPAGAÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Lavandula angustifolia* MILLER**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Luiz Antonio Biasi

Co-orientador: Cícero Deschamps

CURITIBA

2011

TERMO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO, apresentada pela candidata **MARILIA PEREIRA MACHADO**, sob o título "**MICROPROPAGAÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lavandula angustifolia* Miller**", para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Tese.

Curitiba, 20 de Dezembro de 2011.

Professora Dra. Louise Larissa May De Mio
Coordenadora do Programa

Professora Dra. Rosete Pescador
Primeira Examinadora

Dra. Claudine Maria de Bona
Segunda Examinadora

Professora Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas
Terceira Examinadora

Professor Dr. João Carlos Besspalhok Filho
Quarto Examinador

Professor Dr. Luiz Antonio Biasi
Presidente da Banca e Orientador

**À Letícia, minha filha, que trouxe alegria, luz e amor para
minha vida. Pelo carinho e doçura.**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Luiz Antonio Biasi pela orientação, amizade, compreensão e ensinamentos que foram fundamentais para a realização do trabalho.

Ao Professor Cícero Deschamps pela amizade, apoio e orientação.

Ao Professor João Carlos Bessalho Filho e aos pesquisadores Roberson Dibax e Giovana Bomfim de Alcantara pelas sugestões.

Aos estagiários Vanessa, Gabriel e Lucas pela dedicação ao trabalho.

Ao técnico do Laboratório de Botânica Estrutural, Nilson, pela ajuda e pelos momentos descontraídos.

À Pesquisadora da EPAGRI de São Joaquim, Marlise Nara Ciotta, pela contribuição ao trabalho de campo.

À EPAGRI por ceder a área para instalação do experimento.

À Engenheira Química Lilian Côcco pelas análises dos óleos essenciais.

À minha família pelo apoio e incentivo dados durante o curso.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado.

RESUMO

A espécie *Lavandula angustifolia* Miller apresenta características medicinais e aromáticas e apresenta-se com importância econômica devido à produção de óleo essencial. O mesmo tem destaque em indústrias de perfumaria, cosmética, farmacêutica, alimentos e higiene pessoal, em razão da presença dos constituintes linalol e acetato de linalila. Assim este trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação para a propagação normal de mudas e caracterizar o óleo essencial de *L. angustifolia* cv. Provence Blue. Para o estabelecimento das culturas *in vitro* foram utilizados como explantes ápices caulinares, a partir de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação. Dentre os meios de cultura testados, o meio LS foi o que apresentou melhor resposta no cultivo das brotações por não apresentar brotações com necrose apical. Hiperidricidade e necrose apical das brotações foram observadas durante a micropropagação, e o aumento de CaCl_2 no meio de cultura, de 440 mg L^{-1} para 1.320 mg L^{-1} , reduziu significativamente esses problemas. O aumento da concentração de CaCl_2 no meio de cultura levou ao aumento de Ca^{2+} nas brotações, sendo este encontrado em maior concentração na base das brotações, seguido do terço médio e ápice. O enraizamento das brotações *in vitro*, após a fase de multiplicação, não apresentou bons resultados, apenas 47% das microestacas enraizaram em meio isento de regulador vegetal, porém o enraizamento *ex vitro* com o uso de ácido indolbutírico na concentração de 5,0 mM, aplicado via solução ou talco, foi satisfatório com alta porcentagem de enraizamento das microestacas (100%). A *L. angustifolia* cv. Provence Blue apresentou elevada taxa de sobrevivência (aproximadamente 82%) quando transferida para o ambiente *ex vitro*. As mudas obtidas a partir da micropropagação, após 180 dias de aclimatização em casa de vegetação, foram estabelecidas a campo na Estação Experimental da EPAGRI, em São Joaquim (SC). As inflorescências foram colhidas em janeiro de 2011, e o óleo essencial foi extraído por hidrodestilação. Os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial foram linalol, acetato de linalila, 1,8-cineol, acetato de lavandulila, borneol, trans-cariofileno e trans- β -ocimeno. Conclui-se que a micropropagação de *L.*

angustifolia cv. Provence Blue, seguida do enraizamento *ex vitro* com simultânea aclimatização é uma técnica eficiente para a produção de mudas, as quais foram estabelecidas com sucesso no campo, obtendo-se altos teores de linalol.

Palavras-chave: Lamiaceae, multiplicação, cálcio, enraizamento *ex vitro*, linalol.

MICROPROPAGATION AND CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL OF *Lavandula angustifolia* MILLER

ABSTRACT

The species *Lavandula angustifolia* Mill. is an aromatic and medicinal plant, economically important due to the production of essential oil. The essential oil of *L. angustifolia* is used in the perfume, cosmetic, pharmaceutical, food and personal hygiene industries, due to the presence of the constituents linalool and linalyl acetate. The objective of this work was to develop a micropropagation protocol and to characterize the essential oil of *L. angustifolia* cv. Provence Blue. To establish the *in vitro* cultures shoot tips explants from stock plants kept in the greenhouse were used. Among the tested media the LS showed the best response for cultivation of the shoots. Hyperhidricity and apical necrosis of shoots were observed during micropropagation and increase of CaCl_2 in the culture medium from 440 mg L^{-1} to $1,320 \text{ mg L}^{-1}$ significantly reduced these problems. The increased concentration of CaCl_2 in the medium led to an increase of Ca^{2+} in the shoots, and was found in higher concentration at the base of the shoots, followed by the middle portion and apex. The rooting of shoots *in vitro*, after the multiplication phase, did not show good results, but *ex vitro* rooting using IBA applied via solution or talc, was satisfactory. *L. angustifolia* cv. Provence Blue had a high survival rate when transferred to *ex vitro* environment. After 180 days of acclimatization in the greenhouse the plantlets obtained from the micropropagation were established in the field of EPAGRI Experimental Station, in São Joaquim (SC). Inflorescences were harvested in January 2011 and the essential oil was extracted by hydrodistillation. The major constituents found in essential oil were linalool, linalyl acetate, 1,8-cineole, lavandulila acetate, borneol, trans-caryphyllene and trans- β -ocimene. It is concluded that the micropropagation of *L. angustifolia* cv. Provence Blue, followed by *ex vitro* rooting with simultaneous acclimatization is an efficient technique for the production of plantlets, which were successfully established in the field, presenting high levels of linalool.

Key words: Lamiaceae, multiplication, calcium, *ex vitro* rooting, linalool.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- FIGURA 1 - Subgênero, secções, espécies e cultivares pertencentes ao gênero *Lavandula* 5
- FIGURA 2 - Monoterpenos presentes no óleo essencial de lavanda 9

CAPÍTULO I

- FIGURA 3 - Micropropagação de *L. angustifolia* cv. Provence Blue. (A) Brotações em diferentes meios de cultura. (B) Enraizamento *in vitro* em meio de cultura MS sem regulador vegetal. (C) Microestaca enraizada *ex vitro*. (D) Plantas micropropagadas mantidas em casa de vegetação, após 30 dias de aclimatização 36

CAPÍTULO II

- FIGURA 4 - Porcentagem de hiperidricidade das brotações de *L. angustifolia*, em função da concentração de CaCl_2 , no primeiro e segundo subcultivos..... 57
- FIGURA 5 - Porcentagem de necrose apical das brotações de *L. angustifolia*, em função da concentração de CaCl_2 , no primeiro e segundo subcultivos..... 58
- FIGURA 6 - Brotações de *L. angustifolia* cultivadas *in vitro*. A) Brotações hiperídricas. B) Brotação com necrose apical (seta). C) Brotações normais..... 59
- FIGURA 7 - Efeito de CaCl_2 nas concentrações de 440 mg L^{-1} e 1.320 mg L^{-1} sobre o conteúdo de cálcio nas porções apical, mediana e basal das brotações de *L. angustifolia* cv. Provence Blue cultivadas *in vitro*..... 63

CAPÍTULO III

- FIGURA 8 - Microestacas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue com 2,0 cm e 4,0

cm de comprimento tratadas com diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB), (A) no número de raízes principais, (B) no comprimento das raízes principais, (C) na porcentagem de enraizamento, (D) na porcentagem de sobrevivência das plantas..... 78

FIGURA 9 - Microestacas enraizadas e micrografias de cortes histológicos de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, após quatro semanas de cultivo. (A) microestaca de 2,0 cm de comprimento inicial não tratada com AIB. (B) microestaca de 4,0 cm de comprimento inicial tratada com 5,0 mM de AIB. (C) Corte longitudinal da base da microestaca enraizada *ex vitro* evidenciando o primórdio radicial. (D) Corte transversal da base da microestaca enraizada *ex vitro*..... 80

CAPÍTULO IV

FIGURA10- Efeito de concentrações de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento *ex vitro* de microestacas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, após 30 dias de aclimatização. (A) altura das plantas. (B) número de raízes principais. (C) comprimento das raízes principais. (D) porcentagem de microestacas enraizadas. (E) porcentagem de sobrevivência das plantas..... 94

CAPÍTULO V

FIGURA 11 - (A) Plantas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue no campo, antes da colheita. (B) Inflorescências após a colheita. (C) Extração do óleo essencial das inflorescências em aparelho graduado tipo Clevenger. 108

FIGURA 12 – Inflorescências de *Lavandula angustifolia* cv. Provence Blue colhidas em São Joaquim. (A) Flores abertas e fechadas. (B) Flores abertas e senescentes..... 110

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- TABELA 1 - Efeito de diferentes meios de cultura na micropropagação de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, após 40 dias de cultivo..... 37
- TABELA 2 - Efeito de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA) no meio de cultura de enraizamento sobre a altura (cm), número de raízes principais, comprimento das raízes principais (cm) e porcentagem de enraizamento das microestacas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, após 30 dias de cultivo *in vitro*..... 39
- TABELA 3 - Efeito de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA) *in vitro* na porcentagem de enraizamento e aclimatização das plantas micropropagadas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, após 30 dias da transferência para casa de vegetação..... 41

CAPÍTULO II

- TABELA 4 - Altura, número de folhas e brotações por explante de *L. angustifolia* Mill., no primeiro subcultivo, em meio de cultura MS suplementado com 1,0 µM BAP..... 55
- TABELA 5 - Altura (cm), número de folhas e brotações por explante de *L. angustifolia* Mill., no segundo subcultivo, em meio de cultura MS suplementado com 1,0 µM BAP..... 56
- TABELA 6 - Altura (cm), número de raízes e comprimento das raízes principais de *L. angustifolia*, em meio de cultura MS isento de regulador de crescimento..... 60
- TABELA 7 - Efeito de duas concentrações de CaCl₂ no meio de cultura MS, combinadas com dois subcultivos, no cultivo *in vitro* de brotações de *L. angustifolia* cv. Provence Blue..... 62

CAPÍTULO IV

TABELA 8 - Enraizamento <i>ex vitro</i> de microestacas de <i>L. angustifolia</i> cvs. Vera, Provence Blue, English e Elegance Ice, 30 dias após a instalação do experimento.....	96
---	----

CAPÍTULO V

TABELA 9 - Análise de solo da área experimental, coletado na profundidade de 0-20 cm. São Joaquim, SC, 2010.....	106
TABELA 10- Constituintes (%) do óleo essencial das inflorescências de <i>L. angustifolia</i> cv. Provence Blue, colhidas em São Joaquim (SC) em janeiro de 2011.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA – ácido indolacético

AIB – ácido indolbutírico

ANA – ácido naftaleno acético

BAP – 6-benzilaminopurina

CaCl₂ – cloreto de cálcio

CV – coeficiente de variação

LS – meio de cultura de Linsmaier e Skoog (1965)

MS – meio de cultura de Murashige e Skoog (1962)

MS/2 – meio de cultura de Murashige e Skoog com a metade dos sais

QL – meio de cultura de Quoirin e Lepoivre (1977)

TDZ - Thidiazuron

WPM – “Wood Plant Medium” (1980)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 REFERÊNCIAS	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 GÊNERO <i>Lavandula</i>	5
2.2 ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA	6
2.3 MICROPROPAGAÇÃO DE LAVANDA	9
2.3.1 Fontes de explante	10
2.3.2 Desinfestação	11
2.3.3 Estabelecimento <i>in vitro</i>	12
2.3.4 Multiplicação	12
2.3.5 Enraizamento <i>in vitro</i>	14
2.3.6 Enraizamento <i>ex vitro</i> e aclimatização	15
2.4 DESORDENS FISIOLÓGICAS DO CULTIVO <i>IN VITRO</i>	16
2.5 REFERÊNCIAS.....	18
3 CAPÍTULO I – MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	28
RESUMO	28
MICROPROPAGATION OF THE <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	29
ABSTRACT	29
3.1 INTRODUÇÃO	30
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.2.1 Condições de cultivo <i>in vitro</i>	32
3.2.2 Estabelecimento <i>in vitro</i>	32
3.2.3 Efeito da composição do meio de cultura na multiplicação das brotações.....	32
3.2.4 Enraizamento <i>in vitro</i> das brotações	33
3.2.5 Aclimatização	33

3.2.6 Análise estatística	34
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.3.1 Estabelecimento <i>in vitro</i>	35
3.3.2 Efeito da composição do meio de cultura na multiplicação das brotações.....	35
3.3.3 Enraizamento e aclimatização	38
3.4 CONCLUSÕES	42
3.5 REFERÊNCIAS	43
4 CAPÍTULO II – REDUÇÃO DA NECROSE APICAL E HIPERIDRICIDADE DE PLANTAS DE <i>Lavandula angustifolia</i> MILL. CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>.....	47
RESUMO	47
REDUCTION OF APICAL NECROSIS AND HYPERHYDRICITY IN <i>IN VITRO</i> CULTURED <i>Lavandula angustifolia</i> MILL. PLANTLETS	49
ABSTRACT	49
4.1 INTRODUÇÃO	50
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.2.1 Estabelecimento <i>in vitro</i>	52
4.2.2 Efeito de diferentes concentrações de CaCl ₂ na redução da necrose apical e hiperidricidade das brotações de <i>L. angustifolia</i> cv. Provence Blue	52
4.2.3 Efeito de diferentes concentrações de CaCl ₂ no enraizamento das brotações de <i>L. angustifolia</i> cv. Provence Blue	53
4.2.4 Influência do aumento de CaCl ₂ do meio de cultura no teor de cálcio do tecido vegetal	53
4.2.5 Análise Estatística	54
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.3.1 Efeito de diferentes concentrações de CaCl ₂ na redução da necrose apical e hiperidricidade das brotações de <i>L. angustifolia</i> cv. Provence Blue	55

4.3.2 Efeito de diferentes concentrações de CaCl ₂ no enraizamento das brotações de <i>L. angustifolia</i> cv. Provence Blue.....	59
4.3.3 Influência do aumento de CaCl ₂ do meio de cultura no teor de cálcio do tecido vegetal	60
4.4 CONCLUSÕES	64
4.5 REFERÊNCIAS	65
5 CAPÍTULO III – MICROESTACA E EFEITO DO ÁCIDO INDOLBUTÍRICO NO ENRAIZAMENTO <i>EX VITRO</i> DE MICROESTACAS DE <i>Lavandula angustifolia</i> MILL.....	70
RESUMO	70
MICROCUTTING AND EFFECT OF AIB ON <i>EX VITRO</i> ROOTING OF <i>Lavandula angustifolia</i> MILL.	71
ABSTRACT	71
5.1 INTRODUÇÃO	72
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	74
5.2.1 Produção de brotações <i>in vitro</i>	74
5.2.2 Comprimento das microestacas e aplicação de AIB	74
5.2.3 Análise estatística	75
5.2.4 Análises histológicas	75
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
5.4 CONCLUSÕES	81
5.5 REFERÊNCIAS	82
6 CAPÍTULO IV – ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE <i>Lavandula angustifolia</i>	86
RESUMO	86
ROOTING OF <i>Lavandula angustifolia</i> MICROCUTTINGS	87
ABSTRACT	87
6.1 INTRODUÇÃO	88

6.2 MATERIAL E MÉTODOS	90
6.2.1 Experimento 1: Efeito de diferentes concentrações de AIB no enraizamento ex vitro de <i>L. angustifolia</i> cv. Provence Blue.....	90
6.2.2 Experimento 2: Enraizamento <i>ex vitro</i> de quatro cultivares de <i>L.</i> <i>angustifolia</i>	91
6.2.3 Análise estatística	91
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
6.3.1 Experimento 1: Efeito de diferentes concentrações de AIB no enraizamento <i>ex vitro</i> de <i>L. angustifolia</i> cv. Provence Blue	92
6.3.2 Experimento 2: Enraizamento <i>ex vitro</i> de quatro cultivares de <i>L.</i> <i>angustifolia</i>	95
6.4 CONCLUSÕES	97
6.5 REFERÊNCIAS	98
7 CAPÍTULO V – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Lavandula angustifolia</i> MILL. PROPAGADA <i>IN VITRO</i> E ACLIMATADA EM SÃO JOAQUIM (SC)	103
RESUMO	103
CHEMICAL CHARACTERIZATION OF <i>Lavandula angustifolia</i> MILL. ESSENTIAL OIL OF <i>IN VITRO</i> PROPAGATED PLANTS AND CULTIVATED IN SÃO JOAQUIM (SC), BRAZIL	104
ABSTRACT	104
7.1 INTRODUÇÃO	105
7.2 MATERIAL E MÉTODOS	106
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
7.4 CONCLUSÕES	113
7.5 REFERÊNCIAS	114
8 CONCLUSÕES FINAIS	116
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	117

ANEXOS	119
---------------------	-----

1 INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Lavandula*, pertencente à família Lamiaceae (Labiatae), possui cerca de 30 espécies conhecidas popularmente como lavanda ou alfazema. A lavanda é originária da Europa (regiões montanhosas dos países mediterrâneos), e atualmente muitas espécies e cultivares são cultivados em regiões de clima temperado de todo o mundo. A lavanda está entre as mais populares plantas medicinais e aromáticas de grande importância econômica, pois além de ser importante fonte de óleo essencial, também é utilizada na produção de mel e como planta ornamental (DELGADO et al., 2006).

Seu óleo essencial, obtido da destilação das flores, caules e folhas, é importante para as indústrias cosmética, farmacêutica e de perfumaria (BOELENS, 1995; CHEMAT et al., 2006). As propriedades aromáticas e medicinais dos óleos essenciais são atribuídas aos monoterpenos, uma classe de compostos orgânicos voláteis que conferem ao óleo essencial de lavanda características aromáticas. Geralmente, podem ser encontrados 40 a 50 monoterpenos no óleo essencial de lavanda, como o linalol, acetato de linalila, 1,8-cineol, β -ocimeno, terpineno-4-ol e cânfora que se apresentam como constituintes majoritários (KREIS; MOSANDL, 1992; FLORES et al., 2005). Os compostos de maior interesse econômico são linalol e acetato de linalila, que possuem propriedades anestésicas e sedativas (SUGAWARA et al., 1998; GHELARDINI et al., 1999).

As espécies de lavanda mais comuns de valor medicinal são *L. dentata*, *L. angustifolia* (sinônimas *L. officinalis* e *L. vera*), *L. latifolia* (sinônimo *L. spica*), *L. stoechas*, *L. dhofarensis* e *L. angustifolia* x *L. latifolia* (lavandin) (MARTINS et al., 2000). Sendo a *L. angustifolia* reconhecida como a mais importante, seu óleo essencial (1 a 3%) é rico em acetato de linalila (30 a 55%) e linalol (20 a 36%) (BISSET, 1994; MOON; WILKINSON; CAVANAGH, 2006), e possui baixo conteúdo de cânfora (0,5 a 1%) (LIS-BALCHIN, 2002). Porém, podem ocorrer variações na composição e teor dos óleos essenciais, devido aos fatores

ambientais e ao genótipo das plantas.

A espécie *L. angustifolia* pode ser facilmente propagada a partir de sementes. Entretanto, isto não é recomendado devido à desuniformidade conferida às plantas, sendo a propagação vegetativa uma opção eficiente pela obtenção de plantas idênticas ao genótipo selecionado. A micropropagação tem proporcionado a obtenção de um grande número de plantas a partir de um único indivíduo, em curto período de tempo e espaço físico reduzido. É a técnica de maior aplicabilidade da cultura de tecidos e tem sido utilizada para multiplicar centenas de espécies medicinais. A propagação *in vitro* de lavanda já foi descrita para vários genótipos (NOBRE, 1996; SÁNCHEZ-GRAS; CALVO, 1996; ANDRADE et al., 1999; ECHEVERRIGARAY; BASSO; ANDRADE, 2005), demonstrando ser uma técnica viável para a multiplicação de clones selecionados.

No Brasil não há cultivo comercial de *L. angustifolia*, e isto se dá devido à carência de tecnologias voltadas ao manejo da cultura. Tendo em vista futuros trabalhos voltados a avaliação do potencial de cultivo de *L. angustifolia*, visando a produção de óleo essencial, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de micropropagação para *L. angustifolia* Mill., para a obtenção de mudas e caracterizar o óleo essencial produzido pelas plantas cultivadas em São Joaquim, Santa Catarina.

1.1 REFERÊNCIAS

ANDRADE, L. B. et al. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, p. 79-83, 1999.

BISSET, N. L. **Lavandulae flos herbal drugs and phytopharmaceuticals**. CRC Press, Stuttgart, Germany, 1994, p. 292-295.

BOELEN, M.H. Chemical and sensory evaluation of *Lavandula* oils. **Perfumer Flavorist**, v. 20, p. 23-51, 1995.

CHEMAT, F. et al. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, p. 157-160, 2006.

DELGADO, F. et al. Seed germination and essential oil of *Lavandula luisieri* from Central Eastern Portugal. **Acta Horticulturae**, v. 723, p. 283-288, 2006.

ECHEVERRIGARAY, S.; BASSO, R.; ANDRADE, L. B. Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants. **Biologia Plantarum**, v. 49, p. 439-442, 2005.

FLORES, G. et al. Enantiomeric composition studies in *Lavandula* species using supercritical fluids. **Journal of Separation Science**, v.28, p. 2333-2338, 2005.

GHELARDINI, C. et al. Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. **Planta Medica**, v. 65, p. 700-703, 1999.

KREIS, P.; MOSANDL, A. Chiral compounds of essential oils. Part

XI. Simultaneous stereoanalysis of lavender oil constituents. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 7, p. 187-193, 1992.

LIS-BALCHIN, M. **Lavender: The genus *Lavandula***. 1 ed. Taylor and Francis Inc., New York. 2002.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. Editora UFV. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. 2000. 220p.

MOON, T.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Antibacterial activity of essential oils, hydrosols and plant extracts from Australian grown *Lavandula* spp. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 16, p. 9-14, 2006.

NOBRE, J. *In vitro* cloning and micropropagation of *Lavandula stoechas* from field-grown plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 46, p. 151-155, 1996.

SÁNCHEZ-GRAS, M. C.; CALVO, M. C. Micropropagation of *Lavandula latifolia* through nodal bud culture of mature plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, p. 259-261, 1996.

SUGAWARA, Y. et al. Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools. **Analytica Chimica Acta**, v. 365, p. 293-299, 1998.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GÊNERO *Lavandula*

O gênero *Lavandula*, assim como *Salvia*, *Mentha*, *Thymus*, *Ocimum*, entre outros, é um membro da família Lamiaceae. O gênero é composto por 32 espécies, que apresentam uma morfologia diversificada. As lavandas são definidas e distintas de todos os outros gêneros (Lamiaceae) pela morfologia das suas flores (UPSON, 2002).

De acordo com as características morfológicas, o gênero *Lavandula* é subdividido em três subgêneros: *Lavandula*, *Fabricia* e *Sabaudia*. Cada subgênero é, ainda, mais diversificado em secções, que se dissociam em inúmeras espécies, um exemplo disso está representado na Figura 1. Há também os híbridos intra e interespecíficos, resultantes de cruzamentos naturais ou artificiais entre espécies diferentes (UPSON; ANDREWS, 2004).

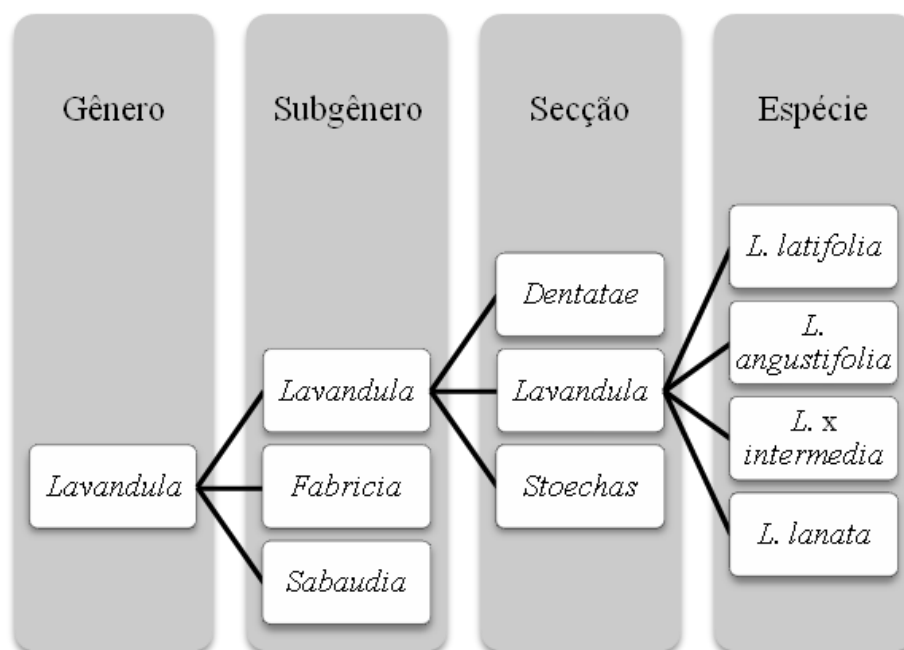


FIGURA 1 – Subgênero, secções e espécies pertencentes ao gênero *Lavandula* (Adaptado de BOECKELMANN, 2008).

Dentre as espécies do gênero *Lavandula*, a *L. angustifolia* é a que possui maior valor comercial. A planta é um subarbusto perene, aromático, ereto, muito ramificado na base, de coloração geral verde-acinzentada, de 30 a 70 cm de altura, nativa da Europa e cultivada em vários países de clima temperado, está adaptada a viver em clima seco e em altitudes até 1.800 m. Suas folhas são lineares, pequenas, opostas, rígidas e pubescentes. As flores são azuis, perfumadas e muito ornamentais, dispostas em racemos terminais (LORENZI, 2002).

A *L. angustifolia* é também conhecida como lavanda “English” ou lavanda verdadeira, tem como sinônimos *L. officinalis* Chaix. e *L. vera* DC., nomes botânicos mais antigos que não estão mais em uso (LALANDE, 1984; CHU; KEMPER, 2001; LORENZI, 2002).

A lavanda é potencialmente uma fonte rica de componentes bioativos (GHELARDINI et al., 1999). Seu óleo essencial contém geraniol, furfurool, linalol, cariofileno, acetato de linalila e cumarinas (MARTINS et al., 2000). Seu uso na perfumaria é amplamente conhecido, muito embora sua utilização seja ainda mais abrangente, sendo empregado nas indústrias cosmética, alimentícia, farmacêutica e de flavorizantes (BOELEN, 1995; CHEMAT et al., 2006). O óleo essencial de alta qualidade da lavanda é obtido da destilação da inflorescência (*L. angustifolia*). Um quilo de óleo é derivado de aproximadamente 120-150 kg de inflorescência, contudo isso depende das condições climáticas, como temperatura e pluviosidade, em que as plantas são cultivadas (BOZHANOV; KARADJOVA; ALEKSANDROV, 2007).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAS DE LAVANDA

Os óleos essenciais são misturas complexas que podem conter de 20 a 60 compostos ou mais, em concentrações que variam devido a múltiplos fatores. Normalmente apresentam dois ou três componentes majoritários, em

concentrações superiores aos demais constituintes presentes no óleo, que podem estar presentes somente em traços (BAKKALI et al., 2008).

A composição dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, mas os fatores ambientais causam variações significativas em seus componentes. Os monoterpenos e os sesquiterpenos apresentam-se como os compostos mais abundantes. A época de colheita, o horário e o modo de secagem do material vegetal também podem influenciar a composição e o teor do óleo (SILVA et al., 2007).

Os óleos essenciais de lavanda são usados principalmente na indústria de fragrâncias e perfumes. Comercialmente, o óleo essencial de maior valor comercial é extraído da espécie *L. angustifolia*. Um óleo essencial de qualidade inferior (óleo de lavandin) é obtido a partir de seus híbridos (URWIN, 2009). Dentre os constituintes majoritários, geralmente, encontrados nos óleos essenciais de *L. angustifolia* estão os monoterpenos linalol, acetato de linalila, 1,8-cineol, β -ocimeno, terpinen-4-ol e cânfora (KREIS; MOSANDL, 1992; FLORES et al., 2005).

A proporção desses compostos determina a qualidade do óleo essencial. O óleo de alta qualidade utilizado na perfumaria contém altas porcentagens de linalol e acetato de linalila, enquanto que o aumento da taxa de cânfora reduz a qualidade do óleo (ADAM, 2004). No entanto, a qualidade do óleo essencial de lavanda destinado para a indústria farmacêutica é determinada pela proporção dos monoterpenos com a desejada atividade biológica. Por exemplo, linalol e acetato de linalila, encontrados em grande quantidade na *L. angustifolia*, possuem os efeitos sedativo e anestésico local. 1,8-cineol, que compreende mais de 50% do óleo essencial de *L. dentata*, age como um agente espasmódico, anestésico local e antibacteriano. Cânfora, encontrada em altas concentrações na *L. latifolia*, tem propriedades antibacteriana, assim como α -terpineol e terpin-4-ol. Os constituintes α -pineno, 1,8-cineol, β -pineno e p-cimeno possuem atividade antifúngica, enquanto o óxido de cariofileno, um sesquiterpeno encontrado em *L.*

latifolia e *L. angustifolia*, apresenta efeito anti-inflamatório (CHU; KEMPER, 2001).

Linalol (Figura 2) é o constituinte majoritário do óleo essencial da *L. angustifolia*, tem sido largamente usado como composto de partida para várias sínteses importantes, como a do acetato de linalila (Figura 2) (WEI; YUAN; LI, 1998), e testado como acaricida (PRATES et al., 1998), bactericida e fungicida (BELAICHE; TANTAOUI-ELARAKI; IBRAHIMY, 1995). Na medicina tem sido aplicado, com sucesso, como sedativo (ELISABETSKY; MARSCHNER; SOUZA, 1995; SUGAWARA et al., 1998) e, tem sido analisadas suas propriedades anticonvulsivas (ELISABETSKY; BRUM; SOUZA, 1999).

Cânfora (Figura 2) é um monoterpeno que possui um cheiro forte e penetrante, gosto amargo e é ligeiramente fria ao tato. É largamente empregada contra gripes, resfriados e complicações inflamatórias, além de ser usada na fabricação de nitrocelulose, materiais plásticos, produtos químicos e repelentes para insetos (LEAL et al., 2007). O constituinte 1,8-cineol (Figura 2) possui propriedades antiespasmódica, antifúngica e antibactericida (CHU; KEMPER, 2001).

Nos membros da família Lamiaceae, a produção e secreção do óleo essencial estão localizados em tricomas glandulares (FAHN, 1988; LISBALCHIN, 2002). Tricomas glandulares são estruturas secretoras presentes na epiderme de folhas, caules e partes da flor. Podem ser observadas duas formas de tricomas glandulares, peltado e capitado (HAY; SVOBODA, 1993).

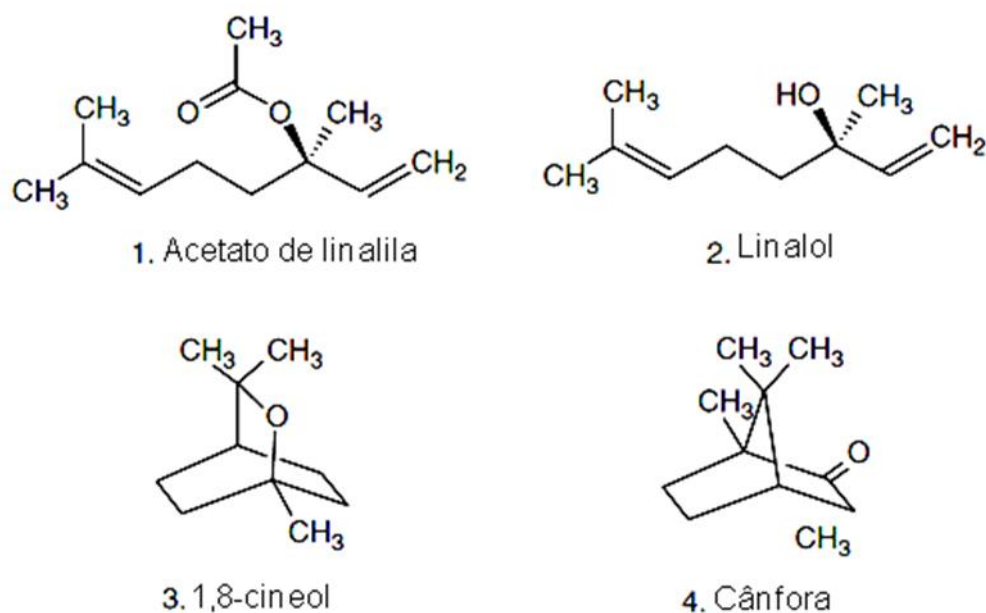


FIGURA 2 - Monoterpenos presentes no óleo essencial de lavanda (Adaptado de HARBORNE; WILLIAMS, 2002).

2.3 MICROPROPAGAÇÃO DE LAVANDA

A partir da cultura de tecidos de plantas é possível a obtenção de plantas geneticamente idênticas à planta matriz, em número elevado e curto espaço de tempo, estando isto na dependência do controle da morfogênese, a qual é influenciada por vários fatores como espécie, cultivar, tipo de explante, componentes do meio nutritivo, reguladores de crescimento e ambiente de cultivo (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006).

A micropropagação constitui um modo de manter sempre disponíveis explantes saudáveis e livres de contaminação para aplicação de técnicas de regeneração por cultura de tecidos e transformação genética, além de ser altamente conveniente para manutenção de coleções de plantas de genótipos diferentes, livres de patógenos (CABRAL et al., 2003).

A micropropagação tem sido realizada com sucesso em espécies hortícolas, ornamentais, frutíferas, medicinais e florestais. Contudo, para que a aplicação da micropropagação na produção de mudas se torne viável comercialmente e possa competir com os métodos tradicionais de propagação, é necessário reduzir os custos de produção, que se devem, em grande parte, às perdas causadas pela contaminação *in vitro*, por desordens fisiológicas e morfológicas nas plantas, à baixa porcentagem de sobrevivência das plantas na fase de aclimatização às condições *ex vitro*, à necessidade de mão de obra especializada para a intensiva manipulação dos frascos e das plantas e, sobretudo, ao elevado custo de funcionamento e manutenção das salas de crescimento com regime de luz artificial e temperatura controlada, onde as culturas *in vitro* são incubadas (ERIG; SCHUCH, 2005).

Murashige (1974) apresentou o conceito de três estágios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*. No primeiro ocorrem a seleção dos explantes, desinfestação e cultivo em meio nutritivo, sob condições assépticas, enquanto no segundo ocorre a multiplicação dos propágulos, mediante sucessivas subculturas em meio de cultura próprio para multiplicação e o terceiro é caracterizado pela transferência das partes aéreas produzidas para meio de cultura de enraizamento e subsequente transplante das plantas obtidas para substrato. Nesta fase, a planta fica mais susceptível ao estresse hídrico e ainda passa do estado heterotrófico para autotrófico (ZIV, 1991).

2.3.1 Fontes de explantes

O tipo de explante exerce forte influência nas subseqüentes respostas obtidas *in vitro*, e dentre os explantes que podem ser utilizados, ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados são os mais indicados na micropropagação, pois eles possuem determinação para o crescimento vegetativo, desenvolvendo plantas sem a passagem pela fase de calo, quando em meio de cultivo adequado

(GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Diferentes explantes foram utilizados no estabelecimento inicial de espécies de lavanda (SÁNCHEZ-GRAS; CALVO, 1996; ANDRADE et al., 1999; SUDRIÁ et al., 1999). Em *L. dentata* as culturas foram iniciadas com ápices meristemáticos (5,0 mm) (SUDRIÁ et al., 1999), e para *L. viridis* foram estabelecidos *in vitro* segmentos nodais (DIAS; ALMEIDA; ROMANO, 2002).

2.3.2 Desinfestação

Segundo Debergh e Read (1993), a desinfestação é o primeiro estágio da micropropagação. A porcentagem de explantes contaminados nesta etapa reflete a dificuldade na obtenção de material axênico. A desinfestação e esterilização do material antes da inoculação são fundamentais já que a contaminação durante esta fase impede o desenvolvimento da cultura (KAJIKI; SHEPHERD, 2006). As concentrações das soluções desinfestantes e a combinação dos princípios ativos podem variar em função da sensibilidade do tecido a ser desinfestado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Gemas axilares de *L. dentata* foram desinfestadas com imersão em etanol 50% por 1 minuto e hipoclorito de sódio (20%) por 15 minutos (SUDRIÁ et al., 2001), e para ápices meristemáticos foi utilizado o mesmo processo (SUDRIÁ et al., 1999). Segmentos nodais da mesma espécie foram desinfestados em etanol 70% por 30 segundos, seguido de uma solução de hipoclorito de sódio (1%) e Tween-20[®] por 20 minutos (ECHEVERRIGARAY; BASSO; ANDRADE, 2005), o mesmo processo foi utilizado para gemas axilares de *L. angustifolia* (ANDRADE et al., 1999).

2.3.3 Estabelecimento *in vitro*

A porcentagem de regeneração de plantas a partir de meristemas ou ápices caulinares é baixa para algumas espécies vegetais. Vários fatores são apontados

como responsáveis, destacando-se a composição do meio nutritivo e a concentração e combinação de reguladores vegetais (PIERIK, 1990; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As citocininas estimulam a divisão celular, e em concentrações elevadas induzem a formação de brotações adventícias e inibem a formação de raízes. As giberelinas induzem o crescimento dos meristemas ou gemas *in vitro*, podem, também, superar a dormência de embriões isolados ou gemas e inibir a formação de brotos ou raízes adventícias. Dentre as giberelinas, o ácido giberélico (GA₃) é o mais empregado (CARVALHO, 1999).

O estabelecimento inicial de gemas axilares de *L. viridis* foi realizado em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 0,44 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) (DIAS; ALMEIDA; ROMANO, 2002). E para *L. latifolia*, o cultivo inicial de gemas axilares foi melhor em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 5,0 µM de BAP (SÁNCHEZ-GRAS; CALVO, 1996).

2.3.4 Multiplicação

Dentre os diversos fatores que influenciam o sucesso da propagação *in vitro* de plantas medicinais, os efeitos das auxinas e citocininas na multiplicação das brotações são os mais importantes (SHORT; ROBERTS, 1991). O uso de citocininas estimula maior produção de partes aéreas, mas o seu excesso é tóxico e caracteriza-se, principalmente, pela formação de tufos de brotações e falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e hiperidricidade generalizada, o que leva a sérios problemas na fase de enraizamento (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). No cultivo *in vitro* de *L. vera* DC, a partir de segmentos nodais, houve aumento na taxa de multiplicação com o uso do meio de cultura MS, suplementado com 2,25 µM de TDZ ou 2,0 µM de BAP. Contudo, altas

concentrações dos reguladores de crescimento promoveram hiperidricidade (ANDRADE et al., 1999).

De acordo com George, Hall e De Klerk (2008), o efeito das citocininas não se restringe a uma subcultura, pois há um efeito residual de uma subcultura para outra. Esse efeito residual pode ser problemático quando afeta o alongamento das brotações. Na fase de multiplicação de *L. dentata* os subcultivos reduziram drasticamente o número de brotações produzidas na presença de 2,0 μM de BAP ou 40,0 μM de cinetina (JORDAN; CALVO; SEGURA, 1998).

A citocinina BAP está associada à formação de grande número de brotações e a uma elevada taxa de multiplicação, enquanto que a cinetina permite apenas crescimento normal sem brotações múltiplas (SKOOG; MILLER, 1957). Para *L. viridis* a concentração de 2,2 μM de BAP promoveu a produção de aproximadamente 12 brotações por explante (NOGUEIRA; ROMANO, 2002). Andrade et al. (1999), obtiveram elevada multiplicação de brotações de *L. angustifolia* utilizando 4,54 μM de TDZ, aproximadamente 11 brotações por explante, porém, foi observada hiperidricidade nas brotações nesta concentração. Para *L. dentata* foram obtidas cerca de 20 brotações por explante com a concentração de 5,0 μM de BAP ou 20,0 μM de cinetina (JORDAN; CALVO; SEGURA, 1998). Semelhante taxa de multiplicação foi alcançada com a concentração de 2,2 μM de BAP combinada com 2,5 μM de AIB, para a mesma espécie (ECHEVERRIGARAY; BASSO; ANDRADE, 2005). A combinação de uma citocinina (BAP) e uma auxina (AIA ou ANA) no meio de multiplicação, também aumentou o número de brotações de *L. angustifolia* (QUAZI, 1980) e *L. latifolia* (CALVO; SEGURA, 1989). Mas, para *L. angustifolia* foi observada uma redução no número de brotações por explante (ANDRADE et al., 1999). Já para *L. viridis* a concentração de 0,67 μM de BAP foi suficiente para se obter uma alta taxa de multiplicação, aproximadamente 12 brotações por explante (DIAS; ALMEIDA; ROMANO, 2002). A multiplicação de *L. stoechas* foi promovida

com 217,2 μM de sulfato de adenina mais 0,05 μM de ANA, não sendo observado efeito da BAP (NOBRE, 1996).

Na micropropagação, além de altas taxas de multiplicação, é importante que sejam obtidos explantes de boa qualidade. Apesar das altas taxas de multiplicação de diferentes espécies de lavanda *in vitro*, reportadas na literatura, essas vieram acompanhadas de hiperidricidade nos tecidos (ANDRADE et al., 1999; DIAS; ALMEIDA; ROMANO, 2002; ECHEVERRIGARAY; BASSO; ANDRADE, 2005; ZUZARTE et al., 2010). Concentração elevada de cinetina (40,0 μM) causou necrose e a morte da maioria dos explantes de *L. dentata* (JORDAN; CALVO; SEGURA, 1998).

2.3.5 Enraizamento *in vitro*

O enraizamento de partes aéreas *in vitro* constitui uma etapa importante na micropropagação. Plantas herbáceas enraízam com certa facilidade, o que não ocorre com espécies lenhosas (KAJIKI; SHEPHERD, 2006). As auxinas mais comumente empregadas nos meios de cultura são o ácido naftaleno acético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) e ácido indolacético (AIA). A diferença entre elas, além da parte estrutural da molécula, é a estabilidade que decresce respectivamente (FACHINELLO et al., 2005).

Para o enraizamento de *L. viridis*, Nogueira e Romano (2002) obtiveram 90% de brotações enraizadas em meio de cultura MS, acrescido de 10,74 μM de ANA. Enquanto, 100% das brotações de *L. stoechas* foram enraizadas com 5,4 μM de ANA (NOBRE, 1996). Já as brotações das cultivares (Gomti, Shivalik, MAS-1, Himalaya, MAH-3 e Kalka) de *Mentha arvensis*, espécie também pertencente à família Lamiaceae, enraizaram em meio de cultura sem adição de regulador vegetal (BHAT et al., 2001).

A redução em $\frac{1}{4}$ dos sais do meio de cultura MS e adição de 1,07 μM de ANA aumentou a taxa de enraizamento de *L. vera* DC (ANDRADE et al., 1999).

A redução da concentração dos macronutrientes do meio de cultura MS, também foi efetiva no enraizamento de *L. latifolia*, chegando a 95% de brotações em meio de cultura sem adição de regulador de crescimento (CALVO; SEGURA, 1989; SÁNCHEZ-GRAS; CALVO, 1996). Echeverrigaray, Basso e Andrade (2005), trabalhando com a mesma espécie obtiveram o melhor resultado de enraizamento em meio de cultura MS suplementado com 2,5 μM de ANA.

2.3.6 Enraizamento *ex vitro* e aclimatização

No processo de micropropagação o enraizamento *ex vitro* é mais vantajoso, pois reduz o tempo para a formação das mudas, a mão de obra e o custo (FEYISSA; WELANDER; NEGASH, 2007). O enraizamento *ex vitro* de brotações micropropagadas tem sido relatado para diferentes espécies, por exemplo, *Camptotheca acuminata*, *Rotula aquatica*, *Wedelia chinensis* e *Malus prunifolia* (MARTIN, 2003; MARTIN; BENNA; JOSEPH, 2003; LIU; LI, 2001).

Segundo Debergh e Maene (1981), o enraizamento *ex vitro* reduz de 35% a 75% o custo total da propagação *in vitro* de plantas ornamentais. Para *Mentha piperita* o enraizamento *ex vitro* evitou o risco de contaminação e perdas durante a aclimatização. Além disso, as mudas foram estabelecidas com características morfológicas semelhantes à planta matriz (SUNANDAKUMARI et al., 2004).

As adaptações induzidas às plantas cultivadas *in vitro* quando levadas ao ambiente *ex vitro* são denominadas aclimatização. Esse processo consiste de modificações morfoanatômico-fisiológicas necessárias às plantas para que possam sobreviver em um novo ambiente (CARVALHO et al., 1999). A remoção das plantas das condições *in vitro* provoca um estresse crítico, sendo então necessário manter a umidade alta e a temperatura amena (SUTTER; HUTZELL, 1984). Para diferentes espécies de lavanda a fase de aclimatização não limitou o sucesso da micropropagação (CALVO; SEGURA, 1989; SÁNCHEZ-GRAS; CALVO, 1996; DIAS; ALMEIDA; ROMANO, 2002; ECHEVERRIGARAY;

BASSO; ANDRADE, 2005). Obteve-se 80% de aclimatização das plantas de *L. viridis* nas condições *ex vitro*, apresentando desenvolvimento normal (DIAS; ALMEIDA; ROMANO, 2002).

2.4 DESORDENS FISIOLÓGICAS DO CULTIVO *IN VITRO*

Durante a micropropagação as plantas podem apresentar algumas desordens fisiológicas, dentre as quais estão a necrose apical e a hiperidricidade. A hiperidricidade é um dos principais problemas encontrados no cultivo *in vitro* de plantas, tendo sido observada a interação simultânea de diversos fatores, interferindo nas principais vias metabólicas, como fotossíntese, respiração e transpiração (ZIV, 1991). Antigamente denominada vitrificação, a hiperidricidade é uma má formação fisiológica que resulta na hidratação excessiva, baixa lignificação, função estomática prejudicada e reduzida resistência mecânica dos tecidos vegetais provenientes da cultura de tecidos (KEI-ICHIRO; SUSAN; KALIDAS, 1998). Essa desordem pode ocorrer com vários graus de severidade. Inicialmente, parte das brotações ou apenas uma ou duas folhas podem ser afetadas. As brotações com sintomas mais amenos, frequentemente, crescem mais rapidamente que o normal, e podem apresentar altas taxas de brotações axilares. Caracteriza-se por plantas com baixos níveis de celulose e lignina, baixa resistência da parede celular (KEVERS; GASPAR, 1986), hipertrofia celular (VIEITEZ et al., 1985), folhas intumescidas e quebradiças (DEBERGH, 1983; LESEHEM; WERKER; SHALEV, 1988; ZIV; SCHWARTZ; FLEMINGER, 1987) e reduzida taxa de sobrevivência em condições *ex vitro* (SUTTER; LANNGHANS, 1979).

A necrose apical é uma desordem fisiológica que tem afetado um grande número de espécies cultivadas *in vitro*, e pode ser causada por diversos fatores (BAIRU et al., 2008). Há uma tendência de se atribuir a necrose apical às altas concentrações de sais no meio de cultura, sendo atribuído à deficiência de

elementos essenciais (KARHU, 1997). Em *Gypsophilla paniculata* L., o meio de cultura MS com a concentração padrão de CaCl_2 (440 mg L^{-1}) não foi satisfatório, devido ao alto índice de estiolamento nos explantes. Melhores respostas foram obtidas quando os explantes foram cultivados no meio MS com a concentração de 1.760 mg L^{-1} de CaCl_2 (JUN TAKANE et al., 1994).

A adição de cálcio no meio de cultura minimizou o problema da necrose apical de brotações de castanha, porém, reduziu significativamente o enraizamento das brotações. Genótipos com alta afinidade por cálcio foram menos sensíveis à necrose apical (PIAGNANI; ZOCCHI; MIGNANI, 1996). Embora muitos estudos indiquem uma associação entre baixos níveis de cálcio e a necrose das brotações, o efeito do cálcio pode variar de espécie para espécie (BAIRU et al., 2008).

O cálcio possui funções conhecidas, como componente da parede celular, apresenta importante papel na absorção iônica, particularmente na correção do efeito desfavorável da concentração hidrogeniônica (pH) excessiva, sendo essencial para que tal efeito não reduza a absorção de nutrientes, além de ser indispensável à manutenção da estrutura das membranas celulares, em particular o plasmalema (VITTI; LIMA; CICARONE, 2006).

A falta de cálcio prejudica também o enraizamento, pois afeta particularmente os pontos de crescimento da raiz, causando o aparecimento de núcleos poliploides, células binucleadas, divisões amitóticas, com isso o crescimento é paralisado e ocorre escurecimento, com posterior morte da raiz (VITTI; LIMA; CICARONE, 2006). O desenvolvimento do sistema radicial a partir da formação de raízes adventícias em plantas propagadas vegetativamente sob condições *in vitro* ou *in vivo*, é um processo de grande complexidade envolvendo fatores endógenos e exógenos que ainda não estão completamente elucidados (SOUZA; PEREIRA, 2007).

2.5 REFERÊNCIAS

ADAM, K.L. **Lavender production, products, markets, and entertainment farms**. 2004. <http://attra.ncat.org/attra-pub/lavender.html>. Acesso em: 05 nov 2007.

ANDRADE, L. B. et al. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, p. 79-83, 1999.

BAIRU, M.W. et al. Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. **South African Journal of Botany**, v. 75, p. 122-127, 2008.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BELAICHE, T.; TANTAOUI-ELARAKI, A.; IBRAHIMY, A. Application of a two levels factorial design to the study of the antimicrobial activity of three terpenes. **Science des Aliments**, v. 15, p. 571-578, 1995.

BHAT, S. et al. Photoregulation of adventitious and axillary shoot proliferation in menthol mint, *Mentha arvensis*. **Current Science**, v. 80, n. 7, p. 878-880, 2001.

BOECKELMANN, A. Monoterpene production and regulation in lavenders (*Lavandula angustifolia* and *Lavandula x intermedia*). **Thesis Master of Science**. University of British Columbia, Okanagan. 2008. 86 p.

BOELENS, M.H. Chemical and sensory evaluation of *Lavandula* oils. **Perfum Flavour**, v. 20, p. 23-51, 1995.

BOZHANOV, S.; KARADJOVA, I.; ALEKSANDROV, S. Determinação of trace elements in the lavender inflorescence (*Lavandula angustifolia* Mill.) – lavender oil system. **Microchemical Journal** (2007).

CABRAL, G. B. et al. **Introdução *in vitro*, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria* sp.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 4p. (Comunicado Técnico 101).

CALVO, M. C.; SEGURA, J. *In vitro* propagation of Lavender. **HortScience**, v. 24, n. 2, p. 375-376, 1989.

CARVALHO, J. M. F. C. de. **Técnicas de micropropagação.** Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 1999. 39 p. (Documentos 64).

CARVALHO, G.R. et al. Aclimatização de plantas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas “*in vitro*”. **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, n.3, p.483-490, 1999.

CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, M.M.A.; MEDEIROS, M.J.L. **Fatores inerentes à micropropagação.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 5p. (Documentos 148).

CHEMAT, F. et al. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, p. 157-160, 2006.

CHU, C.J.; KEMPER, J.K. Lavender (*Lavandula* spp). **Longwood Herbal Task Force**, p. 1-32, 2001.

DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**, v. 59, p. 270-276, 1983.

DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. A scheme for the commercial propagation of plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, v.14, n.4, p.335-345, 1981.

DEBERGH, P.C. et al. Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 30, p. 135-140, 1992.

DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Eds). **Micropropagation technology and application**. 2 ed. Netherlands: Klumer Academic, 1993. p. 1-13.

DIAS, M. C.; ALMEIDA, R.; ROMANO, A. Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L'Hér through *in vitro* axillary shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, p. 99-102, 2002.

ECHEVERRIGARAY, S.; BASSO, R.; ANDRADE, L. B. Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 3, p. 439-442, 2005.

ELISABETSKY, E.; BRUM, L.F.S.; SOUZA, D.O. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. **Phytomedicine**, v. 6, p. 107-113, 1999.

ELISABETSKY, E.; BRUM, L.F.S.; SOUZA, D.O. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. **Phytomedicine**, v. 6, p. 107-113, 1999.

ELISABETSKY, E.; MARSCHNER, J.; SOUZA, D.O. Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. **Neurochemical Research**, v. 20, p. 461-465, 1995.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agraria**, v. 6, n. 2, p. 91-96, 2005.

FACHINELLO, J.C. et al. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Tecnológicas, 2005. 221 p.

FAHN, A. Secretory tissues in vascular plants. **New Phytologist**, v. 108, n. 3, p. 229-257, 1988.

FEYISSA, T.; WELANDER, M.; NEGASH, L. Genetic stability, *ex vitro* rooting and gene expression studies in *Hagenia abyssinica*. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 1, p. 15-21, 2007.

FLORES, G. et al. Enantiomeric composition studies in *Lavandula* species using supercritical fluids. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 2333-2338, 2005.

GEORGE, F. E.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. The Background. 3. ed., vol. 1. 2008. 473 p.

GHELARDINI, C. et al. Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. **Planta Medica**, v. 65, p. 700-703, 1999.

GRATTAPGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. V. I, Brasília: EMBRAPA, 1998, 508 p.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Phytochemistry of the genus *Lavandula*. In: LIS-BALCHIN, M. (Ed.). **Lavender: the genus *Lavandula***. London: Tayler & Francis, 2002. p. 86-100.

HAY, R.K.M.; SVOBODA, K.P. Botany. IN: HAY, R.K.M.; WATERMAN, P.G. **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production**. Essex: Longman Group, 1993. p. 5-19.

JORDAN, A. M.; CALVO, M. C.; SEGURA, J. Micropropagation of adult *Lavandula dentata* plants. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 73, p. 93-96, 1998.

JUN TAKANE, R.; MINAMI, K.; LUCCHESI, A.A.; DE ALMEIDA, M. Influência do cloreto de cálcio no crescimento de explantes de *Gypsophila paniculata* L. (Caryophyllaceae), cultivados *in vitro*. **Sciencia Agricola**, v. 51, n. 2, p. 235-239, 1994.

KAJIKI, F. O.; SHEPHERD, S. L. K. Micropropagação da espécie nativa *Baccharis tridentata* Vahl. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 2, p. 42-47, 2006.

KARHU, S.T. Rooting of blue honeysuckle microshoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 48, p. 153-159, 1997.

KEI-ICHIRO, U.; SUSAN, C.; KALIDAS, S. Reduced hyperhydricity and enhanced growth of tissue culture-generated raspberry (*Rubus* sp.) clonal lines by *Pseudomonas* sp. isolated from oregano. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 441-445, 1998.

KEVERS, C.; GASPAR, T. Vitrification of carnation *in vitro*: changes in water content, extracellular space, air volume and ion levels. **Physiologie Végétale**, v. 24, n. 6, p. 647-653, 1986.

KREIS, P.; MOSANDL, A. Chiral compounds of essential oils. Simultaneous stereoanalysis of *Lavandula* oil constituents. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 7, p. 187-193, 1992.

LALANDE, B. Lavender, lavandin and other French oils. **Perfumer & Flavorist**, v. 9, p. 117-121, 1984.

LEAL, J.D.Y. et al. Cânfora: um bom modelo para ilustrar técnicas de RMN. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2053-2056, 2007.

LESHEM, B.; WERKER, B.; SHALEV, D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, v. 62, p. 271-276, 1988.

LINSMAIER, E. M.; SKOOG, F. Organic growth factors requirements of tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 18, p. 100-127, 1965.

LIS-BALCHIN, M. **Lavender: The genus *Lavandula***. 1 ed. Taylor and Francis Inc., New York. 2002.

LIU,Z.; LI, Z. Micropropagation of *Camptotheca acuminata* Decaisne from axillary buds, shoots tips, and seed embryos in a tissue culture system. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 37, p. 84-88, 2001.

LORENZI, H. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

MARTIN, K.P. Rapid *in vitro* multiplication and *ex vitro* rooting of *Rotula aquatica* Lour., a rare rheophytic woody medicinal plant. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 415-420, 2003.

MARTIN, K.P.; BENNA, M.R.; JOSEPH, D. High frequency axillary bud multiplication and *ex vitro* rooting of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. – A medicinal plant. **Indian Journal Experimental Biology**, v. 41, n. 3, p. 262-266, 2003.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. Editora UFV. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. 2000. 220p.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p. 135-166, 1974.

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

NOBRE, J. *In vitro* cloning and micropropagation of *Lavandula stoechas* from field-grown plants. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 46, p. 151-155, 1996.

NOGUEIRA, J.M.F.; ROMANO, A. Essential oils from micropropagated plants of *Lavandula viridis*. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 4-7, 2002.

PIAGNANI, C.; ZOCCHI, G.; MIGNANI, I. Influence of Ca^{2+} and 6-benzyladenine on chestnut (*Castanea sativa* Mill.) *in vitro* shoot-tip necrosis. **Plant Science**, v. 118, p. 89-95, 1996.

PIERIK, R.L.M. Produccion de plantas libres de enfermedades In: PIERIK, R.L.M. (Ed.) **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mundi-Pronsa, 1990. p.169-180.

PRATES, H.T. et al. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beav.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 2, p. 193-197, 1998.

QUAZI, M.H. *In vitro* multiplication of *Lavandula* spp. **Annals of Botany**, v.45, n.3, p.361-362, 1980.

SÁNCHEZ-GRAS, M.C.; CALVO, M.C. Micropropagation of *Lavandula latifolia* through nodal bud culture of mature plants. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 45, p. 259-261, 1996.

SHORT, K. C.; ROBERTS, A. V. *Rosa* spp (Roses): *In vitro* culture, micropropagation and production of secondary products. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed). **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants**. III, v. 15. Berlin: Springer Verlag, 1991, p. 376-397.

SILVA, S.R.S. et al. Análise dos constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Chell. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 1, p. 63-70, 2007.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. **Symposium of Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-131, 1957.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

SUDRIÁ, C. et al. Influence of plant growth regulators on the growth and essential oil content of cultured *Lavandula dentata* plantlets. **Plant Cell, Tissue**

and Organ Culture, v. 58, n. 3, p. 177-184, 1999.

SUDRIÁ, C. et al. Effect of benzyladenine and indolebutyric acid on ultrastructure, glands formation, and essential oil accumulation in *Lavandula dentata* plantlets. **Biologia Plantarum**, v. 44, n. 1, p. 1-6, 2001.

SUGAWARA, Y. et al. Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalool. **Analytica Chimica Acta**, v. 365, p. 293-299, 1998.

SUNANDAKUMARI, C. et al. Rapid axillary bud proliferation and *ex vitro* rooting of herbal spice, *Mentha piperita* L. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 108-112, 2004.

SUTTER, E.G.; LANNGHANS, R.W. Epicuticular formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip cultura. **Journal of the American society for Horticultural Science**, v. 104, n. 4, p. 493-496, 1979.

SUTTER, E. G.; HUTZELL, M. Use of humidity tests and antitranspirant on the acclimatization of tissue cultured plant to the greenhouse. **Scientia Horticulturae**, v. 23, p. 303-312, 1984.

UPSON, T. The taxonomy of the genus *Lavandula* L. In: LIS-BALCHIN, M. **The Genus Lavandula**. Taylor and Francis, London, 2002, v.2, p. 2.

UPSON, T.; ANDREWS, S. **The genus Lavandula**. 1a. Ed. Timber Press, Inc., USA. 2004.

URWIN, N. Improvement of lavender varieties by manipulation of chromosome number. **Rural Industries Research and Development Corporation**, n. 08/200, 2009. 20 p.

VIEITEZ, A.M. et al. Anatomical and chemical studies of vitried shoots of chestnut regenerated *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 5, p. 177-184, 1985.

VITTI, G.C.; LIMA, E.; CICARONE, F. Cálcio, magnésio e enxofre. In: FERNANDES, M.S. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa – MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 299-326, 2006.

WEI, R.B.; YUAN, Z.Y.; LI, H.X. Solid acid-catalysed synthesis of linalyl acetate in the presence of HMCM-4. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 127, n. 12, p. 811-814, 1998.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 45-69. 1991.

ZIV, M.; SCHWARTZ, A.; FLEMINGER, D. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*, implications for hardening. **Plant Science**, v. 52, p. 127-134, 1987.

ZUZARTE, M. R. et al. Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 580-587, 2010.

3 CAPÍTULO I

MICROPROPAGAÇÃO DE *Lavandula angustifolia* MILL.

RESUMO

Lavandula angustifolia Mill. é uma importante planta produtora de óleos essenciais, que apresenta dificuldade de propagação pelo enraizamento de estacas, sendo a micropropagação uma alternativa para a propagação vegetativa da espécie. Um protocolo de micropropagação foi desenvolvido a partir da regeneração de ápices caulinares de *L. angustifolia* cv. Provence Blue. O meio de cultura LS apresentou melhor resposta no desenvolvimento das brotações, não sendo observadas brotações com necrose apical. Meios de cultura mais diluídos como o ½ MS e o WPM, apresentaram altas taxas de hiperidricidade e necrose apical das brotações. Para o enraizamento *in vitro* das brotações os reguladores vegetais, ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA), inibiram a emissão de raízes, obtendo-se maior porcentagem de enraizamento com o controle (47%). Quando todas as microestacas, enraizadas e não enraizadas, foram transferidas para a aclimatização, a porcentagem de enraizamento aumentou para 95%. A sobrevivência das plantas na aclimatização foi de 88%. As microestacas de *L. angustifolia* podem ser enraizadas diretamente em substrato, sem passar pela fase de enraizamento *in vitro*.

Palavras-Chave: Lamiaceae, reguladores vegetais, meio de cultura, enraizamento, aclimatização.

MICROPROPAGATION OF THE *Lavandula angustifolia* MILL.

ABSTRACT

Lavandula angustifolia Mill. is an important ornamental and essential oil producing plant. The propagation by stem cuttings is slow, with poor rooting. Thus, micropropagation is proposed to be an alternative for vegetative propagation of this species. A micropropagation protocol was developed from the regeneration of shoot tips of *L. angustifolia* cv. Provence Blue. The culture medium LS showed a better response in the shoot development, apical necrosis was not observed on this culture medium. Culture media ½ salt strength MS medium and WPM showed high rates of hyperhydricity and apical necrosis of shoots. Shoots treated with indolebutyric acid (IBA) and naphthalene acetic acid (NAA) had inhibited rooting, higher rooting was obtained with control (47%). When all microcuttings rooted and unrooted were transferred to acclimatization the rooting percentage increased to 95%. The survival of plants in the acclimatization was 88%. Microshoots of *L. angustifolia* may be rooted directly in the substrate without passing through *in vitro* rooting phase.

Key words: Lamiaceae, plant growth regulators, culture medium, rooting, acclimatization.

3.1 INTRODUÇÃO

A *Lavandula angustifolia* Mill., popularmente conhecida pelo seu aroma, é uma espécie de grande importância comercial cultivada em várias regiões de clima temperado do mundo todo, devido ao seu grande potencial na produção de óleo essencial, com altos teores de linalol e acetato de linalila (MOON; WILKINSON; CAVANAGH, 2006), que pode ser extraído de suas folhas ou flores, sendo empregado nas indústrias cosmética, alimentícia, farmacêutica e de perfumaria (TSURO; KODA; INOUE, 2000).

A propagação de *L. angustifolia* por sementes não é recomendada, devido à alta variabilidade genética conferida às plantas. O uso da estaquia é relatado na literatura como uma técnica pouco eficiente na propagação da espécie, devido à dificuldade de enraizamento das estacas (PANIZZA; TOGNONI, 1991; BIASI; DESCHAMPS, 2009). Com a cultura de tecidos, a micropropagação vem se mostrando uma alternativa para a produção de mudas de diversas espécies, inclusive do gênero *Lavandula* (DIAS; ALMEIDA; ROMANO, 2002; NOGUEIRA; ROMANO, 2002; ECHEVERRIGARAY; BASSO; ANDRADE, 2005).

São muitos os fatores que estão envolvidos em um protocolo eficiente de regeneração, entre eles estão o tipo de meio de cultura, seguido do suplemento de reguladores de crescimento, concentração de sacarose, iluminação, tipo de explante, entre outros (ZHANG et al., 2003). Protocolos de micropropagação vêm sendo desenvolvidos para que as condições de cultivo *in vitro* sejam otimizadas, possibilitando a obtenção de taxas elevadas de multiplicação com qualidade das mudas. A propagação *in vitro* tem sido aplicada para diversas espécies de *Lavandula*, onde a regeneração das plantas é realizada via organogênese direta e indireta utilizando diferentes tipos de explantes e meios de cultura. Estudos preliminares de embriogênese somática foram realizados para *L. angustifolia* por Kintzios et al. (2002). Para *L. latifolia* foram produzidas brotações diretamente dos tecidos dos explantes por Calvo e Segura (1989) e Sánchez-Gras e Calvo

(1996), e também a partir de calos (CALVO; SEGURA, 1989; JORDAN et al. 1998), assim como para *L. angustifolia* (QUAZI, 1980; TSURO; KODA; INOUE, 2000) e o híbrido lavandin (PANIZZA; TOGNONI, 1991). Gemas axilares de plantas adultas foram utilizadas para iniciar o cultivo *in vitro* de *L. angustifolia* (ANDRADE et al., 1999). O meio de cultura mais utilizado na micropropagação de espécies de *Lavandula* foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Avaliando diferentes meios de cultura para a multiplicação de brotações de *L. dentata*, Echeverrigaray, Basso e Andrade (2005) observaram que a composição dos meios de cultura apresentaram resultados contrastantes na proliferação das brotações, sendo que os meios de cultura MS e LS (LINSMAIER; SKOOG, 1965) promoveram maior taxa de multiplicação e maior comprimento das brotações, e o meio de cultura QL (QUOIRIN; LEPOIVRE, 1977) menor taxa de multiplicação das brotações. A utilização de reguladores vegetais nas diferentes fases da micropropagação tem promovido respostas diversas entre as espécies de *Lavandula*.

A partir da micropropagação é possível a produção comercial em larga escala de plantas geneticamente idênticas à planta matriz, que é extremamente importante para a propagação de genótipos selecionados e quimiotipos (ANDRADE et al., 1999). Neste contexto, este trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação de *L. angustifolia* cv. Provence Blue para a obtenção de plantas, visando a produção de óleos essenciais.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.2.1 Condições de cultivo *in vitro*

Todas as culturas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento, sob luz fluorescente branca fria com densidade de fluxo de fótons de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Todos os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,8 e foram autoclavados durante 20 min a 120°C .

3.2.2 Estabelecimento *in vitro*

Os explantes utilizados, para iniciar as culturas *in vitro*, foram ápices caulinares de aproximadamente 5,0 mm de comprimento, coletados de uma única planta matriz de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, cultivada em vaso contendo solo como substrato e mantida em casa de vegetação. Para a desinfestação, os explantes foram lavados em água corrente seguido de tratamento com Cercobin[®] (2%) por 40 min. Em seguida foi realizada imersão em etanol (70%) por 20 s e tratamento com hipoclorito de sódio (1%) mais Tween-20[®] (0,2%) por 20 min, após quatro lavagens em água deionizada esterilizada.

Os ápices caulinares foram isolados individualmente em frascos, tampados com papel alumínio, contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com $0,5 \mu\text{M}$ de BAP e 6 g L^{-1} de ágar (Vetec[®]).

3.2.3 Efeito da composição do meio de cultura na multiplicação das brotações

As brotações obtidas a partir do cultivo inicial, padronizadas com 1,0 cm de comprimento e um par de folhas, foram cultivadas nos diferentes meios de cultura MS, MS/2(MS com a metade da concentração de sais), LS (LINSMAIER; SKOOG, 1965) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980)

suplementados com as vitaminas do meio MS (exceto o meio de cultura LS, suplementado somente com $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ de tiamina), 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 30 g L^{-1} de sacarose, $1,0 \text{ }\mu\text{M}$ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 6 g L^{-1} de ágar (Vetec[®]). Foram utilizados frascos de 250 mL, contendo 20 mL de meio de cultura, tampados com tampas de polipropileno. Em cada frasco foram inoculados cinco explantes. Após 40 dias de cultivo, as variáveis analisadas foram altura (cm) das brotações, número de folhas, número de brotações por explante, porcentagem de hiperidricidade e porcentagem de necrose apical. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições e 10 explantes por parcela. O experimento foi repetido duas vezes.

3.2.4 Enraizamento *in vitro* das brotações

As brotações provenientes da fase de multiplicação foram seccionadas em microestacas com 1,0 cm de comprimento e foram cultivadas em meio de cultura MS, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e 6 g L^{-1} de ágar (Vetec[®]). Os efeitos das auxinas ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA) foram comparados nas concentrações de 0; 0,5; 1,0 e 2,0 μM . Foram utilizados frascos de 250 mL, contendo 20 mL de meio de cultura, tampados com tampa de polipropileno. Em cada frasco foram inoculados cinco explantes. O delineamento experimental em blocos casualizados em esquema fatorial 2x4 (duas auxinas e quatro concentrações), com quatro repetições e 10 microestacas por parcela. Após 30 dias de cultivo foram avaliadas as variáveis porcentagem de enraizamento, número de raízes por brotação, comprimento das raízes principais (cm) e altura das plantas (cm).

3.2.5 Aclimatização

As plantas obtidas na etapa de enraizamento *in vitro* foram retiradas dos frascos de cultivo, lavadas em água corrente e, independente da presença ou ausência de raízes, foram transferidas para tubetes plásticos de 53 cm^3 contendo o substrato comercial Plantmax HT[®]. Todos os tratamentos realizados no

enraizamento *in vitro* foram mantidos em câmara de nebulização intermitente durante 15 dias, seguido da transferência para casa de vegetação com rega manual por mais 15 dias. A avaliação foi realizada após 30 dias de aclimatização e as variáveis analisadas foram as porcentagens de enraizamento e sobrevivência. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições e 10 microplantas por parcela.

3.2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Dados em porcentagem foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa ASSISTAT versão 7.5 (SILVA; AZEVEDO, 2006).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Estabelecimento *in vitro*

O tratamento de desinfestação utilizado foi eficiente para o estabelecimento dos ápices caulinares de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, proporcionando uma taxa de 83% dos explantes assépticos e com indução de brotações. Resultados semelhantes foram obtidos no estabelecimento *in vitro* de *L. pedunculata*, em que mais de 84% dos explantes sobreviveram, após a desinfestação (ZUZARTE et al., 2010).

3.3.2 Efeito da composição do meio de cultura na multiplicação das brotações

De acordo com os resultados observados, os meios de cultura comparados para a micropropagação de *L. angustifolia* cv. Provence Blue demonstraram efeito significativo para todas as variáveis analisadas, caracterizando que a composição do meio de cultura influencia a morfogênese *in vitro*, pois os meios de cultura comparados apresentaram diferentes respostas no desenvolvimento das brotações (Figura 3A). Com relação à altura das brotações, o meio de cultura MS proporcionou melhores resultados, obtendo-se brotações de 2,3 cm em média. Para os meios de cultura MS/2 e WPM, os resultados observados foram inferiores (1,3 cm e 1,5 cm, respectivamente). Os efeitos dos meios de cultura MS/2 e WPM também foram responsáveis pela redução do número de folhas por brotação e o número de brotações por explante, em comparação aos meios de cultura MS e LS (Tabela 1). Esses resultados podem estar relacionados com a menor quantidade de nitrogênio presente nos meios de cultura MS/2 (30 mM) e WPM (14,71 mM) em comparação aos meios MS (60 mM) e LS (60 mM), pois a quantidade de nitrogênio no meio de cultura tem grande influência na taxa de crescimento, morfologia e totipotência celular (KIRBY; LEUSTEK; LEE, 1987). Para espécies lenhosas, como *Aspidosperma polyneuron* e *Vaccinium ashei*, o meio de cultura WPM apresentou resultados superiores na micropropagação dessas espécies

(RIBAS et al., 2005; SILVA et al., 2006), demonstrando que o desempenho das culturas *in vitro* depende de cada espécie.

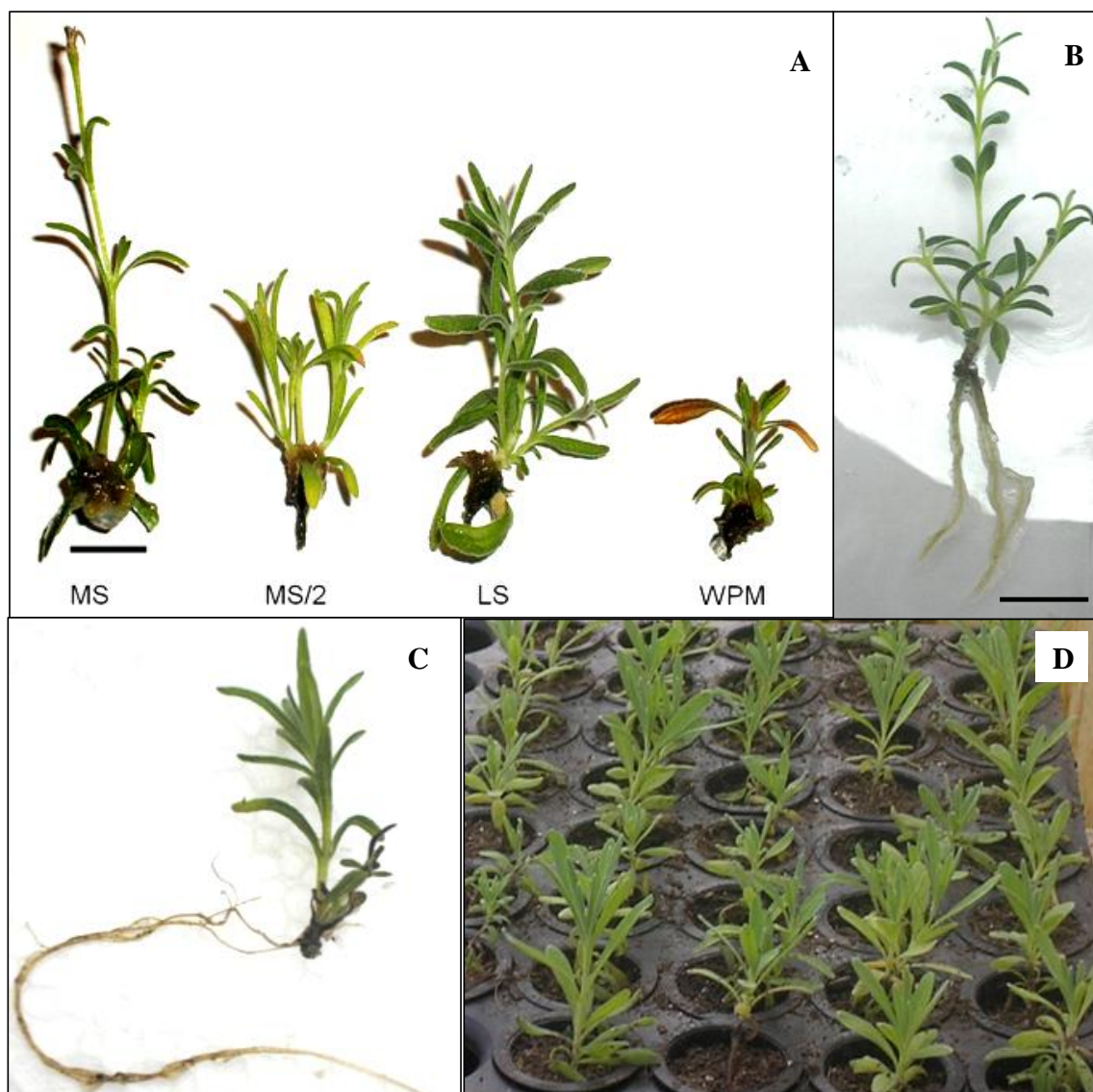


FIGURA 3 – Micropropagação de *L. angustifolia* cv. Provence Blue. (A) Brotações provenientes dos meios de cultura MS, MS/2, LS e WPM. (B) Raízes adventícias em brotações *in vitro* em meio de cultura MS sem regulador vegetal. (C) Microestaca enraizada *ex vitro*. (D) Plantas micropropagadas mantidas em casa de vegetação, após 30 dias de aclimatização. Barra: 1,0 cm.

TABELA 1 - Efeito de diferentes meios de cultura na altura (cm), número médio de folhas, número médio de brotações por explante, porcentagem de hiperidricidade e porcentagem de necrose apical de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, após 40 dias de cultivo.

Meio de cultura	Altura (cm) ¹	Número de folhas ¹	Brotações por explante ¹	Hiperidricidade (%) ¹	Necrose apical (%) ¹
MS	2,3±0,2 a	9,4±1,7 a	3,3±0,5 a	23 a	15 b
MS/2	1,3±0,2 d	6,4±0,5 b	2,8±0,1 ab	25 a	45 a
LS	1,7±0,1 b	9,0±1,2 a	3,1±0,3 ab	10 b	0 c
WPM	1,5±0,1 c	5,2±1,0 b	1,9±0,5 b	28 a	53 a
CV (%)	5,80	14,94	12,68	17,67	21,14

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$); Médias \pm desvio padrão.

A menor porcentagem de hiperidricidade foi observada durante o cultivo das brotações em meio de cultura LS, no qual 10% das brotações apresentaram-se hiperídricas. Para os demais meios de cultura comparados, a porcentagem de hiperidricidade foi superior e as taxas observadas foram 23-28% (Tabela 1). Sintomas de hiperidricidade no cultivo *in vitro* de espécies de *Lavandula* já foram relatados em outros estudos (ANDRADE et al., 1999; TSURO; KODA; INOUE, 2000; DIAS; ALMEIDA; ROMANO, 2002). Essa desordem do cultivo *in vitro* limita a aclimatização das plantas levando-as a morte durante essa fase. Os resultados apresentados no presente estudo demonstram que o meio de cultura é um fator relevante na eliminação do problema.

A necrose apical é outra desordem que pode ocorrer durante o processo de micropropagação, prejudicando o crescimento e que pode levar a morte da planta. Neste trabalho foram observados sintomas de necrose apical das brotações de *L. angustifolia* cv. Provence Blue em alguns meios de cultura utilizados. Brotações cultivadas no meio de cultura LS, não apresentaram sintoma de necrose apical, e no meio de cultura MS, 15% das brotações obtidas tiveram o sintoma. Na

composição do meio de cultura LS a concentração da vitamina B1 (tiamina) ($0,4 \text{ mg L}^{-1}$) é quatro vezes maior em relação a concentração adicionada aos demais meios testados e, glicina, piridoxina e ácido nicotínico não são adicionadas ao meio. Estes fatos podem ter influenciado nos resultados encontrados. Os meios de cultura MS/2 e WPM foram responsáveis pela maior porcentagem de indução de necrose apical das brotações (Tabela 1). Há uma tendência de se atribuir a necrose apical às altas concentrações de sais no meio de cultura, porém neste estudo os meios de cultura com concentrações de sais mais baixas aumentaram a necrose apical das brotações de *L. angustifolia* cv. Provence Blue. As formulações salinas do meio de cultura MS/2 e WPM apresentam nas suas composições menor força iônica total, 46,46 mM e 41,06 mM respectivamente, comparadas as dos meios MS e LS (92,92 mM).

3.3.3 Enraizamento e aclimatização

Após 30 dias de cultivo em meio de cultura de enraizamento, a análise de variância não revelou efeito significativo dos tratamentos sobre a altura das plantas, e os valores variaram de 1,1 cm a 1,6 cm de altura (Tabela 2). Isso demonstra que tanto AIB quanto ANA, nas diferentes concentrações testadas, não tiveram interferência na altura das plantas.

A ausência de auxina no meio de enraizamento promoveu maior porcentagem de microestacas enraizadas *in vitro* (47%) (Tabela 2), apresentando bom desenvolvimento das raízes nessa condição (Figura 3B). Similarmente, a ausência de auxina aumentou o enraizamento de *L. viridis* (83,2%) (DIAS; ALMEIDA; ROMANO, 2002), e promoveu 95% de enraizamento de *L. latifolia* (CALVO; SEGURA, 1989). Chishti et al. (2006), atribuíram o enraizamento das brotações em meio de cultura sem regulador vegetal às altas concentrações de auxinas endógenas. Porém, as porcentagens de enraizamento obtidas no presente trabalho não foram satisfatórias, para todos os tratamentos, o que podem estar relacionadas com o meio de cultura MS. Em outro estudo, também com *L. angustifolia*, foram obtidos 92,7% de enraizamento em meio de cultura MS com

¼ da concentração dos sais (ANDRADE et al., 1999), e para *L. latifolia* e *L. dentata* os sais do meio de cultura MS foram reduzidos à metade (SÁNCHEZ-GRAS; CALVO, 1996; JORDAN; CALVO; SEGURA, 1998). Mesmo na presença de auxinas, altas concentrações de sais tendem a inibir todas as fases do enraizamento, particularmente a de crescimento das raízes (BOPANA; SAXENA, 2008).

TABELA 2 - Efeito de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA) no meio de cultura de enraizamento sobre a altura (cm), número de raízes principais, comprimento das raízes principais (cm) e porcentagem de enraizamento das microestacas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Concentrações (μM)	Altura (cm) ^{ns}		Número de raízes ¹	
	AIB	ANA	AIB	ANA
0,0	1,5 \pm 0,1	1,6 \pm 0,2	2,2 \pm 0,2 aA	2,2 \pm 0,1 aA
0,5	1,6 \pm 0,1	1,3 \pm 0,2	0,5 \pm 0,3 cA	0,3 \pm 0,1 bA
1,0	1,1 \pm 0,1	1,3 \pm 0,2	1,3 \pm 0,3 bA	0,3 \pm 0,2 bB
2,0	1,5 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0 dA	0,0 \pm 0,0 bA
CV (%)	9,92		20,99	
Concentrações (μM)	Comprimento das raízes (cm) ¹		Enraizamento (%) ¹	
	AIB	ANA	AIB	ANA
0,0	0,5 \pm 0,2 aA	0,7 \pm 0,2 bA	47,2 aA	47,5 aA
0,5	0,7 \pm 0,2 aA	0,5 \pm 0,2 bA	26,5 bA	16,7 bB
1,0	0,4 \pm 0,2 aB	1,2 \pm 0,1 aA	30,0 bA	20,5 bB
2,0	0,0 \pm 0,0 bA	0,0 \pm 0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA
CV (%)	35,69		10,97	

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 1% de probabilidade; ns – não significativo; médias \pm desvio padrão.

Os resultados demonstraram que após 30 dias em meio de cultura com auxina houve redução da emissão de raízes, chegando a 0% na concentração de 2,0 μM de AIB e ANA. Assim como para a porcentagem de enraizamento, o número de raízes principais por microestacas foi maior quando não foi adicionada auxina no meio de cultura, ocorrendo redução no número de raízes na presença de AIB e ANA (Tabela 2). Diferentes respostas na indução de enraizamento *in vitro* de lavandas com adição de reguladores vegetais já foram observadas. Para *L. latifolia* a auxina ANA inibiu o enraizamento das microestacas (SÁNCHEZ-GRAS et al., 1996), porém para as espécies *L. stoechas* (NOBRE, 1996), *L. dentata* (ECHEVERRIGARAY; BASSO; ANDRADE, 2005) e para o híbrido lavandin (PANIZZA; TOGNONI, 1991) foi eficiente na emissão de raízes *in vitro*. A aplicação de 0,5 - 1,0 mg L^{-1} de AIB levou a maior emissão de raízes de *L. angustifolia* (CHISHTI et al., 2006).

Após a fase de enraizamento *in vitro*, todas as microestacas, com ou sem raízes, foram aclimatizadas. A transferência das microestacas não enraizadas para o substrato elevou a porcentagem de enraizamento, e valores compreendidos entre 73% a 95% foram obtidos (Tabela 3). Os resultados observados sugerem que para *L. angustifolia* o enraizamento *ex vitro* seja uma alternativa para otimizar o processo de micropropagação. A atividade do cambium vascular pode não ser iniciada em raízes *in vitro* até que as microestacas enraizadas sejam transplantadas para as condições *ex vitro* (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

TABELA 3 - Efeito de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA) *in vitro* na porcentagem de enraizamento e aclimatização das plantas micropropagadas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, após 30 dias da transferência para casa de vegetação.

Concentrações (μ M)	Enraizamento (%) ¹		Sobrevivência (%) ¹	
	AIB	ANA	AIB	ANA
0,0	88 aA	90 aA	85 aA	70 bB
0,5	90 aA	83 bB	80 aA	88 aA
1,0	88 aA	95 aA	43 bB	88 aA
2,0	83 aA	73 cB	83 aA	68 bB
CV (%)	6,57		9,43	

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

A porcentagem de sobrevivência das plantas foi de 43%-88% (Tabela 3). A espécie *L. viridis* teve 80% de sobrevivência na fase de aclimatização (NOGUEIRA; ROMANO, 2002). As plantas do híbrido lavandin, regeneradas a partir de folhas, foram aclimatizadas obtendo-se 100% de sobrevivência (DRONNE et al., 1999). Esses resultados indicam que a aclimatização não é uma etapa limitante para o sucesso da micropropagação, apesar de ser uma fase considerada muitas vezes difícil de ser alcançada na micropropagação de muitas espécies.

3.4 CONCLUSÕES

Para a micropropagação de *L. angustifolia* cv. Provence Blue o meio de cultura LS foi mais adequado, por manter a qualidade das brotações na fase de multiplicação, com baixa taxa de hiperidricidade e ausência de necrose apical das brotações.

As auxinas AIB e ANA no meio de enraizamento inibem a emissão das raízes *in vitro*, promovendo baixas taxas de enraizamento, e em concentrações mais elevadas (2,0 μM) o enraizamento é totalmente ausente.

3.5 REFERÊNCIAS

ANDRADE, L. B. et al. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, p. 79-83, 1999.

BIASI, L.A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. 1. ed. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009. 160 p.

BOPANA, N.; SAXENA, S. *In vitro* propagation of a high value medicinal plant: *Asparagus racemosus* Willd. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 44, n. 06, p. 525-532, 2008.

CALVO, M. C.; SEGURA, J. *In vitro* propagation of lavender. **HortScience**, v. 24, p. 375-376, 1989.

CHISHTI, N. et al. Rapid *in vitro* clonal propagation of *Lavandula officinalis* Chaix: a multipurpose plant of industrial importance. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 09, n. 03, p. 514-518, 2006.

DIAS, M. C.; ALMEIDA, R.; ROMANO, A. Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L'Hér through *in vitro* axillary shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, p. 99-102, 2002.

DRONNE, S. et al. A simple and efficient method for *in vitro* shoot regeneration from leaves of Lavandin (*Lavandula x intermedia* Emerck exloiseleur). **Plant Cell Report**, v. 18, p. 429-433, 1999.

ECHEVERRIGARAY, S.; BASSO, R.; ANDRADE, L. B. Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants. **Biologia Plantarum**, v. 49, p. 439-442, 2005.

GEORGE, E. F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. The Background. 3. ed., vol.1. 2008. 473 p.

JORDAN, A. M.; CALVO, M. C.; SEGURA, J. Micropropagation of adult *Lavandula dentata* plants. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 73, p. 93-96, 1998.

KINTZIOS, S. et al. The effects of light on callus growth and somatic embryogenesis from *Lavandula vera* and *Teucrium chamaedrys*: a preliminary study. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 09, n. 02, p. 223-227, 2002.

KIRBY, E.G.; LEUSTEK, T.; LEE, M.S. Nitrogen Nutrition. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Eds.). **Handbook of Plant Cell Culture**. New York: Macmillan Publishing Company, 1987. p.396-434.

LINSMAIER, E. M.; SKOOG, F. Organic growth factors requirements of tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 18, p. 100-127, 1965.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceeding International Plant Propagator's Society**, v. 30, p. 421-427, 1980.

MOON, T.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Antibacterial activity of essential oils, hydrosols and plant extracts from Australian grown *Lavandula* spp. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 16, p. 9-14, 2006.

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

NOBRE, J. *In vitro* cloning and micropropagation of *Lavandula stoechas* from field-grown plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 46, p. 151-155, 1996.

NOGUEIRA, J. M. F.; ROMANO, A. Essential oils from micropropagation plants of *Lavandula viridis*. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 4-7, 2002.

PANIZZA, M.; TOGNONI, F. Micropropagation of Lavandin (*Lavandula officinalis* Chaix x *Lavandula latifolia* Villars cv. Grosso). In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. New York: Spring. 1991. p. 295-305.

QUAZI, M. K. *In vitro* multiplication of *Lavandula* spp. **Annals of Botany**, v. 45, p. 361-362, 1980.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieu adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, v. 78, p. 437-442, 1977.

RIBAS, L. L. F. et al. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, v. 29, n. 04, p. 517-524, 2005.

SÁNCHEZ-GRAS, M. C.; CALVO, M. C. Micropropagation of *Lavandula latifolia* through nodal bud culture of mature plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, p. 259-261, 1996.

SILVA, F.; AZEVEDO, C. A. V. A new version of the assistat statistical assistance software. In: World Congress on Computers in Agriculture, 4., Orlando-FL-USA. **Anais...** Orlando: American Society of Agricultural Engineers, 2006. p.393-396.

SILVA, L. C. et al. Meio nutritivo, reguladores de crescimento e frio no estabelecimento *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Delite. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 04, p. 405-408, 2006.

TSURO, M.; KODA, M.; INOUE, M. Efficient plant regeneration from multiple shoots formed in the leaf-derived callus of *Lavandula vera*, using the “open culture system”. **Scientia Horticulturae**, v. 86, p. 81-88, 2000.

ZHANG, L. et al. Factors influencing shoot regeneration from cotyledons of tetraploid *Isatis indigotica* F. **In Vitro-Plant**, v. 39, p. 459-462, 2003.

ZUZARTE, M. R. et al. Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 580-587, 2010.

4 CAPÍTULO II

REDUÇÃO DA NECROSE APICAL E HIPERIDRICIDADE DE PLANTAS DE *Lavandula angustifolia* MILL. CULTIVADAS *IN VITRO*

RESUMO

A necrose apical e hiperidricidade que ocorrem em plantas cultivadas *in vitro* podem inviabilizar o processo de micropropagação. Em lavanda micropropagada estes problemas são frequentes, dificultando a obtenção de protocolos eficientes. O objetivo desse trabalho foi avaliar diferentes concentrações de cloreto de cálcio (CaCl_2) no meio de cultura sobre a necrose apical, hiperidricidade e no conteúdo de cálcio dos tecidos das brotações micropropagadas de *L. angustifolia*. Brotações micropropagadas de *L. angustifolia* foram subcultivadas em meio de cultura MS suplementado com as concentrações de 440, 880, 1.320, 1.760, 2.200 e 2.640 mg L^{-1} de CaCl_2 . Foram testadas as mesmas concentrações no meio de enraizamento. As avaliações foram realizadas a cada 40 dias. Foram determinados o conteúdo de Ca^{2+} nos tecidos das porções apical, mediana e basal das brotações cultivadas em meio de cultura suplementado com 440 mg L^{-1} e 1.320 mg L^{-1} de CaCl_2 , após dois subcultivos. O aumento da concentração de CaCl_2 no meio de cultura reduziu significativamente a necrose apical (de 35% de 0%, dependendo da concentração de CaCl_2) e hiperidricidade (de 62,5% até 5%, dependendo da concentração de CaCl_2) das brotações micropropagadas de *L. angustifolia*, apresentando efeito no enraizamento das brotações, pois afetou o comprimento e o número de raízes principais formadas, embora não tenha afetado o percentual de brotações enraizadas. A concentração de 1.320 mg L^{-1} de CaCl_2 no meio de cultura MS, durante a fase de multiplicação, foi a mais efetivas na redução da necrose apical e hiperidricidade das brotações, não interferindo na porcentagem de enraizamento. A adição de 1.320 mg L^{-1} de CaCl_2 no meio de cultura aumentou o conteúdo de Ca^{2+} nos tecidos, de 13,84 g kg^{-1} para 33,69 g kg^{-1} do Ca^{2+} total, com base na

massa seca. O acúmulo de Ca^{2+} nos tecidos das porções mediana e basal das brotações foi maior em relação à porção apical, tanto na concentração de 440 mg L^{-1} quanto para 1.320 mg L^{-1} de CaCl_2 .

Palavras-chave: Alfazema, micropropagação, cálcio.

REDUCTION OF APICAL NECROSIS AND HYPERHYDRICITY IN *IN VITRO* CULTURED *Lavandula angustifolia* Mill. PLANTLETS

ABSTRACT

The apical necrosis and hyperhydricity that occur in plants cultured *in vitro* may derail the plant micropropagation. In micropropagated lavender plants, these problems are common and difficult the obtention of efficient protocols. The objective of this study was to evaluate different concentrations of calcium chloride (CaCl₂) in the culture medium on apical necrosis, hyperhydricity and calcium content of micropropagated shoots of *L. angustifolia*. Micropropagated shoots of *L. angustifolia* were subcultivated on MS medium supplemented with concentration of 440; 880; 1,320; 1,760; 2,200 or 2,640 mg L⁻¹ CaCl₂ and were same concentrations compared in the rooting medium. The evaluations were performed every 40 days. It was determined the content of Ca²⁺ in the tissues of the apical, median and basal portions of shoots grown in culture medium supplemented with 440 mg L⁻¹ and 1,320 mg L⁻¹ of CaCl₂, after two subcultures. Increasing the concentration of CaCl₂ in the culture medium significantly reduced the hyperhydricity and apical necrosis of micropropagated shoots of *L. angustifolia* and showed effect on rooting of shoots, because it affected the length and number of roots formed, but did not affect the percentage of rooted shoots. The concentration of 1,320 mg L⁻¹ of CaCl₂ in MS culture medium during the multiplication phase was the most effective in hyperhydricity reducing and apical necrosis of the shoots and did not interfere with the rooting percentage. The addition of 1,320 mg L⁻¹ of CaCl₂ in the culture medium increased the levels of Ca²⁺ in the tissues from 13.84 g kg⁻¹ to 33.69 g kg⁻¹ of the total Ca²⁺, based on dry weight. Ca²⁺ accumulation in the tissues of the middle and basal portions of shoots was higher compared to the apical portion, both at 440 mg L⁻¹ and to 1,320 mg L⁻¹ CaCl₂.

Key words: Lavender, micropropagation, calcium.

4.1 INTRODUÇÃO

A *Lavandula angustifolia* (Lamiaceae), popularmente conhecida como lavanda ou alfazema, é considerada uma espécie medicinal e aromática de grande importância econômica, por constituir uma fonte rica de componentes bioativos (GHELARDINI et al., 1999). Seu óleo essencial contém geraniol, furfurool, linalol, cariofileno, acetato de linalila e cumarinas (MARTINS et al., 2000), e é amplamente utilizado na perfumaria, muito embora também seja empregado nas indústrias cosmética, alimentícia e farmacêutica (BOELENS, 1995; CHEMAT et al., 2006). Por exemplo, os compostos acetato de linalila e linalol, que são os dois mais importantes constituintes químicos do óleo essencial de *L. angustifolia* (JAGER et al., 1992), possuem propriedades sedativa (BUCHBAUER et al., 1991) e anestésica (GHELARDINI et al., 1999), e além disso, o linalol tem efeito antibacteriano (PATTNAIK; SUBRAMANYAM, 1997) e inseticida (JAGER et al., 1992).

Na propagação de *L. angustifolia* por sementes observa-se desuniformidade no desenvolvimento das mudas e das plantas a campo, devido à variabilidade natural resultante da propagação sexuada (BIASI; DESCHAMPS, 2009). A propagação por estaquia tem sido dificultada devido à baixa capacidade de enraizamento das estacas (CALVO; SEGURA, 1989). Uma alternativa para a propagação de *L. angustifolia* é a micropropagação, pois a sua aplicação tem possibilitado a obtenção de plantas geneticamente idênticas à planta matriz, em larga escala e em curto espaço de tempo. Porém, seu sucesso depende do controle da morfogênese, a qual é influenciada por vários fatores como espécie, cultivar, tipo de explante, componentes do meio nutritivo, reguladores de crescimento e ambiente de cultivo (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006).

O desajuste no controle desses fatores pode causar desordens fisiológicas nas plantas cultivadas *in vitro*, dentre as quais está a necrose apical, que prejudica o crescimento e pode causar a morte da planta, e a hiperidricidade, caracterizada por plantas com baixos níveis de celulose e lignina, baixa resistência de parede

celular (KEVERS; GASPAR, 1986), hipertrofia celular (VIEITEZ et al., 1985), baixo conteúdo de cálcio (KEVERS et al., 2004), folhas intumescidas e quebradiças (LESHEM; WERKER; SHALEV, 1988) e reduzida taxa de sobrevivência em condições autotróficas (RADMANN et al., 2001). Essas desordens podem estar relacionadas com a deficiência de cálcio na planta *in vitro*.

O cálcio é essencial para manter a integridade estrutural e funcional das membranas e da parede celular, sua deficiência leva à senescência precoce (MALAVOLTA, 2006). Esse nutriente depende da transpiração da planta para ser transportado no xilema, até as regiões meristemáticas de crescimento ativo (BIDDULPH, 1959). Os frascos de cultura utilizados na micropropagação retêm alta umidade relativa, suprimindo a taxa de transpiração das brotações cultivadas *in vitro*, que podem desenvolver deficiência de nutrientes menos móveis. Dessa forma, sugere-se que os sintomas de deficiência de cálcio na micropropagação estejam relacionados com sua mobilidade (BARGHCHI; ALDERSON, 1996). O enraizamento também é prejudicado pela deficiência de cálcio, pois afeta particularmente os pontos de crescimento da raiz (VITTI; LIMA; CICARONE, 2006).

Protocolos de micropropagação de *Lavandula* spp., descritos anteriormente, relatam a ocorrência de hiperidricidade nas brotações (ANDRADE et al., 1999; TSURO; KODA; INOUE, 2000; DIAS; ALMEIDA; ROMANO, 2002), porém não há indicações para a solução desse problema. Em estudos preliminares foram observadas necrose apical e hiperidricidade das brotações de *L. angustifolia in vitro*, limitando a obtenção de um protocolo eficiente. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes concentrações de cloreto de cálcio (CaCl_2) no meio de cultura sobre a necrose apical, hiperidricidade e no teor de cálcio do tecido vegetal das brotações micropropagadas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Estabelecimento *in vitro*

Ápices caulinares de aproximadamente 5,0 mm de comprimento foram coletados de planta matriz de *L. angustifolia* (cv. Provence Blue, proveniente da França) mantida em vaso contendo solo como substrato em casa de vegetação, em março de 2008. A assepsia foi realizada pela lavagem por uma hora em água corrente, seguida pelo tratamento com Cercobin[®] (2%) por 40 min, imersão em etanol (70%) por 20 s, hipoclorito de sódio (1%) combinado com Tween-20 (0,2%), por 20 min sob agitação e quatro lavagens em água deionizada e esterilizada, sendo este procedimento realizado em câmara de fluxo laminar.

Após a assepsia, os ápices caulinares foram cultivados individualmente em frascos contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,5 µM de BAP, 6 g L⁻¹ de ágar (Vetec[®]) e o pH foi ajustado para 5,8. Os meios de cultura foram esterilizados à temperatura de 121 °C, durante 20 min e 1,5 atm.

Para a manutenção das culturas *in vitro*, as brotações obtidas no cultivo inicial foram subcultivadas a cada 40 dias no mesmo meio de cultura anterior, porém suplementado com 1,0 µM de BAP.

4.2.2 Efeito de diferentes concentrações de CaCl₂ na redução da necrose apical e hiperidricidade das brotações de *L. angustifolia* cv. Provence Blue

Brotações de 2,0 cm de altura, provenientes do cultivo inicial, foram cultivadas em frascos de 250 mL contendo 30 mL de meio de cultura MS, concentrações de 440, 880, 1.320, 1.760, 2.200 e 2.640 mg L⁻¹ de CaCl₂, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,0 µM de BAP, 6 g L⁻¹ de ágar (Vetec[®]) e o pH foi ajustado para 5,8. Os meios de cultura foram esterilizados à temperatura de 121 °C, durante 20 min e 1,5 atm.

Foram realizadas duas avaliações a cada 40 dias. As variáveis analisadas foram altura das brotações (cm), número de folhas por brotação, número de

brotação por explante, porcentagem de hiperidricidade e porcentagem de necrose apical. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições e quatro frascos por parcela com cinco brotações por frasco.

4.2.3 Efeito de diferentes concentrações de CaCl_2 no enraizamento das brotações de *L. angustifolia* cv. Provence Blue

Na fase de enraizamento as brotações cultivadas em meio de cultura de multiplicação com diferentes concentrações de CaCl_2 , foram subcultivadas no mesmo meio de cultura descrito anteriormente, mas sem a adição de regulador de crescimento. Após 30 dias de cultivo foi avaliada a altura das plantas, número de raízes principais, comprimento das raízes e porcentagem de enraizamento.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições e quatro frascos por parcela com cinco brotações por frasco.

4.2.4 Influência do aumento de CaCl_2 do meio de cultura no teor de cálcio do tecido vegetal

Brotações de 2,0 cm de altura, provenientes do cultivo inicial, foram cultivadas em frascos de 250 mL contendo 30 mL de meio de cultura MS, concentrações de 440 mg L^{-1} ou 1.320 mg L^{-1} de CaCl_2 , 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 30 g L^{-1} de sacarose, 1,0 μM de BAP, 6 g L^{-1} de ágar (Vetec[®]) e o pH foi ajustado para 5,8. Os meios de cultura foram esterilizados à temperatura de 121 °C, durante 20 min e 1,5 atm.

Foram realizadas duas avaliações a cada 40 dias. As variáveis analisadas foram altura das brotações (cm), número de folhas por brotação, número de brotação por explante, porcentagem de enraizamento, porcentagem de hiperidricidade e porcentagem de necrose apical.

A determinação do conteúdo de Ca^{2+} no tecido vegetal foi realizada após o segundo subcultivo. As brotações foram seccionadas nas porções basal, mediana e apical, e colocadas em estufa a 60 °C para secar até massa constante, em seguida, as amostras foram enviadas para a análise na Fundação ABC. A análise

foi realizada pela extração com solução nitroperclórica (8:1) com digestão em vaso aberto. A determinação foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 2x2 (duas concentrações de CaCl_2 e dois subcultivos), com quatro repetições e 40 explantes por parcela.

4.2.5 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Dados em porcentagem foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$. O programa utilizado foi o ASSISTAT versão 7.5 beta (SILVA; AZEVEDO, 2006).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Efeito de diferentes concentrações de CaCl_2 na redução da necrose apical e hiperidricidade das brotações de *L. angustifolia* cv. Provence Blue

No primeiro subcultivo as concentrações de CaCl_2 não influenciaram estatisticamente a altura das brotações e o número de brotações por explante (Tabela 4). Concentrações muito elevadas de CaCl_2 (3.520 mg L^{-1}) no meio de cultura reduziu o crescimento de *Gypsophila paniculata*, sendo associado com o excesso de cálcio ou pela toxidez de cloro (JUN TAKANE et al., 1994). O número de folhas por brotação foi influenciado pelas concentrações de CaCl_2 nos dois subcultivos, sendo que as concentrações de 2.640 mg L^{-1} e 1.320 mg L^{-1} foram significativamente superiores no primeiro e segundo subcultivos, respectivamente (Tabela 4 e 5).

TABELA 4 – Altura (cm), número de folhas e brotações por explante de *L. angustifolia* Mill., no primeiro subcultivo, em meio de cultura MS suplementado com $1,0 \mu\text{M}$ BAP.

CaCl_2 (mg L^{-1})	Altura (cm) ¹	Nº folhas ²	Brotações/explante ¹
440	$1,8 \pm 0,38$	$7,8 \pm 0,29$ e	$3,1 \pm 0,22$
880	$2,4 \pm 0,31$	$11,0 \pm 1,86$ b	$2,5 \pm 0,66$
1.320	$2,4 \pm 0,24$	$8,5 \pm 0,95$ d	$3,0 \pm 0,68$
1.760	$2,5 \pm 0,26$	$9,7 \pm 0,14$ c	$3,0 \pm 0,85$
2.200	$2,3 \pm 0,73$	$10,0 \pm 2,30$ c	$3,0 \pm 1,28$
2.640	$2,7 \pm 0,39$	$12,5 \pm 1,78$ a	$2,0 \pm 0,34$
CV(%)	18,06	3,82	26,35

¹ Dados não diferem estatisticamente pela análise de variância.

² Letras seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade.

A altura das brotações no primeiro subcultivo, apesar de não haver diferença estatística significativa entre as médias, foi de 1,8 cm na concentração de 440 mg L^{-1} e 2,7 cm na concentração de 2.640 mg L^{-1} . O número de folhas no

primeiro subcultivo foi maior na concentração de 2.640 mg L⁻¹ (aproximadamente 13 folhas por brotação), quando comparado com a concentração de 440 mg L⁻¹ (aproximadamente 8 folhas por brotação). E no segundo subcultivo a altura das brotações e o número de folhas por brotação na concentração de 2.640 mg L⁻¹ foram estatisticamente maiores do que na concentração de 440 mg L⁻¹ (Tabelas 4 e 5).

No segundo subcultivo as diferentes concentrações de CaCl₂ também não influenciaram o número de brotações por explante (Tabela 5).

TABELA 5 – Altura (cm), número de folhas e brotações por explante de *L. angustifolia* Mill., no segundo subcultivo, em meio de cultura MS suplementado com 1,0 µM BAP.

CaCl ₂ (mg L ⁻¹)	Altura (cm) ²	Nº folhas ²	Brotações/explante ¹
440	1,7 ± 0,24 c	5,1 ± 0,58 c	2,1 ± 0,16
880	1,9 ± 0,21 bc	5,2 ± 0,68 c	2,7 ± 0,50
1.320	2,7 ± 0,39 a	11,1 ± 1,23 a	2,3 ± 0,33
1.760	1,5 ± 0,19 c	8,0 ± 1,63 b	2,2 ± 0,45
2.200	1,9 ± 0,50 bc	9,0 ± 2,04 b	2,4 ± 0,43
2.640	2,4 ± 0,17 ab	8,0 ± 0,36 b	2,8 ± 0,48
CV(%)	16,05	17,21	17,45

¹ Dados não diferem estatisticamente pela análise de variância.

² Letras seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade.

Foram observados sintomas de hiperidricidade nas brotações de *L. angustifolia* cultivadas *in vitro* (Figura 6A) em todos os tratamentos, porém foi verificada uma redução significativa da porcentagem de hiperidricidade nas concentrações mais elevadas de CaCl₂, em relação a concentração original do meio de cultura MS (440 mg L⁻¹) nos dois subcultivos avaliados (Figura 4). A hiperidricidade é um fenômeno que afeta a anatomia, a morfologia e a fisiologia das plantas (ZIV, 1996), podendo inviabilizar o processo de micropropagação, devido à baixa sobrevivência das plantas na aclimatização. A redução da

hiperidricidade com o aumento do cálcio no meio de cultura pode estar relacionada com a razão $\text{Ca}^{++}/\text{NH}_4^+$ no meio, pois a hiperidricidade pode ser induzida por uma proporção inadequada desses dois nutrientes (ZIV; SCHWARTZ; FLEMINGER, 1987). Em *Dianthus caryophyllus* observou-se uma redução na porcentagem de hiperidricidade das brotações quando foi utilizada a metade da concentração dos macronutrientes do meio de cultura mantendo-se somente a concentração normal de CaCl_2 (ZIV; SCHWARTZ; FLEMINGER, 1987). CUZZUOL et al. (1995) trabalhando com a mesma espécie, eliminaram parcialmente a hiperidricidade com o aumento de cálcio no meio de cultura, enquanto a ausência de CaCl_2 aumentou a hiperidricidade em 50%.

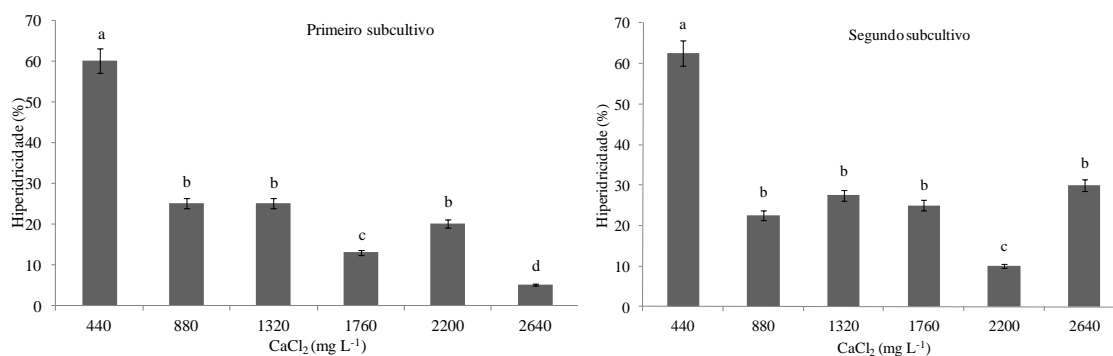


FIGURA 4 – Porcentagem de hiperidricidade das brotações de *L. angustifolia*, em função da concentração de CaCl_2 , no primeiro e segundo subcultivos. Barras: médias \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan entre os tratamentos estão indicadas por letras diferentes.

A porcentagem de necrose apical das brotações foi reduzida com o aumento de CaCl_2 no meio de cultura, no primeiro e segundo subcultivos (Figura 5). Esses resultados evidenciam que a necrose apical ocorrida nas brotações de *L. angustifolia in vitro* (Figura 3B), pode estar relacionada com a deficiência do cálcio nas brotações. Abousalii e Mantell (1994) preveniram completamente a necrose apical de *Pistacia vera* com imersões periódicas das brotações, em meio de cultura líquido suplementado com cálcio. O cálcio apresenta limitações na sua translocação na planta intacta, que, podem ser observadas também *in vitro*. Como

o cálcio depende da transpiração da planta para seu transporte no xilema, as condições de alta umidade do ar que se estabelecem *in vitro* podem induzir deficiência de cálcio em partes aéreas. A micropropagação de espécies mais exigentes em cálcio pode requerer um aumento desse íon no meio de cultura (SHA; MCCOWN; PETERSON,1985; CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Os resultados sugerem que a necrose apical de *L. angustifolia* pode estar relacionada à deficiência de cálcio e o problema pode ser reduzido com o aumento de cálcio no meio de cultura. Porém o problema não foi eliminado, visto que mesmo sob altas concentrações de cálcio as condições *in vitro* não favoreceram a transpiração e provavelmente a absorção de cálcio (não houve diferença estatística). Assim, os resultados também podem sugerir a influência de outros fatores sobre a necrose apical e a senescência foliar, como o acúmulo de etileno no interior do frasco, a sensibilidade da espécie a este acúmulo e a necessidade de estudar e controlar outros fatores além do cálcio presente no meio de cultura para eliminar completamente este problema, como reduzir a umidade relativa no interior do frasco, favorecendo a transpiração das plantas e reduzindo o acúmulo de etileno.

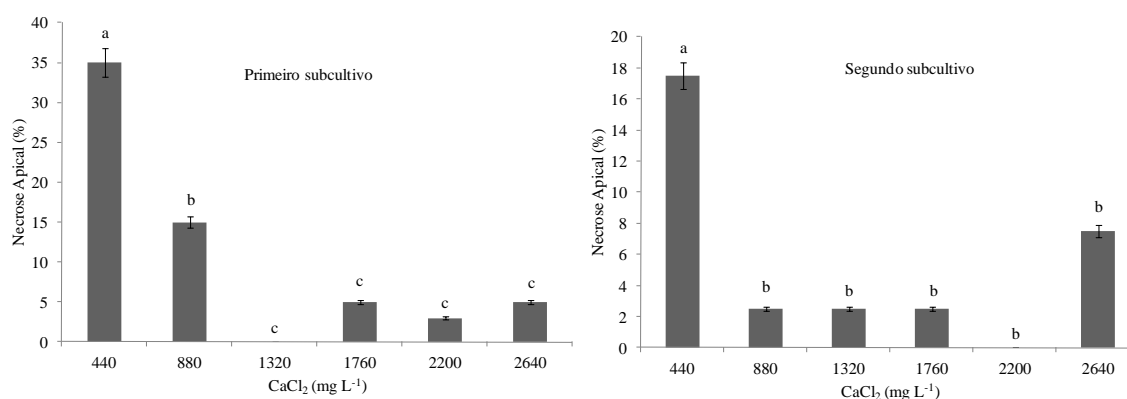


FIGURA 5 – Porcentagem de necrose apical das brotações de *L. angustifolia*, em função da concentração de CaCl₂, no primeiro e segundo subcultivos. Barras: médias ± desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan entre os tratamentos estão indicadas por letras diferentes.

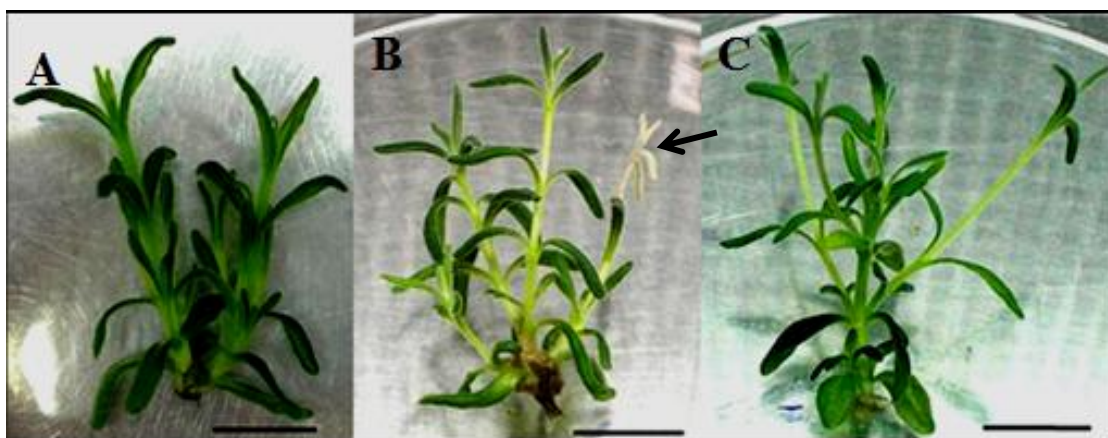


FIGURA 6 – Brotações de *L. angustifolia* cultivadas *in vitro*. A) Brotações hiperídricas. B) Brotação com necrose apical (seta). C) Brotações normais. Barras: 10 mm.

4.3.2 Efeito de diferentes concentrações de CaCl_2 no enraizamento das brotações de *L. angustifolia* cv. Provence Blue

A altura das brotações cultivadas em meio de cultura de enraizamento, isento de regulador de crescimento, foi influenciada pelas diferentes concentrações de CaCl_2 , sendo obtida a maior altura (3,8 cm) na concentração de 1.320 mg L^{-1} , diferindo estatisticamente da concentração de 440 mg L^{-1} (2,9 cm) (Tabela 6).

Em relação ao número de raízes principais e o comprimento das raízes principais, estas variáveis foram influenciadas pelas concentrações de CaCl_2 . Na concentração de 2.200 mg L^{-1} houve uma redução no número de raízes, quando comparado com as demais concentrações. E foram obtidos os maiores comprimentos das raízes principais nas concentrações de 880 e 1.320 mg L^{-1} (1,9 e 1,8 cm, respectivamente) (Tabela 6).

Não houve efeito das diferentes concentrações de CaCl_2 na porcentagem de enraizamento (Tabela 6).

TABELA 6 - Altura, número de raízes e comprimento das raízes principais de *L. angustifolia*, em meio de cultura MS isento de regulador de crescimento.

CaCl ₂ (mg L ⁻¹)	Altura (cm) ¹	N ^o de raízes principais ¹	Comprimento das raízes principais ¹	Enraizamento ² (%)
440	2,9 ± 0,08 c	1,8 ± 0,21 a	1,1 ± 0,16 bc	39,0
880	2,9 ± 0,32 c	1,9 ± 0,43 a	1,9 ± 0,26 a	22,8
1.320	3,8 ± 0,41 a	2,1 ± 0,63 a	1,8 ± 0,43 a	30,5
1.760	3,3 ± 0,09 b	2,2 ± 0,24 a	0,7 ± 0,08 c	37,5
2.200	3,4 ± 0,06 b	1,1 ± 0,25 b	1,3 ± 0,50 bc	31,8
2.640	3,6 ± 0,06 ab	2,0 ± 0,41 a	1,4 ± 0,42 ab	35,0
CV(%)	6,97	21,32	27,41	21,09

¹ Letras seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade.

² Dados não diferem estatisticamente pela análise de variância.

4.3.3 Influência do aumento de CaCl₂ do meio de cultura no teor de cálcio do tecido vegetal

Não houve interação entre os fatores para as variáveis analisadas. A altura das brotações, número de folhas por brotação, número de brotações por explante e porcentagem de enraizamento não foram influenciados pelas concentrações de CaCl₂. Contudo, sobre a porcentagem de necrose apical e hiperidricidade as concentrações de CaCl₂ apresentaram efeito significativo. O nível de CaCl₂ presente no meio MS tem sido associado com amarelecimento das folhas, caules fracos e até mesmo a morte dos tecidos devido à toxidez do cloro (MCCOWN; SELLMER, 1987). No presente estudo o aumento da concentração de CaCl₂ três vezes maior que a concentração original do meio MS, foi efetivo na redução de hiperidricidade das brotações de *L. angustifolia* cv. Provence Blue (Tabela 7).

As brotações cultivadas em meio MS suplementado com 440 mg L⁻¹ de CaCl₂ foram severamente hiperídricas, exibindo os sintomas comuns causados pela hiperidricidade, tais como caules e folhas engrossados, aspecto translúcido do tecido, folhas deformadas. No primeiro e segundo subcultivos a porcentagem

de hiperidricidade foi de 23% e 30%, respectivamente. Em contraste, as brotações regeneradas no meio MS contendo 1.320 mg L^{-1} de CaCl_2 a porcentagem de hiperidricidade foi de apenas 6% e 1,3%, no primeiro e segundo subcultivo respectivamente (Tabela 7). A porcentagem de necrose apical também foi mais elevada na concentração de 440 mg L^{-1} de CaCl_2 , nos dois subcultivos avaliados (Tabela 7). A alta umidade relativa observada no interior dos frascos de cultivo, provavelmente resulta na redução da transpiração e cria condições nas quais desordens relacionadas com a deficiência de cálcio podem tender a desenvolver-se em locais de rápido crescimento, como o ápice das brotações (CHRISTENSEN et al., 2008).

Brotações de *L. angustifolia* cv. Proven Blue, cultivadas em meio contendo 1.320 mg L^{-1} de CaCl_2 , tiveram aumento do conteúdo de Ca^{2+} ($33,69 \text{ g kg}^{-1}$) nas brotações, quando comparadas com as cultivadas em meio contendo 440 mg L^{-1} de CaCl_2 ($13,84 \text{ g kg}^{-1}$ de Ca^{2+}). Sendo que sua distribuição ao longo das brotações não ocorreu de forma homogênea, havendo maior conteúdo de Ca^{2+} nas porções mediana e basal, nas duas concentrações de CaCl_2 testadas (Figura 7). Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que o cálcio tem uma tendência a se acumular nas partes basal e mediana das brotações, com menor movimento para o ápice. Considerando estes resultados, as brotações foram afetadas pela necrose apical como consequência da absorção e translocação deficiente de cálcio.

TABELA 7 – Efeito de duas concentrações de CaCl_2 no meio de cultura MS, combinadas com dois subcultivos, no cultivo *in vitro* de brotações de *L. angustifolia* cv. Provence Blue.

Concentração de CaCl_2 (mg L^{-1})	Primeiro Subcultivo	Segundo Subcultivo	Médias
	Altura (cm) ^{ns}		
440	1,9 ± 0,14	3,0 ± 0,40	2,5
1.320	2,0 ± 0,53	3,0 ± 0,23	2,5
	Número de folhas ^{ns}		
440	11,1 ± 0,80	12,6 ± 1,56	11,9
1.320	11,0 ± 1,40	11,1 ± 1,97	11,1
	Brotações por explante ^{ns}		
440	2,4 ± 0,06	2,4 ± 0,45	2,4
1.320	2,2 ± 0,30	2,7 ± 0,70	2,5
	Enraizamento (%)		
440	14,2 b	46,5 a	30,4
1.320	24,0 a	40,8 b	32,4
	Necrose apical (%)		
440	21 a	51 a	36
1.320	10 b	30 b	20
	Hiperidricidade (%)		
440	23,0 a	30,0 a	26,5
1.320	6,0 b	1,3 b	3,7

Dados representam médias±desvio padrão.

ns – não significativo;

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

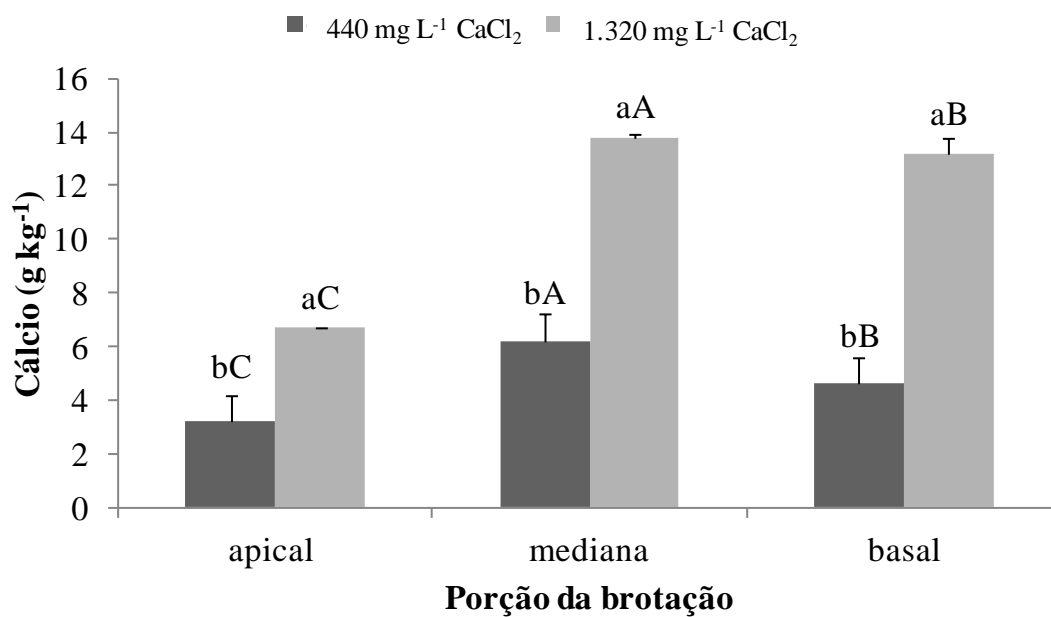


FIGURA 7 – Efeito de CaCl₂ nas concentrações de 440 mg L⁻¹ e 1.320 mg L⁻¹ sobre o conteúdo de cálcio nas porções apical, mediana e basal das brotações de *L. angustifolia* cv. Provence Blue cultivadas *in vitro*. Letras minúsculas representam as concentrações de CaCl₂ e letras maiúsculas representam as diferentes porções da brotação.

4.4 CONCLUSÕES

O aumento da concentração de CaCl_2 no meio de cultura reduziu significativamente a necrose apical e hiperidricidade das brotações micropropagadas de *L. angustifolia* e, apresentou efeito sobre o enraizamento, afetando o comprimento e o número de raízes principais formadas.

O cloreto de cálcio adicionado ao meio de cultura na concentração três vezes maior que a concentração original (1.320 mg L^{-1}), reduz a hiperidricidade e necrose apical das brotações de *L. angustifolia* cv. Provence Blue. O maior fornecimento de cálcio no meio de cultura aumenta sua absorção pelas brotações, sendo que sua concentração é reduzida na porção apical da brotação, apresentando maior acúmulo na porção mediana, seguido da porção basal.

A partir desse trabalho sugere-se que mais estudos sejam realizados, para que os problemas de necrose apical e a hiperidricidade das brotações cultivadas *in vitro* de *L. angustifolia* sejam eliminados.

4.5 REFERÊNCIAS

ABOUSALII, A.; MANTELL, S.H. A practical method for alleviating shoot-tip necrosis symptoms in *in vitro* shoot culture of *Pistacia vera* cv. Mateur. **Journal of Horticultural Science**, v. 69, p. 357-365, 1994.

ANDRADE, L.B. et al. The effects of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula Vera* DC). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, p. 79-83, 1999.

BARGHCHI, M.; ALDERSON, P.G. Pistachio (*Pistacia vera* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Vol. 5, Trees II. Berlin: Springer-Verlag, 1989, p. 68-98.

BIASI, L.A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. 1. ed. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009. 160 p.

BIDDULPH, O. Translocation of inorganic solutes. In: STEWARD, F.C. (Ed.). **Plant Physiology – a treatise**. Vol. 2. New York: Academic Press, 1959.

BOELEN, M.H. Chemical and sensory evaluation of *Lavandula* oils. **Perfum Flavour**, v. 20, p. 23-51, 1995.

BUCHBAUER, G. et al. Aromatherapy: evidence for sedative effects of the essential oil of lavender after inhalation. **Z. Naturforsch**, v. 46, p. 1067-1072, 1991.

CALVO, M. C.; SEGURA, J. *In vitro* propagation of lavender. **HortScience**, v. 24, n. 2, p. 375-376, 1989.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos, In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa CNPH. V.1, 1998. p. 87-132.

CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, M.M.A.; MEDEIROS, M.J.L. **Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 5p. (Documentos 148).

CHEMAT, F. et al. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, p. 157-160, 2006.

CHRISTENSEN, B. et al. *In vitro* culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: Influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 93, n. 2, p. 151-161, 2008.

CUZZUOL, G.R.F. et al. Controle da vitrificação do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. **Scientia Agricola**, v. 52, n. 3, p. 604-614, 1995.

DIAS, M.C.; ALMEIDA, R.; ROMANO, A. Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L'Hér through *in vitro* axillary shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, p. 99-102, 2002.

GHELARDINI, C. et al. Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. **Planta Medica**, v. 65, p. 700-703, 1999.

JAGER, W. et al. Percutaneous absorption of lavender oil from a massage oil. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 43, p. 49-54, 1992.

JUN TAKANE, R.J. et al. Influência do cloreto de cálcio no crescimento de explantes de *Gypsophila paniculata* L. (Caryophyllaceae), cultivados *in vitro*. **Scientia Agricola**, v. 51, n.2, p. 235-239, 1994.

KEVERS, C.; GASPAR, T. Vitrification of carnation *in vitro*: changes in water content, extracellular space, air volume and ion levels. **Physiologie Végétale**, v. 24, n. 6, p. 647-653, 1986.

KEVERS, C. et al. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, p. 181-191, 2004.

LESHEM, B.; WERKER, B.; SHALEV, D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, v. 62, p. 271-276, 1988.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 638p.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. Editora UFV. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. 2000. 220p.

MCCOWN, B.H.; SELLMER, J.C. General media and vessels suitable for woody plant cultures. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Eds.). **Tissue culture in forestry – General principles and biotechnology**. Dordrecht, Boston, 1987, v. 2, p. 6

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

PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAM. Antibacterial and antifungal activity of

aromatic constituents of essential oils. **Microbios**, v. 89, p. 39-46, 1997.

RADMANN, E.B. et al. Influência da densidade de fluxo na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculada* L. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 7, n. 3, p. 171-175, 2001.

SHA, L.; MCCOWN, B.H.; PETERSON, L.A. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 110, p. 219-222, 1985.

SILVA, F.; AZEVEDO, C. A. V. A new version of the assistat statistical assistance software. In: World Congress on Computers in Agriculture, 4., Orlando-FL-USA. **Anais...** Orlando: American Society of Agricultural Engineers, 2006. p.393-396.

TSURO, M.; KODA, M.; INOUE, M. Efficient plant regeneration from multiple shoots formed in the leaf-derived callus of *Lavandula vera*, using the “open culture system”. **Scientia Horticulturae**, v. 86, p. 81-88, 2000.

VIEITEZ, A.M. et al. Anatomical and chemical studies of vitried shoots of chestnut regenerated *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 5, p. 177-184, 1985.

VITTI, G.C.; LIMA, E.; CICARONE, F. Cálcio, magnésio e enxofre. In: FERNANDES, M.S. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa – MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.299-326.

ZIV, M.; SCHWARTZ, A.; FLEMINGER, D. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*, implications for hardening. **Plant Science**, v. 52, p. 127-134, 1987.

ZIV, M. *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: WITHERS, L.A.; ALDERSON, P.G. (Ed.). **Plant tissue culture and its agricultural applications**. Butterworths, London. p. 187-196, 1996.

5 CAPÍTULO III

TAMANHO DA MICROESTACA E AIB NO ENRAIZAMENTO

EX VITRO DE Lavandula angustifolia MILL.

RESUMO

A micropropagação é uma técnica de alto custo, e a eliminação da fase de enraizamento *in vitro* reduz custos e pode melhorar a qualidade do sistema radicial das plantas. O objetivo deste trabalho foi promover o enraizamento *ex vitro* de microestacas micropropagadas de *Lavandula angustifolia* cv. Provence Blue, e realizar estudo histológico para verificar a conexão entre a microestaca e as raízes. Concentrações de 0,0 (controle); 2,5; 5,0 e 10,0 mM de AIB foram aplicadas em solução alcoólica 50% nas microestacas de 2,0 cm e 4,0 cm de comprimento. O maior número de raízes por microestacas foi obtido com microestacas de 4,0 cm tratadas com 10,0 mM de AIB (12 raízes por microestacas), e a ausência da auxina promoveu o maior comprimento das raízes (8,8 cm). Microestacas de 4,0 cm de comprimento combinadas com 5,0 mM de AIB, garantiram maior porcentagem de enraizamento e sobrevivência das microestacas *ex vitro*. Microestacas de 2,0 cm de comprimento tratadas com 10,0 mM de AIB tiveram baixa porcentagem de enraizamento (15%). Análises anatômicas demonstraram conexão entre as raízes adventícias e o sistema vascular das microestacas enraizadas *ex vitro*, não sendo observada a formação de calo. Concluiu-se que a microestaquia de *L. angustifolia* cv. Provence Blue pode ser realizada utilizando-se microestacas com 4,0 cm de comprimento tratadas com 5,0 mM de AIB.

Palavras-chave: Lavanda, raízes adventícias, micropropagação, sobrevivência.

**MICROCUTTING SIZE AND IBA ON *EX VITRO* ROOTING OF
Lavandula angustifolia MILL.**

ABSTRACT

Micropropagation is a high cost technique and the elimination of the *in vitro* rooting phase can reduce costs and improve the quality of the plants root system. The objective of this work was to *ex vitro* rooting *Lavandula angustifolia* cv. Provence Blue micropropagated microshoots and to perform histological studies to verify the connection between the microcuttings and the roots. Concentrations of 0.0 (control), 2.5, 5.0 and 10.0 mM IBA were applied to microshoots of 2.0 cm and 4.0 cm of length. The high number of roots per microshoot was obtained with 4.0 cm microshoots treated with 10.0 mM IBA (12 roots per microshoot), and absence of auxin promoted the highest root length (8.8 cm). Microshoots 4.0 cm in length combined with 5.0 mM IBA ensured greater percentage of rooting and survival of *ex vitro* microshoots. Microshoots of 2.0 cm in length treated with 10.0 mM IBA showed low rooting percentage (15%). Anatomical analysis demonstrated a connection between the adventitious roots and the vascular system of the *ex vitro* rooted microshoots and without callus formation. It was concluded that *L. angustifolia* cv. Provence Blue microshoot rooting can be performed using microshoots with 4.0 cm in length treated with 5.0 mM IBA.

Key words: Lavender, adventitious root, micropropagation, survival.

5.1 INTRODUÇÃO

A *Lavandula angustifolia* Miller é uma planta de reconhecida importância devido ao óleo essencial contido em suas flores e folhas, que é usado na fabricação de remédios, pomadas, perfumes, cosméticos e produtos de limpeza. O óleo essencial da lavanda possui propriedade antiséptica, antiinflamatória, analgésica, antifúngica e bactericida, pois é rico em terpenos (KREIS; MOSANDL, 1992; SUGAWARA et al., 1998; GHELARDINI et al., 1999; FLORES et al., 2005).

Pertencente à família Lamiaceae, a espécie *L. angustifolia* é um arbusto lenhoso (UPSON, 2002) nativo da Europa, que pode ser propagado a partir de sementes ou vegetativamente. Para a obtenção de plantas homogêneas a propagação vegetativa é a mais recomendada. Porém, uma limitação que pode ser encontrada na produção de mudas de *L. angustifolia* pelo método usual de estaquia é a baixa capacidade de enraizamento das estacas (BIASI; DESCHAMPS, 2009). A micropropagação, por rejuvenescer o material propagativo, promove a retomada da capacidade de enraizamento e vigor de crescimento e, pode ser utilizada como um processo inicial para a produção de microestacas (SCHUCH et al., 2007) e posterior enraizamento *ex vitro* com simultânea aclimatização (GEORGE; HALL; KLERK, 2008). Apesar das vantagens da micropropagação, esta apresenta custo elevado, e a eliminação da etapa de enraizamento *in vitro* é desejável do ponto de vista econômico (YAN et al., 2010), além de melhorar a qualidade do sistema radicial formado, uma vez que as raízes produzidas *in vitro* são consideradas fracas e pouco funcionais (PIERIK, 1990). Grout e Aston (1977) demonstraram que mudas de couve-flor enraizadas *in vitro* apresentaram incompleta conexão vascular entre a parte aérea e a raiz, limitando o crescimento das plantas.

Em plantas de eucalipto a técnica da microestaquia foi empregada para aproveitar ao máximo a juvenilidade dos propágulos vegetativos e maximizar o enraizamento das microestacas no processo de propagação clonal (XAVIER et

al., 2001). A microestaquia também vem sendo estudada como alternativa para a produção de mudas de diversas espécies de plantas medicinais e aromáticas, como *Mentha piperita* (SUNANDAKUMARI et al., 2004), *Siratia grosvenorii* (YAN et al., 2010), *Rotula aquatica* (MARTIN, 2003), *Wedelia chinensis* (MARTIN; BENNA; JOSEPH, 2003) entre outras. Contudo, há pouca informação sobre a utilização dessa técnica para *L. angustifolia*.

Assim como na estaquia convencional, a microestaquia é influenciada por diversos fatores. Em diferentes espécies foi demonstrado que a eficiência do enraizamento de microestacas é fortemente influenciada pelo comprimento das microestacas (XU et al., 2008; YAN et al., 2010). A aplicação exógena de auxina favoreceu o enraizamento *ex vitro* de microestacas de diferentes espécies (KARHU, 1997; MARTIN, 2003; XU et al., 2008; YAN et al., 2010).

Devido às dificuldades encontradas em estudo prévio para o enraizamento *in vitro* de *L. angustifolia*, e tendo em vista as vantagens que o enraizamento *ex vitro* pode proporcionar para o processo de micropropagação, o objetivo do presente trabalho foi promover o enraizamento *ex vitro* de microestacas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, e realizar estudo histológico para verificar a conexão entre as raízes e a microestaca, visando a obtenção de mudas de qualidade.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Produção de brotações *in vitro*

Ápices caulinares de aproximadamente 5,0 mm de comprimento foram coletados de uma única planta matriz adulta de *L. angustifolia* cv. Provence Blue (proveniente de semente comercial importada da França) mantida em casa-de-vegetação. Os explantes passaram por um processo de desinfestação em fungicida Cercobin[®] (2%) por 40 min, etanol 70% por 20 seg, hipoclorito de sódio (1%) mais Tween 20 (0,2%) por 20 min e três lavagens em água destilada e esterilizada. Após a desinfestação, os explantes foram cultivados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 100 mg L⁻¹ de mio inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,5 µM de BAP e 6 g L⁻¹ de ágar Vetec[®], por um período de 30 dias em sala climatizada, com temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16 h. Foram realizados cinco subcultivos das brotações a cada 40 dias de cultivo.

5.2.2 Comprimento das microestacas e aplicação de AIB

As microestacas foram seccionadas com 2,0 cm e 4,0 cm de comprimento, e a base foi imersa por 10 segundos em solução de AIB (ácido indolbutírico) diluído em etanol 50%. As concentrações de AIB utilizadas foram 0,0 (controle); 2,5; 5,0 e 10,0 mM.

As microestacas foram transplantadas em tubetes plásticos de 53 cm³ contendo substrato comercial Plantmax[®] e mantidas em câmara de nebulização intermitente por 15 dias e em seguida foram levadas para casa-de-vegetação, onde permaneceram por mais 15 dias, neste período as regas foram feitas manualmente.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados em esquema fatorial 2 x 4 (dois comprimentos de microestacas e quatro concentrações de AIB), com quatro repetições e 10 explantes por parcela.

5.2.3 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e avaliados pela análise de regressão. Dados em porcentagem foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$. Para análise dos dados foi utilizado o programa ASSISTAT versão 7.5 beta (SILVA; AZEVEDO, 2006).

5.2.4 Análises Histológicas

Após quatro semanas de enraizamento *ex vitro*, a base das microestacas foram seccionadas e fixadas em FAA [formaldeído (40%): ácido acético glacial: etanol (50%), a 5:5:90 v/v/v]. Esses materiais foram destinados à preparação de lâminas permanentes, sendo incluídos em 2-hidroxietilmeta-acrilato (historresina-Leica), segundo a técnica de Feder e O'Brien (1968) e as indicações do fabricante. Os blocos foram seccionados em micrótomo de rotação; os cortes foram obtidos com 7,0 μm de espessura e corados com azul de toluidina. As lâminas foram montadas com resina sintética (Permalte[®]). As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Zeiss com câmera digital Sony Cyber-shot P200[®] acoplada.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O melhor efeito do AIB em diferentes concentrações combinado com as microestacas de 2,0 e 4,0 cm de comprimento, sobre o número de raízes por microestaca, foi observado quando as microestacas de 4,0 cm foram tratadas com 10,0 mM de AIB, obtendo-se aproximadamente 12 raízes por microestaca. As microestacas que não foram tratadas com AIB apresentaram independente do comprimento, o menor número de raízes por microestaca (Figura 8A). A aplicação exógena de auxinas em estacas estimula a formação de raízes adventícias, aumentando o número de raízes formadas (HARTMANN et al., 2002), este efeito também pode ser atribuído às microestacas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue.

Apesar das microestacas não tratadas com AIB apresentarem o menor número de raízes por microestaca (Figura 8A), estas obtiveram o maior comprimento das raízes principais (8,8 cm). O comprimento das microestacas não teve efeito sobre esta variável. Houve uma tendência de redução do comprimento das raízes principais, com o aumento das concentrações de AIB, sendo obtidos 8,8 cm na ausência da auxina e 4,9 cm na concentração de 10,0 mM (Figura 8B). Microestacas de 2,0 cm de comprimento tratadas com 10 mM de AIB obtiveram a menor porcentagem de enraizamento (15%), em relação aos demais tratamentos. Os resultados demonstram que a concentração mais elevada de AIB (10 mM) teve um efeito negativo na porcentagem de enraizamento das microestacas de 2,0 cm e 4,0 cm de comprimento. A maior porcentagem de enraizamento foi obtida com a concentração de 5,0 mM de AIB, para microestacas de 2,0 cm e 4,0 cm de comprimento, obtendo-se 78% e 85% de enraizamento, respectivamente (Figura 8C).

As respostas encontradas para a porcentagem de enraizamento das microestacas de 4,0 cm de comprimento pode ser devido à maior reserva de carboidratos, em relação às microestacas de 2,0 cm de comprimento. A formação de raízes adventícias é um processo que exige alta energia, por envolver divisão

celular, na qual as células predeterminadas mudam sua rota morfogênica para formar os primórdios radiciais (AESCHABACHER; SCHIEFELBEIN; BENFEY, 1994). Assim como observado por Eugene, Justin e Flori (2007) para o enraizamento de microestacas de *Elaeis guineensis in vitro*, os resultados encontrados no presente trabalho indicam que o tamanho das microestacas é um fator que afeta a produção do sistema radicial no enraizamento *ex vitro* de *L. angustifolia* cv. Provence Blue. Microestacas de *Malus zumi* mais longas (3,5 – 5,0 cm) também tiveram maior porcentagem de enraizamento *ex vitro* (> 70%) (XU et al., 2008). Haq et al. (2009), demonstraram que as reservas de carboidratos nas microestacas de *Olea europaea* são a principal fonte de energia para a iniciação dos primórdios radiciais.

A porcentagem de sobrevivência das plantas, provenientes de microestacas de 2,0 cm de comprimento tratadas com diferentes concentrações de AIB, variou de 15% a 83%, sendo que a porcentagem de sobrevivência das plantas provenientes de microestacas de 4,0 cm variou de 53% a 88%. A concentração de 10 mM de AIB proporcionou a menor porcentagem de sobrevivência, para as microestacas de 2,0 cm e de 4,0 cm de comprimento. Para todas as concentrações de AIB testadas a utilização de microestacas de 4,0 cm de comprimento garantiu maior sobrevivência das plantas, quando comparada com as microestacas de 2,0 cm de comprimento (Figura 8D).

Tanto para a porcentagem de enraizamento, quanto para a porcentagem de sobrevivência das microestacas, houve uma tendência de redução em concentrações acima de 5,0 mM de AIB (Figura 8C, D), indicando que a aplicação de AIB acima dessa concentração não é adequada para o enraizamento *ex vitro* de *L. angustifolia*. O AIB é um regulador vegetal que se aplicado fora das concentrações adequadas, que dependem de cada espécie, pode apresentar fitotoxicidade (AUDUS, 1963).

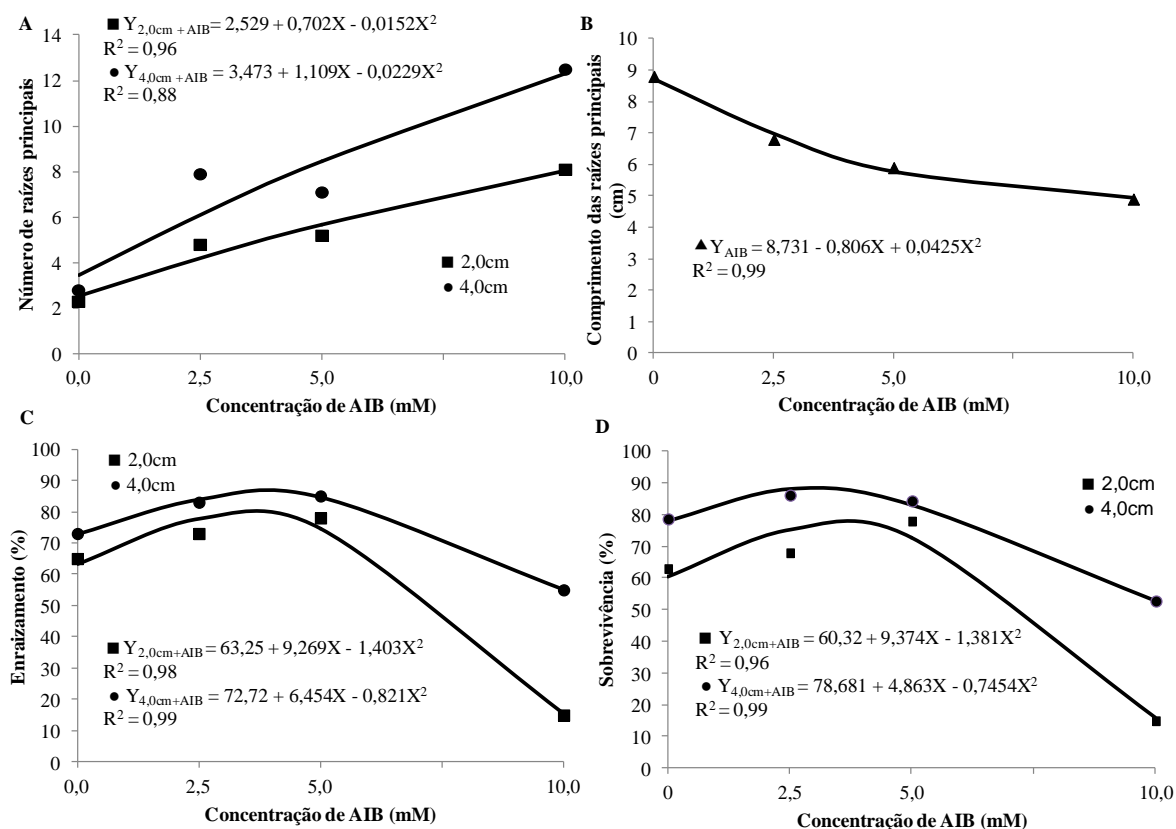


FIGURA 8 - Microestacas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue com 2,0cm e 4,0 cm de comprimento tratadas com diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB), (A) no número de raízes principais, (B) no comprimento das raízes principais, (C) na porcentagem de enraizamento, (D) na porcentagem de sobrevivência das plantas.

O enraizamento *ex vitro* possibilita a obtenção de plantas com maior capacidade de emissão de raízes e maior velocidade de crescimento inicial, visto que as raízes produzidas *in vitro* não são funcionais e morrem após a transferência para aclimatização, sendo necessário produzir novas raízes após a passagem para as condições *ex vitro* (DEBERG; MAENE, 1981). Além disso, a aplicação de regulador vegetal e o comprimento das microestacas interferem no enraizamento de *L. angustifolia* cv. Provence Blue (Figura 9A,B).

No corte transversal realizado na região basal das microestacas tratadas com AIB, com quatro semanas em casa de vegetação, verificou-se a formação endógena das raízes adventícias a partir do câmbio vascular, não sendo observada

a formação de calo (Figura 9C, D). Avaliando as plantas de *Siratia grovenorii* formadas pelo enraizamento *ex vitro*, YAN et al. (2010) observaram que não houve formação de calos na base das microestacas. Raízes adventícias podem ser originadas de células parenquimáticas vivas, calos, câmbio, raio vascular ou medular, floema, córtex, lenticelas ou canais resiníferos (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2003).

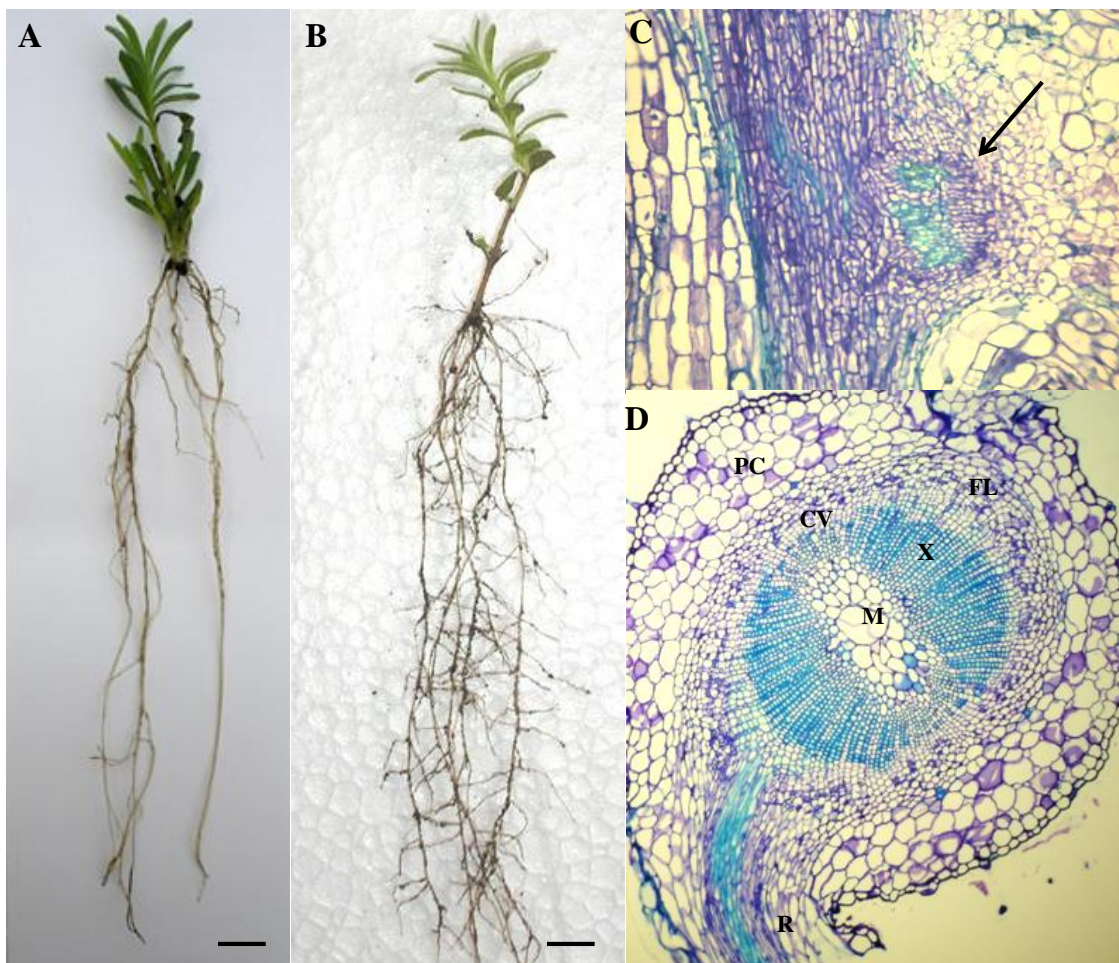


FIGURA 9 - Microestacas enraizadas e micrografias de cortes histológicos de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, após quatro semanas de cultivo. (A) microestaca de 2,0 cm de comprimento inicial não tratada com AIB. (B) microestaca de 4,0 cm de comprimento inicial tratada com 5,0 mM de AIB. (C) Corte longitudinal da base da microestaca enraizada *ex vitro* evidenciando o primórdio radicial (seta). (D) Corte transversal da base da microestaca enraizada *ex vitro*. Observar a região de conexão entre a raiz adventícia e o caule. Medula (M), raiz (R), câmbio vascular (CV), parênquima cortical (PC), xilema (X), floema (FL). Barras A e B = 1,0 cm.

5.4 CONCLUSÕES

O comprimento das microestacas e a concentração do ácido indolbutírico influenciam o enraizamento adventício das microestacas de *Lavandula angustifolia* cv. Provence Blue.

O protocolo de enraizamento *ex vitro* usando microestacas de 4,0 cm de comprimento e 5,0 mM de AIB é eficiente para a formação de raízes adventícias e sobrevivência das plantas de *Lavandula angustifolia* cv. Provence Blue.

5.5 REFERÊNCIAS

AESCHABACHER, R.A.; SCHIEFELBEIN, J.W.; BENFEY, P.N. The genetic and molecular basis of root development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 25-45, 1994.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Eds.). **Anatomia Vegetal**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2003. 438 p.

AUDUS, L.J. **Plant growth substances**. 2 ed. Intersciences, New York. 1963.

BIASI, L.A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. 1. ed. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Lta, 2009. 160p.

DEBERG, P.C.; MAENE, L.J.A. Asheme for commercial propagation for ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, n. 14, p. 335-345, 1981.

EUGENE, K.K.; JUSTIN, Y.; FLORI, A. Evidence for an interaction effect during *in vitro* rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryo-derived plantlets. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 43, p. 456-466, 2007.

FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, n. 1, p. 123-142, 1968.

FLORES, G. et al. Enantiomeric composition studies in *Lavandula* species using supercritical fluids. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 2333-2338, 2005.

GEORGE, F.E.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. The Background. 3. ed., vol.1. 2008. 473 p.

GHELARDINI, C. et al. Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. **Planta Medica**, v. 65, n. 8, p. 700-703, 1999.

GROUT, B.W.W.; ASTON, M.J. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. **Horticultural Research**, v. 17, p. 1-7, 1977.

HAQ, I.U. et al. Influence of microcutting sizes and IBA concentrations on *in vitro* rooting of olive cv. 'Dolce Agogia'. **Pakistan Journal Botany**, V. 41, n. 3, p. 1213-1222, 2009.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. **Plant propagation: principles and practice**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002, 880p.

KARHU, S.T. Rooting of blue honeysuckle microshoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 48, p. 153-159, 1997.

KREIS, P.; MOSANDL, A. Chiral compounds of essential oils. Part XI. Simultaneous stereoanalysis of lavender oil constituents. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 7, p. 187-193, 1992.

MARTIN, K.P. Rapid *in vitro* multiplication and *ex vitro* rooting of *Rotula aquatica* Lour., a rare rheophytic woody medicinal plant. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 415-420, 2003.

MARTIN, K.P.; BENNA, M.R.; JOSEPH, D. High frequency axillary bud multiplication and *ex vitro* rooting of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. – A

medicinal plant. **Indian Journal Experimental Biology**, v. 41, n. 3, p. 262-266, 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Arevised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. 3 ed. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa. 1990.

SCHUCH, M. W. et al. AIB e substrato na produção de mudas de mirtilo cv. “Climax” através de microestaquia. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1446-1449, 2007.

SILVA, F.; AZEVEDO, C. A. V. Anew version of the assistat statistical assistance software. In: World Congress on Computers in Agriculture, 4., Orlando-FL-USA. **Anais...** Orlando: American Society of Agricultural Engineers, 2006. p.393-396.

SUGAWARA, Y. et al. Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools. **Analytica Chimica Acta**, v. 365, p. 293-299, 1998.

SUNANDAKUMARI, C. et al. Rapid axillary bud proliferation and *ex vitro* rooting of herbal spice, *Mentha piperita* L. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 3, p.108-112, 2004.

UPSON, T. The taxonomy of the genus *Lavandula* L. In: LIS-BALCHIN, M. **The Genus *Lavandula***. Taylor and Francis, London, 2002, v.2, p. 2.

YAN, H. et al. *In vitro* and *ex vitro* rooting of *Siratia grosvenorii*, a traditional medicinal plant. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, p. 115-120, 2010.

XAVIER, A. et al. Desempenho do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 25, n. 4, p. 403-411, 2001.

XU, J. et al. Rapid *in vitro* multiplication and *ex vitro* rooting of *Malus zumi* (Matsumura) Rehd. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 129-132, 2008.

6 CAPÍTULO IV

ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE *Lavandula angustifolia*¹

RESUMO

A eliminação da etapa de enraizamento *in vitro* na micropropagação de plantas é desejável do ponto de vista econômico, além de proporcionar a melhoria na qualidade do sistema radicial formado. Dois experimentos foram realizados com os objetivos de avaliar diferentes concentrações (0; 2,5; 5,0 e 10 mM) de ácido indolbutírico (AIB) via talco no enraizamento *ex vitro* de lavanda (*L. angustifolia*), cv. Provence Blue e avaliar a capacidade de enraizamento *ex vitro* das cultivares Vera, Provence Blue, English e Elegance Ice. Após 30 dias, foi avaliado o número de microestacas enraizadas, comprimento das raízes principais, porcentagem de enraizamento e porcentagem de sobrevivência. A concentração de 5,0 mM de AIB foi mais efetiva para o comprimento de raízes e porcentagem de enraizamento das microestacas de lavanda cv. Provence Blue, apesar de reduzir o número de raízes formadas. Entre as cultivares estudadas, a porcentagem de sobrevivência das plantas variou de 82% a 100%. As cultivares apresentaram diferenças no enraizamento *ex vitro* das microestacas, sendo as maiores médias de porcentagem de enraizamento registradas na Provence Blue e Elegance Ice. Conclui-se que a microestaquia pode ser uma técnica eficiente para a propagação de lavanda, pelo tratamento das microestacas com 5,0 mM de AIB, por proporcionar alta porcentagem de enraizamento e sobrevivência das plantas.

Palavras-chave: propagação de plantas, ácido indolbutírico, enraizamento *ex vitro*.

¹ Publicado em MACHADO et al. (2011) Ciência Rural, v. 41, n. 5, p. 767-772.

ROOTING OF *Lavandula angustifolia* MICROCUTTINGS

ABSTRACT

Elimination of the rooting stage of *in vitro* micropropagation of plants is desirable from an economic standpoint, and provides better quality of the root system formed. Two experiments were conducted with the objective of evaluating different concentrations (0, 2.5, 5.0 and 10 mM) of indolbutyric acid (IBA) via *ex vitro* rooting of *L. angustifolia* cv. Provence Blue and to evaluate the ability of *ex vitro* rooting of the cultivars Vera, Provence Blue, English and Elegance Ice. After 30 days, the number of rooted microcutting, root length, rooting percentage and survival percentage were measured. It was concluded that the microcutting can be an efficient technique for production of lavender plants, by using micropropagated plants as explant donors: The concentration of 5.0 mM IBA was more effective for the length of roots and rooting of microcuttings lavender cv. Provence Blue, although reducing the number of roots. Among the cultivars, the percentage of plant survival ranged from 82% to 100%. Cultivars differ in *ex vitro* rooting of microcuttings, with the highest rooting percentage average recorded in Provence Blue and Elegance Ice. The cultivars had no influence on the percentage of microcuttings survival. It was concluded that the microcuttings can be an efficient technique for the propagation of lavender since microcuttings treated with 5.0 mM IBA provide a high percentage of rooting and survival of plants.

Key words: plant propagation, indolbutyric acid, *ex vitro* rooting.

6.1 INTRODUÇÃO

A lavanda é uma planta popularmente conhecida pelo seu aroma, sendo cultivada principalmente na França, Itália e Espanha (VERMA et al., 2010), embora seja plantada em todo o mundo em regiões de clima temperado. No Brasil, vem despertando o interesse de produtores pela produção de óleo essencial, que é extraído de suas flores e folhas e empregado nas indústrias de perfumaria, cosmética, alimentícia e farmacêutica (TSURO et al., 2000).

Dentre as espécies, a *Lavandula angustifolia* apresenta maior valor econômico, devido ao alto teor de linalol e acetato de linalila (MOON et al., 2006). Por apresentar alta variabilidade genética, a sua propagação por sementes não é recomendada e a propagação pelo enraizamento de estacas apresenta-se inviável, devido à baixa taxa de enraizamento (BIASI; DESCHAMPS, 2009).

As técnicas de cultura de tecidos têm sido aplicadas para a propagação de diversas espécies de lavanda. Brotações de *L. latifolia* Med. foram produzidas diretamente dos tecidos dos explantes (CALVO; SEGURA, 1989; GRAS & CALVO, 1996) e a partir de calos em *L. latifolia* (CALVO; SEGURA, 1988; CALVO; SEGURA, 1989; JORDAN; CALVO; SEGURA, 1990), *L. angustifolia* L. (QUAZI, 1980) e lavandin (*L. angustifolia* x *L. latifolia*) (PANIZZA; TOGNONI, 1991). No Brasil, a micropropagação foi utilizada com sucesso na multiplicação em larga escala de *L. dentata* (ECHEVERRIGARAY; BASSO; ANDRADE, 2005).

A micropropagação é uma técnica importante para a propagação de plantas de alto valor econômico, principalmente das espécies que apresentam dificuldades de se propagarem vegetativamente com a utilização de outras técnicas. Entretanto, devido aos custos elevados do processo de micropropagação, é importante que sejam encontradas alternativas que viabilizem a técnica, podendo ser citada a eliminação da etapa de enraizamento *in vitro*, que além de ser desejável do ponto de vista econômico, poderá proporcionar a melhoria na

qualidade do sistema radicial formado. Em *Siratia grosvenorii*, as raízes formadas não apresentaram calo na base das microestacas (YAN et al., 2010). Plantas de couve-flor enraizadas *in vitro* apresentaram incompleta conexão vascular entre a parte aérea e a raiz (GROUT; ASTON, 1977) e as raízes formadas *ex vitro* foram mais vigorosas em *Prunus virginiana*. Além disso, o enraizamento *ex vitro* tem a vantagem de diminuir as dificuldades associadas à sobrevivência e ao desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro* (GARCÍA; GONZÁLEZ, 1992; AUGUSTO et al., 2006).

O controle do desenvolvimento das raízes é influenciado por substâncias reguladoras de crescimento e as auxinas promovem a formação de primórdios radiciais adventícios (TAIZ; ZEIGER, 2004). Visando otimizar a micropropagação de *L. angustifolia*, o objetivo deste trabalho foi testar diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento *ex vitro* da cultivar Provence Blue e avaliar a capacidade de enraizamento *ex vitro* de outras quatro cultivares.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para os dois experimentos realizados, as microestacas foram obtidas do cultivo *in vitro*. As microestacas foram mantidas durante 40 dias em meio de cultura de multiplicação MS, suplementado com 100 mg L⁻¹ de mio inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,0 µM de 6-benzilaminopurina e 6 g L⁻¹ ágar (Vetec®), em sala climatizada com fotoperíodo de 16 h, temperatura de 25±2 °C e densidade de fluxo de fótons de 40 µmol m⁻² s⁻¹. Em seguida, foram seccionadas com 4,0 cm de comprimento e colocadas em tubetes plásticos de 53 cm³, contendo o substrato comercial Plantmax HT®. As microestacas foram mantidas em câmara de nebulização intermitente, controlada por temporizador com intervalo de rega fixo. A programação utilizada para a nebulização foi das 8 às 17 h, com irrigação de 15 s a cada 15 min; das 17 às 23 h, com irrigação de 15 s a cada uma hora e; das 23 às 8 h, com irrigação de 15 s a cada 3 h, por um período de 15 dias. O bico nebulizador empregado apresenta vazão de 48 L h⁻¹. O sombreamento da câmara de nebulização foi feito por manta termo-refletora Aluminet® da empresa Polysack®. Posteriormente, foram transferidas para casa-de-vegetação com irrigação manual com mangueira até a saturação do substrato, realizada diariamente.

6.2.1 Experimento 1: efeito de diferentes concentrações de AIB no enraizamento *ex vitro* de *L. angustifolia* cv. Provence Blue

Foram utilizadas microestacas de 4,0 cm de comprimento de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, as quais foram submetidas a diferentes concentrações de AIB (0 controle; 2,5; 5,0 e 10 mM). O AIB foi dissolvido em álcool etílico 50% e a solução, nas diferentes concentrações testadas, foi misturada a 10 g de talco. Após a evaporação completa do solvente à temperatura ambiente, a base das microestacas foi tratada com o AIB via talco e o controle consistiu em talco sem o regulador vegetal. Após 30 dias da instalação do experimento, foram realizadas as avaliações da altura das plantas (cm), número de

raízes principais, comprimento das raízes principais (cm), porcentagem de enraizamento das microestacas e porcentagem de sobrevivência das plantas formadas. O delineamento experimental foi blocos casualizados, com quatro repetições e 10 microestacas por parcela. O experimento foi repetido duas vezes.

6.2.2. Experimento 2: enraizamento *ex vitro* de quatro cultivares de *L. angustifolia*

Foram avaliadas as cultivares de *L. angustifolia* ‘Vera’, ‘Provence Blue’, ‘English’ e ‘Elegance Ice’. O AIB foi aplicado via talco, preparado conforme descrito anteriormente, na concentração de 5,0 mM. Após 30 dias da instalação do experimento, avaliaram-se as variáveis: altura das plantas (cm), número de raízes principais, comprimento das raízes principais (cm), porcentagem de enraizamento microestacas e porcentagem de sobrevivência das microestacas. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições e 10 microestacas por parcela.

6.2.3. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os dados médios referentes aos efeitos das concentrações de AIB foram submetidos à análise de regressão. Dados em porcentagem foram transformados em arco seno $\sqrt{x/100}$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SISVAR.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Experimento 1: efeito de diferentes concentrações de AIB no enraizamento *ex vitro* de *L. angustifolia* cv. Provence Blue

O AIB nas diferentes concentrações testadas influenciou significativamente todas as variáveis analisadas. Concentrações crescentes de AIB proporcionaram a redução da altura das plantas e do comprimento das raízes; porém, observou-se aumento na porcentagem de sobrevivência, no número de raízes principais e porcentagem de enraizamento até a concentração de 5,0 mM de AIB, a partir da qual houve redução (Figura 10), podendo este fato estar relacionado com o efeito fitotóxico do AIB em concentrações elevadas.

As microestacas que não foram tratadas com o regulador de crescimento apresentaram a menor média de raízes por microestaca (aproximadamente três raízes por microestaca), sendo que as microestacas tratadas com 5,0 mM de AIB apresentaram aproximadamente seis raízes por microestaca (Figura 10B). Similarmente, microestacas do porta-enxerto de macieira M-9 não tratadas com AIB produziram em média 3,4 raízes e 5,6 raízes quando aplicado AIB na concentração de 5,0 mM (ABREU; PETROTTI, 2003). O número de raízes principais, máximo estimado, foi obtido na concentração de 6,5 mM de AIB, segundo a equação de regressão, apresentando redução a partir dessa concentração (Figura 10B).

O aumento da concentração de AIB reduziu o comprimento das raízes principais. Na ausência do regulador vegetal, as raízes apresentaram, em média, 8,0 cm e, na concentração de AIB mais elevada (10 mM), obtiveram-se raízes com 5,5 cm de comprimento (Figura 10C). Conforme estimado pela equação de regressão, a aplicação de 1,9 mM de AIB proporciona o maior comprimento das raízes principais (Figura 10C).

De acordo com a figura 10D, na ausência de regulador de crescimento, houve a redução na porcentagem de enraizamento das microestacas e, nas concentrações de 2,5 a 10,0 mM, os resultados foram semelhantes (95% a 100% de microestacas enraizadas). Essas concentrações de AIB podem variar conforme a espécie. Em clones de *Fraxinus pennsylvanica*, foram obtidas as maiores taxas de enraizamento com a concentração de 1,0 mM de AIB (KIM et al., 1998). Para a obtenção da porcentagem máxima de microestacas enraizadas, a concentração estimada de 7,3 mM de AIB foi a melhor (Figura 10D). Para Ferreira et al. (2009), a aplicação de AIB via talco, para o enraizamento de estacas, possui a desvantagem de não produzir resultados homogêneos, devido à desuniformidade do material aderido à base das estacas e, com isso, o enraizamento pode ser comprometido, resultando em baixas porcentagens de estacas enraizadas. Os resultados encontrados neste trabalho, para a aplicação de AIB via talco, podem estar relacionados à utilização de microestacas, que possuem um diâmetro muito menor do que as estacas utilizadas *in vivo*, reduzindo a desuniformidade na aderência do material na base das microestacas.

A sobrevivência das plantas após 30 dias de aclimatização foi de 93%, quando as microestacas foram tratadas com 2,5 mM de AIB. A concentração estimada de AIB para a máxima porcentagem de sobrevivência foi de 5,02 mM (Figura 10E). Resultados semelhantes foram encontrados em estudo realizado com *Eupatorium triplinerve*, no qual 92% das plantas enraizadas *ex vitro* sobreviveram (MARTIN, 2003). Os resultados obtidos neste trabalho foram satisfatórios, uma vez que, para outras espécies, como *Malus zumi* foi obtido 86,3% de enraizamento *ex vitro* no melhor tratamento (XU et al., 2008). Comparando a sobrevivência das plantas de *Castanea sativa* x *C. crenata* enraizadas *in vitro* e *ex vitro*, Gonçalves et al. (1998) relataram que 100% das plantas enraizadas *ex vitro* sobreviveram na fase de aclimatização, enquanto que as plantas enraizadas *in vitro* apresentaram apenas 50% de sobrevivência.

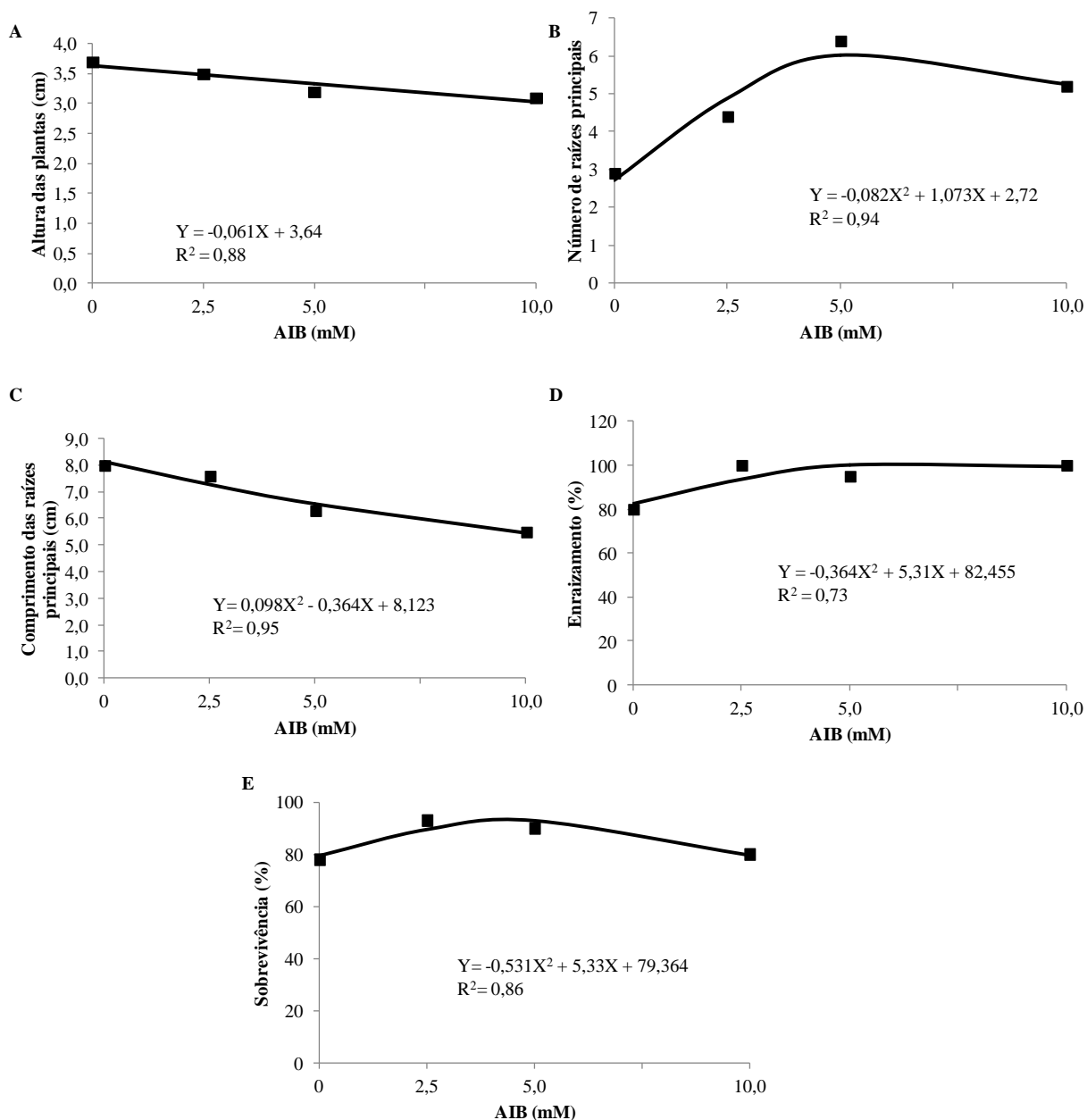


FIGURA 10 – Efeito de concentrações de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento *ex vitro* de microestacas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, após 30 dias de aclimatização. (A) altura das plantas; (B) número de raízes principais; (C) comprimento das raízes principais; (D) porcentagem de microestacas enraizadas; e (E) porcentagem de sobrevivência das plantas. Curitiba-PR, 2010.

6.3.2. Experimento 2: enraizamento *ex vitro* de quatro cultivares de *L. angustifolia*

As cultivares de *L. angustifolia* apresentaram diferentes respostas na avaliação do enraizamento *ex vitro*. A cultivar Elegance Ice obteve 100% de sobrevivência, enquanto as microestacas da cultivar Provence Blue apresentaram 82% de sobrevivência (Tabela 8).

A altura das plantas após 30 dias de aclimatização foi maior na cultivar Elegance Ice, obtendo-se 6,1 cm de altura. Esse valor representa mais de 50% de crescimento das plantas em relação à altura inicial de 4,0 cm. As demais cultivares não apresentaram diferenças na altura das plantas (Tabela 8).

A cultivar Elegance Ice apresentou o maior número de raízes principais (aproximadamente 16 raízes por microestaca), seguida da cultivar English (9,5 raízes por microestaca). As cultivares Provence Blue e Vera obtiveram o menor número de raízes por microestaca, 4,9 e 5,5 raízes por microestaca respectivamente (Tabela 8). Essas diferenças podem ter ocorrido devido ao potencial genético de cada cultivar, pois, segundo vários autores, ele influencia na capacidade de enraizamento (TREVISAN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010).

Com relação às variáveis comprimento das raízes principais e porcentagem de enraizamento das microestacas, as médias foram superiores nas cultivares Provence Blue e Elegance Ice (Tabela 8). Assim como observado para o enraizamento de estacas de ameixeira (SEGANFREDO et al., 1995; TOFANELLI et al., 2002) na microestaquia, observa-se que a capacidade de enraizamento varia de acordo com a cultivar. Segundo KLERK (2002), além de outros fatores, o genótipo influencia fortemente a formação das raízes adventícias. Os resultados encontrados no presente trabalho indicam que a capacidade de enraizamento de microestacas de *L. angustifolia* é genótipo dependente, assim como observado em outras espécies, como em *Prunus*

virginiana, *Ulmus pumila* e o híbrido *Populus x canescens x P. grandidentata* (KAPAUN; CHENG, 1997; DAI et al., 2003; DAI et al., 2004).

TABELA 8 – Enraizamento *ex vitro* de microestacas de *L. angustifolia* cvs. Vera, Provence Blue, English e Elegance Ice, 30 dias após a instalação do experimento. Curitiba-PR, 2010.

Cultivares	Altura (cm) ¹	Número de raízes ¹	Comprimento das raízes (cm) ¹	Enraizamento (%) ¹	Sobrevivência (%) ²
Vera	4,4±0,2 b	5,5±0,3 c	7,0±1,2 b	75,0 b	92,3
Provence Blue	4,6±0,5 b	4,9±1,0 c	9,7±0,9 a	91,5 a	82,3
English	4,4±0,3 b	9,5±1,6 b	8,2±0,6 b	67,5 b	94,3
Elegance Ice	6,1±0,2 a	16,0±3,7 a	10,6±0,6 a	100,0 a	100,0
CV (%)	6,08	20,79	10,08	13,07	10,81

¹ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

² Não significativo.

Dados representam a média ± desvio padrão.

Devido à redução de custos e ao menor tempo de transferência das plantas para o campo, Martin (2003) concluiu que o enraizamento *ex vitro* é mais vantajoso em comparação ao enraizamento *in vitro* para *Rotula aquatica*. O enraizamento *ex vitro* pode reduzir os custos da propagação de plantas pela cultura de tecidos em até 75% (DEBERGH; MAENE, 1981; PREECE; SUTTER, 1991; SUNANDAKUMARI et al., 2004). Os resultados encontrados neste trabalho indicam que o enraizamento *ex vitro* de microestacas de *L. angustifolia* pode ser uma alternativa para a produção de mudas dessa espécie.

6.4 CONCLUSÕES

Para o enraizamento *ex vitro* de *L. angustifolia*, recomenda-se aplicação do regulador vegetal AIB na concentração de 5,0 mM.

O enraizamento *ex vitro* de microestacas das cultivares Vera, Provence Blue, English e Elegance Ice de *L. angustifolia* é recomendado por proporcionar alta porcentagem de sobrevivência e de enraizamento na fase de aclimatização.

6.5 REFERÊNCIAS

ABREU, M.; PEDROTTI, E.L. Micropropagação de macieira. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.6, n.31, p.100-108, 2003.

AUGUSTO, C.S.S. et al. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de Amoreira-preta cv. 'Brazos'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.3, p.473-476, 2006.

BIASI, L.A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Layer Studio, 2009. 160p.

CALVO, M.C.; SEGURA, J. *In vitro* morphogenesis from explants of *Lavandula latifolia* and *Lavandula stoechas* seedlings. **Scientia Horticulturae**, v.36, n.1, p.131-137, 1988.

CALVO, M.C.; SEGURA, J. *In vitro* propagation of lavender. **HortScience**, v.24, n.2, p.375-376, 1989.

DAI, W. et al. Plant regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of two elite aspen hybrid clones from *in vitro* leaf tissues. **In vitro Cellular and Developmental Biology– Plant**, v.39, n.1, p.6-11, 2003.

DAI, W. et al. Plant regeneration of chokecherry (*Prunus virginiana* L.) from *in vitro* leaf tissues. **Journal of Environmental Horticulture**, v.22, n.4, p.225-228, 2004.

DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. A scheme for the commercial propagation of plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, v.14, n.4, p.335-345, 1981.

ECHEVERRIGARAY, S.; BASSO, R.; ANDRADE, L.B. Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants. **Biology Plantarum**, v. 49, p. 439-442, 2005.

FERREIRA, B.G.A. et al. Metodologias de aplicação de AIB no enraizamento de estacas semilenhosas de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.2, p.196-201, 2009.

GARCÍA, E.A.; GONZÁLEZ, A.M. Enraizamento *ex vitro* de quatro cultivares de zarzamora (*Rubus* spp.). **Revista Chapingo**, v.16, n.78, p.107-109, 1992.

GONÇALVES, J.C. et al. *In vitro* propagation of chestnut (*Castanea sativa* x *C. crenata*): Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. **Scientia Horticulturae**, v.72, n.3-4, p.265-275, 1998.

GRAS, M.C.S.; CALVO, M.C. Micropropagation of *Lavandula latifolia* through nodal bud culture of mature plants. **Plant Cell, Tissue and Organ culture**, v.45, n.3, p.259-261, 1996.

GROUT, B.W.W.; ASTON, M.J. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. **Horticultural Research**, v.17, n.1, p.1-7, 1977.

JORDAN, A.M.; CALVO, M.C.; SEGURA, J. Morphogenesis in callus and single-cell cultures of *Lavandula latifolia* Medicus. **Journal of Horticulturae Science**, v.65, n.1, p.49-53, 1990.

KAPAUN, J.A.; CHENG, Z.M. Plant regeneration from leaf tissues of *Siberian elm*. **HortScience**, v.32, n.2, p.301-303, 1997.

KLERK, G.J. Rooting of microcuttings: theory and practice. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.38, n.5, p.415-422, 2002.

KIM, M.S. et al. *In vitro* and *ex vitro* rooting of micropropagated shoots using three Green ash (*Fraxinus pennsylvanica*) clones. **New Forests**, v.13, n.1, p.43-57, 1998.

MARTIN, K.P. Rapid axillary bud proliferation and *ex vitro* rooting of *Eupatorium triplinerve*. **Biologia Plantarum**, v.47, n.4, p.589-591, 2003.

MOON, T. et al. Antibacterial activity of essential oils, hydrosols and plant extracts from Australian grown *Lavandula* spp. **International Journal of Aromatherapy**, v.16, n.1, p.9-14, 2006.

OLIVEIRA, M.C. et al. Enraizamento de estacas de duas cultivares de oliveira submetidas à aplicação de diferentes fertilizantes. **Bragantia**, v.69, n.1, p.99-103, 2010.

PANIZZA, M.; TOGNONI, F. Micropropagation of Lavandin (*Lavandula officinalis* Chaix x *Lavandula latifolia* Villars cv. Grosso). In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. v.19. High-tech and micropropagation III. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1991. p.295-305.

PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds.). **Micropropagation – Technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.71-93.

QUAZI, M.H. *In vitro* multiplication of *Lavandula* spp. **Annals of Botany**, v.45, n.3, p.361-362, 1980.

SEGANFREDO, R. et al. Influência do ácido indolbutírico e de épocas de coleta de estacas no enraizamento de cultivares de ameixeira (*Prunus salicina* Lindl.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.1, n.1, p.40-42, 1995.

SUNANDAKUMARI, C. et al. Rapid axillary bud proliferation and *ex vitro* rooting of herbal spice, *Mentha piperita* L. **Indian Journal of Biotechnology**, v.3 p.108-112, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TOFANELLI, M.B.D. et al. Enraizamento de estacas lenhosas e semilenhosas de cultivares de ameixeira com várias concentrações de ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p.509-513, 2002.

TREVISAN, R. et al. Enraizamento de estacas herbáceas de mirtilo: influência da lesão na base e do ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.2, p.402-406, 2008.

TSURO, M. et al. Efficient plant regeneration from multiple shoots formed in the leaf-derived callus of *Lavandula vera*, using the “open culture system”. **Scientia Horticulturae**, v.86, n.1, p.81-88, 2000.

VERMA, R. et al. Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.75, n.3, p.343-348, 2010.

YAN, H. et al. *In vitro* and *ex vitro* rooting of *Siratia grosvenorii*, a traditional medicinal plant. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, n.1, p.115-120, 2010.

XU, J. et al. Rapid *in vitro* multiplication and *ex vitro* rooting of *Malus zumi* (Matsumura) Rehd. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.30, n.1, p.129-132, 2008.

7 CAPÍTULO V

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lavandula angustifolia* MILL. PROPAGADA *IN VITRO* E CULTIVADA EM SÃO JOAQUIM (SC)

RESUMO

O óleo essencial de *L. angustifolia* possui diversas aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética, perfumaria e alimentícia. Este trabalho teve por objetivo caracterizar o óleo essencial extraído das inflorescências de *L. angustifolia* cv. Provence Blue micropropagada e cultivada em São Joaquim (SC). Mudanças micropropagadas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, com 180 dias de aclimatização em casa de vegetação, foram transferidas para o Campo Experimental da EPAGRI, em São Joaquim (SC). Em janeiro de 2011 as inflorescências foram colhidas e o óleo essencial foi extraído por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger, durante duas horas. O óleo obtido foi quantificado e armazenado a -20 °C até o momento da análise. Com base na massa seca o teor de óleo foi de 4,0%, considerado alto para essa espécie. A caracterização química do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Os componentes majoritários encontrados no óleo essencial das inflorescências de *L. angustifolia* cv. Provence Blue foram linalol (46,88%), acetato de linalila (10,09%), 1,8-cineol (7,63%), acetato de lavandulila (6,98%), borneol (4,92%), trans-cariofileno (3,98%) e trans- β -ocimeno (3,42%). Cânfora, que deprecia a qualidade do óleo, não foi encontrada no óleo essencial de *L. angustifolia* cv. Provence Blue.

Palavras-chave: Lamiaceae, micropropagação, linalol, acetato de linalila.

**CHEMICAL CHARACTERIZATION OF *Lavandula angustifolia* MILL.
ESSENTIAL OIL OF *IN VITRO* PROPAGATED PLANTS AND
CULTIVATED IN SÃO JOAQUIM (SC)**

ABSTRACT

The essential oil of *L. angustifolia* has several applications in the pharmaceutical, cosmetic, toiletries and food industries. This work was aimed to characterize the essential oil extracted from the inflorescences of *L. angustifolia* cv. Provence Blue micropropagated and cultivated in São Joaquim (SC). Plantlets of *L. angustifolia* cv. Provence Blue, with 180 days of acclimatization in the greenhouse were transferred to the Experimental Field EPAGRI, São Joaquim (SC). In January 2011 the inflorescences were harvested and the essential oil was extracted by hydrodistillation in Clevenger type apparatus for two hours. The oil obtained was quantified and stored at -20 °C until analysis. Based on dry weight oil, content was 4.0%, considered a high grade for this species. The chemical characterization of the essential oil was performed by gas chromatography-mass spectrometry. The major components found in essential oil from inflorescences of *L. angustifolia* cv. Provence Blue were linalool (46.88%), linalyl acetate (10.09%), 1,8-cineole (7.63%), lavandulila acetate (6.98%), borneol (4,92%), transcariofileno (3.98%) and trans- β -ocimene (3.42%). Camphor, which detracts the quality of the oil, was not found in the essential oil of *L. angustifolia* cv. Provence Blue.

Key words: Lamiaceae, micropropagation, linalool, linalyl acetate.

7.1 INTRODUÇÃO

Lavandula angustifolia Miller, também conhecida como lavanda verdadeira, é um arbusto perene de altitude elevada, ocorre acima de 1.500 m, estando distribuída em toda a região do Mediterrâneo. Seu crescimento é compacto e arredondado, e seu florescimento ocorre no verão. As flores formam espigas interrompidas com fragrância muito doce. As partes da planta utilizadas para a destilação do óleo essencial são as flores e, em menor quantidade, as folhas (BEUS, 2005).

O óleo essencial da lavanda possui mais de 100 componentes, na maioria terpenos. Os dois principais constituintes são acetato de linalila e linalol, que normalmente compõem 35% (p/v) do total do óleo. Cânfora é um componente presente em menor quantidade no óleo essencial, possuindo um grande efeito negativo sobre a determinação da qualidade do óleo. O óleo essencial de mais alta qualidade tem cerca de 0,5-1% de cânfora. Enquanto que o óleo com 5-10% de cânfora é inadequado para muitas aplicações, incluindo a adição em alimentos. Outros constituintes presentes em menores quantidades no óleo também afetam sua qualidade (MCGIMPSEY; PORTER, 1999).

A lavanda é uma das plantas medicinais mais úteis, e seu óleo essencial tem sido amplamente empregado na fabricação de perfumes e cosméticos. Vários efeitos terapêuticos já foram relatados (CAVANAGH; WILKINSON, 2002; HUI et al., 2010), como sedativo, relaxante, antioxidante, bactericida e antiviral.

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar o óleo essencial de plantas micropropagadas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue e aclimatadas em São Joaquim, Santa Catarina.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas neste estudo mudas micropropagadas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue. As exsiccatas do material encontram-se depositadas no Herbário do Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, (PR), sob o registro N° UPCB 61303.

As mudas permaneceram, após a aclimatização, em casa de vegetação por um período de seis meses. Em seguida foram levadas para a Estação Experimental da EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A), no município de São Joaquim, SC (S 28°17'39'', W 49°55'56'' e 1.415 m de altitude), em janeiro de 2010. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é subtropical com verões brandos (cfb).

O solo é classificado como Neossolo Litólico Húmico (EMBRAPA, 2006), com cerca de 0,40 m de horizonte A, apresentando textura argilo-arenosa com 40% argila, 50% areia, 10% silte, com uma profundidade efetiva de 0,4 m, sendo desenvolvido de riodacitos da formação Serra Geral. Na tabela 9 estão apresentadas as características químicas do solo da área no momento do plantio.

As plantas foram dispostas em duas fileiras com espaçamento de 0,70 m entre plantas e 1,0 m entre linhas (Figura 11A).

TABELA 9 - Análise de solo da área experimental, coletado na profundidade de 0-20 cm. São Joaquim, SC, 2010.

pH	Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	SB	T	P	C	V	Argila
SMP	cmol _c dm ⁻³						mg dm ⁻³	g dm ⁻³	%	g kg ⁻¹
5,4	0,60	4,30	2,90	0,65	7,85	16,35	44,30	52,0	48	650,0

A colheita foi realizada em 09 de janeiro de 2011, no período da manhã. As inflorescências (Figura 11B) foram levadas para o Laboratório de Ecofisiologia, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo (UFPR), onde foi realizada a destilação do óleo essencial a partir das inflorescências frescas.

Para a extração do óleo essencial foi utilizado o método de hidrodestilação em aparelho graduado tipo Clevenger, por 120 min (Figura 11C). O material vegetal, amostras de 100 g de inflorescências frescas, em triplicata, foi colocado em balão volumétrico de dois litros e acrescentado um volume de um litro de água destilada. O óleo extraído foi quantificado com micropipeta de precisão e colocado em tubos plásticos de 2 mL, armazenado à -20 °C até o momento da análise.

A caracterização química do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Análise de Combustíveis Automotivos, do Departamento de Engenharia Química da UFPR, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, em cromatógrafo Varian Inc. (modelo CP-3800), com detector Saturn 2000 MS/MS e coluna sílica fundida com 30 m de comprimento (fase estacionária PONA). Utilizou-se hélio como gás de arraste sob pressão da coluna de 30,0 psi. A condição inicial de temperatura era de 60 °C, com elevação da temperatura a 90 °C na razão de 3 °C, elevação da temperatura a 240 °C na razão de 30 °C permanecendo por 5 min. O volume de 0,1 µL de óleo essencial foi injetado com razão de split 200 e temperatura de injeção de 250 °C.

Os índices de retenção (Tabela 10) para o óleo essencial das inflorescências foram calculados após a injeção de uma série homóloga de *n*-alcanos, nas mesmas condições utilizadas para as amostras. O espectro de massas e o índice de retenção linear foram comparados aos reportados em literatura para identificação segura (ADAMS, 2007).

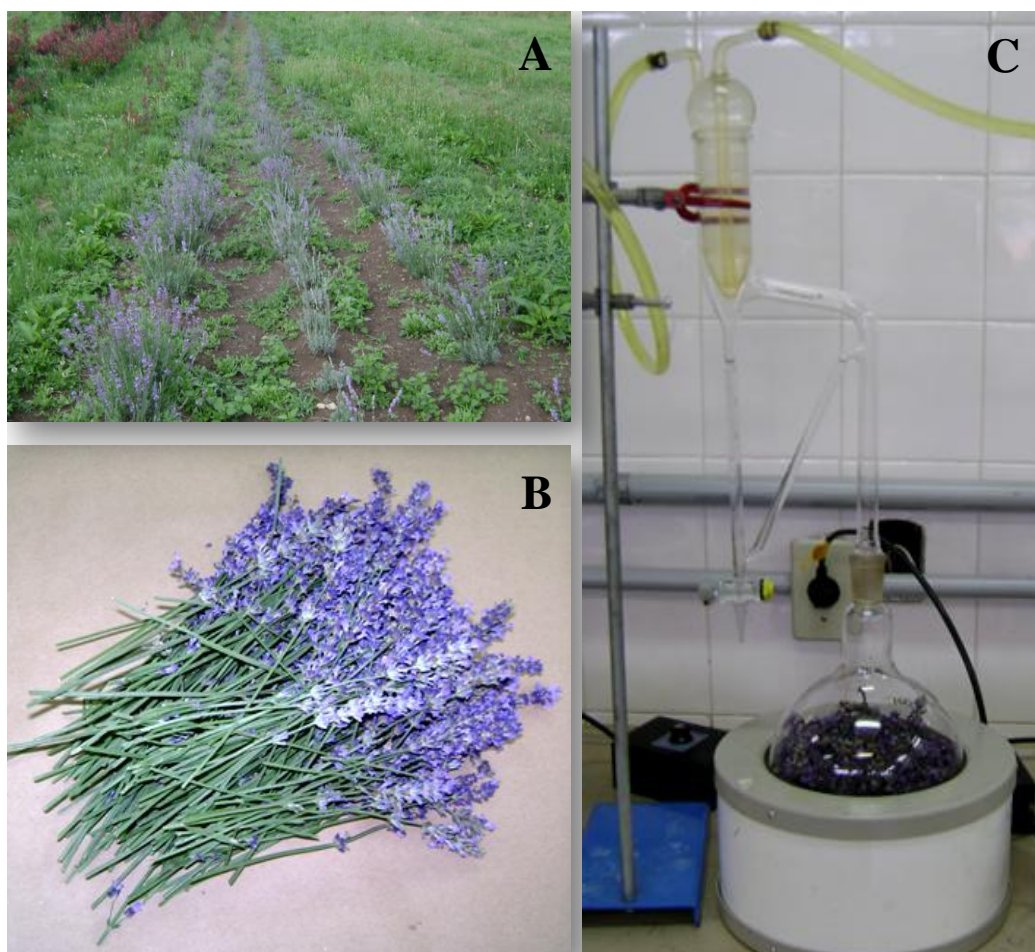


FIGURA 11 – (A) Plantas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue no campo, antes da colheita. (B) Inflorescências após a colheita. (C) Extração do óleo essencial das inflorescências em aparelho graduado tipo Clevenger.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, após um ano de cultivo em São Joaquim (SC), apresentaram 95,2% de florescimento. As inflorescências apresentavam-se em diferentes estádios de maturação, e numa mesma inflorescência foram observadas flores fechadas, flores abertas e flores murchas. As inflorescências mais imaturas, nas quais as flores encontravam-se apenas em botão, não foram utilizadas na avaliação. Na Figura 12 estão apresentados dois exemplos de inflorescências, que representam aquelas utilizadas nas extrações dos óleos essenciais. Devido à época em que foi realizada a colheita, a maioria das inflorescências apresentavam flores num estágio mais avançado de maturação, conforme pode ser observado na Figura 12B. Guitton et al. (2010), definiram cinco estádios de maturação para as flores individuais de lavanda, e estudando a influência desses estádios na composição dos terpenos, observaram três diferentes composições de terpenos em relação aos estádios de maturação das flores (flores fechadas, flores abertas e flores murchas). Em uma mesma espiga, a quantidade total de terpenos foi mais elevada quando a maioria das flores estavam abertas. Logo, fica evidente que a idade de colheita das inflorescências influenciou fortemente os resultados encontrados no teor dos compostos do óleo essencial extraído de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, apresentados a seguir. Segundo Menary (2006), a produção de óleo essencial de lavanda, em conformidade com as normas da ISO (International Organization for Standardization), é possível se a colheita é realizada no momento apropriado.

O número de inflorescências com flores abertas por planta foi em média 28 inflorescências por planta. A massa fresca das inflorescências por planta foi 39,5 g, e 33% desse valor corresponde à massa seca, ou seja, 13,02 g de massa seca de inflorescência por planta.

O teor de óleo essencial das inflorescências de *L. angustifolia* cv. Provence Blue cultivada em São Joaquim (SC) foi de 4,0% (v/p), com base na massa seca. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Chatzopoulou e Goliaris (2003), com a mesma espécie no Norte da Grécia. Esse rendimento é classificado como o mais alto relatado na literatura para os óleos de lavanda (KUSTRAK; BESIK, 1975; PORTER; SHAW; HURNDELL, 1982). Pois, por exemplo, em Kumaon, região situada no ocidente do Himalaia, foi encontrado teor de 2,8% de óleo essencial de *L. angustifolia*, e diferentes acessos apresentaram somente 0,80 a 1,3% de óleo essencial nas inflorescências, em Kashmir (DHAR et al., 1982).

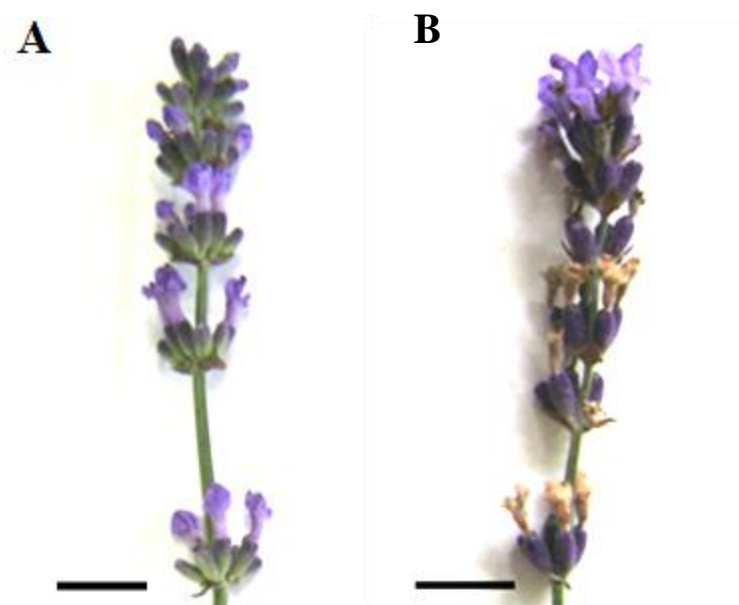


FIGURA 12 – Inflorescências de *Lavandula angustifolia* cv. Provence Blue colhidas em São Joaquim (SC). (A) Flores abertas e fechadas. (B) Flores abertas e senescentes. Barras: 1,0 cm.

Os componentes majoritários encontrados no óleo essencial das inflorescências de *L. angustifolia* cv. Provence Blue foram linalol (46,88%), acetato de linalila (10,09%), 1,8-cineol (7,63%), acetato de lavandulila (6,98%), borneol (4,92%), trans-cariofileno (3,98%) e trans- β -ocimeno (3,42%) (Tabela 10). O constituinte 1,8-cineol (7,63%), que reduz a qualidade do óleo, apresentou teor acima do determinado pela ISO3515 e pela Farmacopeia Europeia 5.0 (EP5). No entanto, acetato de linalila e 3-octanona apresentaram-se dentro da faixa estabelecida para o óleo essencial de *L. angustifolia* (Tabela 10). Cânfora, que deprecia a qualidade do óleo, não foi encontrada no óleo essencial das inflorescências de *L. angustifolia* cv. Provence Blue.

O teor de linalol encontrado no presente óleo (46,88%) está dentro da faixa encontrada para diferentes cultivares de *L. angustifolia* na França (49,86% e 44,44%) (BERNARD et al., 1989). Porém, está acima do determinado pela ISO3515 (25% - 38%) e pela Farmacopeia Europeia (EP5) (20% - 45%) (Tabela 10).

Os compostos oxigenados nerol e acetato de geranila, que são importantes para o aroma em geral do óleo, dando um uma nota doce e agradável para o óleo, contribuíram com 1,94% do óleo essencial (Tabela 10).

TABELA 10 – Constituintes (%) do óleo essencial das inflorescências de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, colhidas em São Joaquim (SC) em janeiro de 2011.

Constituinte	IR ^a	IR ^b	Area (%)	ISO3515 ^c	EP 5 ^d (%)
3-Octanona	983	979	1,08	tr-2,0	0,10-2,5
Mirceno	987	988	0,58	-	-
Limoneno	1028	1024	0,11	-	-
β-Felandreno	1030	1025	0,51	tr-0,5	-
1,8-Cineole	1033	1026	7,63	<1,0	< 2,5
Trans-β-Ocimeno	1043	1044	3,42	-	-
Óxido de linalol B	1069	1067	0,41	-	-
Óxido de linalol A	1086	1084	0,46	-	-
Linalol	1098	1095	46,88	25-38	20-45
Acetato de 1-octen-3-ol	1106	1110	0,52	-	-
Borneol	1173	1165	4,92	-	-
σ-Terpineol	1196	1199	1,87	-	-
Nerol	1225	1227	1,47	-	-
Geraniol	1249	1254	0,73	-	-
Acetato de linalila	1251	1257	10,09	25-45	25-46
Acetato de lavandulila	1281	1288	6,98	> 2,0	> 0,2
Nerolato etílico	1357	1351	0,47	-	-
Acetato de geranila	1376	1379	0,81	-	-
Trans-cariofileno	1417	1417	3,98	-	-
Trans-β-farneseno	1450	1454	0,20	-	-
Total Identificado			93,13		

^aÍndice de retenção experimental (coluna DB-5; referente a *n*-alcano); ^bÍndice de retenção literatur (ADAMS, 2007); ^cISO3515 (2002) ^dFarmacopéia Européia 5.0.

7.4 CONCLUSÕES

As plantas micropropagadas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue florescem nas condições de São Joaquim (SC) no primeiro ano de estabelecimento a campo, na época do verão.

O teor de óleo essencial encontrado é considerado alto para a espécie, e os compostos linalol e acetato de linalila apresentaram-se como constituintes majoritários presentes no óleo essencial, porém fora dos padrões da ISO e da farmacopeia europeia.

7.5 REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 2007.

BERNARD, T. et al. Extraction of essential oils. III. Two-stage production of the oil of *Lavandula angustifolia* Mill. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, n. 6, p. 261-267, 1989.

BEUS, E.C. **Growing and marketing Lavender**. Farm the Northwest series- Small Farms Team. Washington State University – Extension, 2005. 28 p.

CAVANAGH, H.M.; WILKINSON, J.M. Biological activities of lavender oil. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 301-308, 2002.

CHATZOPOULOU, P.S.; GOLIARIS, A.H. Contribution to the analysis of the volatile constituents from some lavender and lavandin cultivars grown in Greece. **Scientia Pharmaceutica**, v. 71, p. 229-234, 2003.

DHAR, A.K. et al. Prospectus of lavender cultivation in Kashmir. **Pafai Journal**, v. 4, n. 4, p. 20-22, 1982.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Brasília, 2006. 306 p.

GUITTON, Y. et al. Lavender inflorescence: a model to study regulation of terpenos synthesis. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 6, p. 749-751, 2010.

HUI, L. et al. Chemical composition of lavender essential oil and its antioxidant activity and inhibition against rhinitis-related bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 309-313, 2010.

ISO 3515. **Oil of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.)**. 2002.

KUSTRAK, D.; BESIC, J. Aetheroleum lavandulae and Aetheroleum lavandulea hybridae in Pharmacopeia Jugoslavis III. **Pharma Acta Helvetiae**, v. 50, n. 11, p. 373-378, 1975.

MCGIMPSEY, J.A.; PORTER, N.G. **Lavender: a grower's guide for commercial production**. 2^a ed. Christchurch: New Zealand Food & Crop Research Limited. 1999.

MENARY, R. Improved oil quality and yield from Tasmanian-grown French lavender. **Rural Industries Research and Development Corporation**, n. 6, p. 6, 2006.

PORTER, N.G.; SHAW, M.L.; HURNDELL, L.C. Preliminary studies of lavender as an essential oil crop for New Zealand *Lavandula*, biochemical analysis, yield, plant extracts, linalyl acetate. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 25, n. 3, p. 389-394, 1982.

8 CONCLUSÕES FINAIS

A propagação vegetativa de *L. angustifolia* cv. Provence Blue pode ser realizada pela técnica da micropropagação, a partir de ápices caulinares cultivados em meio de cultura MS suplementado com 0,5 μ M de BAP. Para a multiplicação das brotações o meio de cultura recomendado é o LS com adição de 1,0 μ M de BAP, com subcultivos a cada 30 dias. As brotações devem ser enraizadas *ex vitro*, tratadas com 5,0 mM de AIB, via imersão da base das microestacas em solução por 10 segundos, ou via talco aplicado também na base das microestacas. Durante um período de 15 dias as microestacas devem permanecer em câmara de nebulização, e após esse período podem ser transferidas para casa de vegetação. As condições climáticas de São Joaquim (SC) foram propícias para o florescimento das plantas. A *L. angustifolia* cv. Provence Blue produziu altos teores de linalol e acetato de linalila, em seu óleo essencial.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de micropropagação é uma alternativa de propagação vegetativa para genótipos de *L. angustifolia*, que não enraízam adequadamente pela técnica de estaquia, tornando-se uma importante ferramenta na produção massal de mudas da espécie, podendo viabilizar sua exploração econômica.

Os diversos fatores que controlam a morfogênese *in vitro* afetam significativamente o desempenho das culturas, e se não bem controlados podem limitar o uso da técnica. A cultivar Provence Blue, escolhida como modelo para os trabalhos desenvolvidos, apresentou sensibilidade as concentrações acima de 1,0 μM de citocininas. Os sintomas de hiperidricidade e a necrose apical foram os principais problemas encontrados durante a micropropagação. A partir dos resultados encontrados para a redução dessas desordens do cultivo *in vitro*, com aumento do cálcio no meio de cultura, novos trabalhos poderão ser realizados, por exemplo, avaliando se há influência do genótipo na absorção do cálcio pelas brotações *in vitro*. Também outras fontes de cálcio para o meio de cultura, como o glutamato de cálcio, buscando evitar possíveis sintomas de toxidez pelo cloro. Sabe-se que a hiperidricidade pode ocorrer devido a várias causas, logo para que os sintomas sejam eliminados da cultura, devem ser investigados outros fatores que possam estar envolvidos na promoção dessa desordem, como o período entre um subcultivo, vedação do frasco, tamanho do frasco e outros.

Para o isolamento de ápices meristemáticos é necessário tempo e habilidade, por serem explantes de tamanho bastante reduzido, porém, possuem a vantagem de não apresentarem grandes problemas com contaminação e também com oxidação fenólica. A cinetina é uma citocinina de custo mais elevado em comparação a BAP, por isso, esta tem sido frequentemente utilizada na micropropagação, além de promover maior taxa de multiplicação. Sugere-se que

sejam realizados estudos para avaliar o efeito das citocininas na multiplicação das brotações para otimizar a técnica.

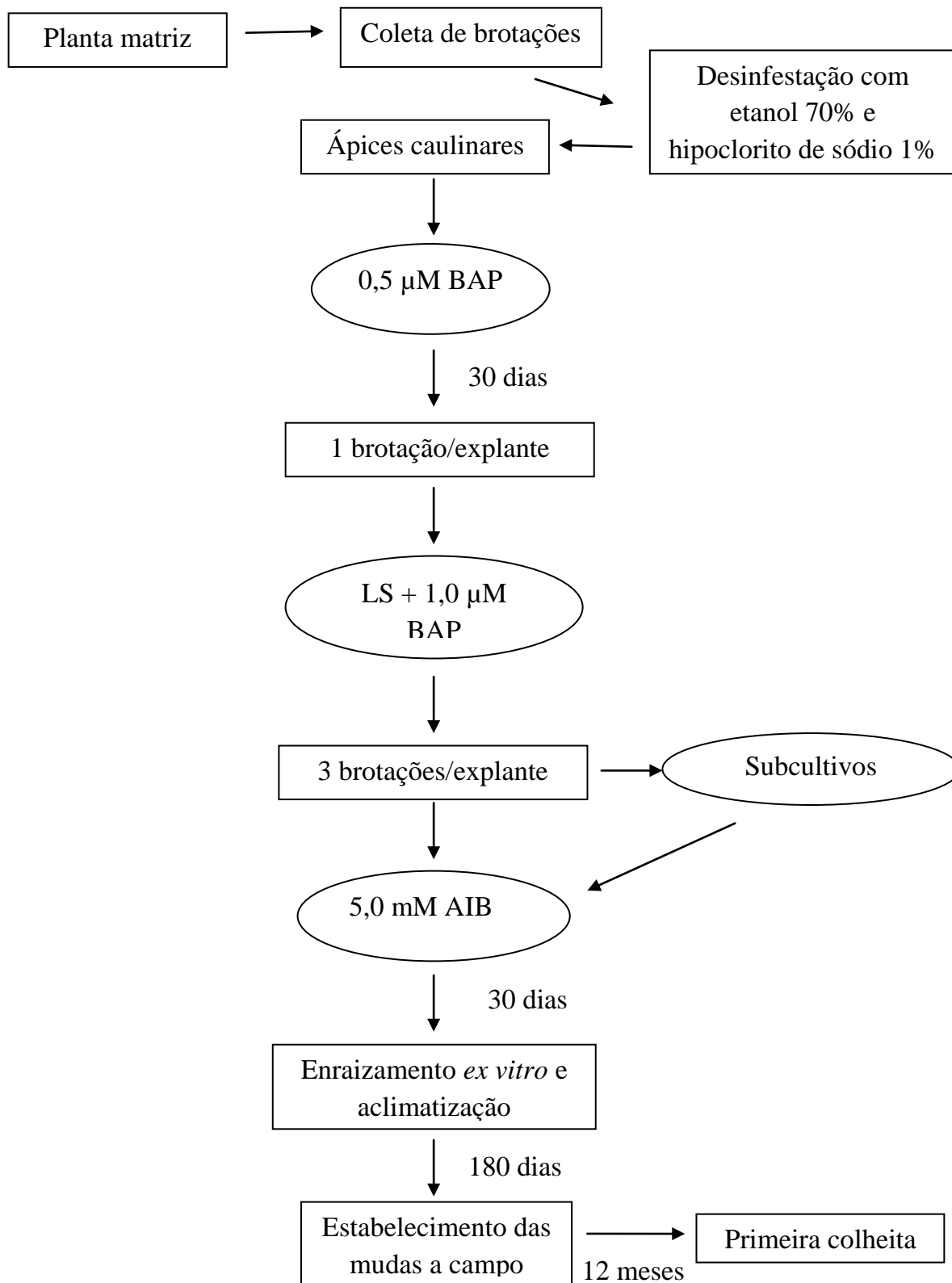
O enraizamento *in vitro* da *L. angustifolia* cv. Provence Blue não apresentou bons resultados, entretanto, o enraizamento das brotações *ex vitro* foi satisfatório, sendo seu uso a melhor opção para a obtenção das mudas, que concomitantemente são enraizadas e aclimatizadas com sucesso. A escolha do substrato é um fator importante para a obtenção do sistema radicial, por isso, diferentes substratos podem ser testados na fase de enraizamento *ex vitro*, visando à obtenção de um sistema radicial de qualidade com redução de custo. Também, devido ao reduzido tamanho que as mudas se encontram, após o período de aclimatização, é importante que sejam proporcionadas condições para seu crescimento e desenvolvimento antes do transplante para o campo.

A caracterização do óleo essencial de *L. angustifolia*, realizada no presente estudo, torna-se um ponto de partida para novas investigações da produção de óleo essencial dessa espécie nas condições brasileiras. Por tratar-se de uma planta de dias longos e vernalização obrigatória, São Joaquim (SC) apresenta condições adequadas para o seu florescimento.

A partir desses resultados preliminares, a *L. angustifolia* é uma espécie que apresenta potencial para o cultivo no Brasil, porém, mais estudos devem ser realizados para viabilizar a produção comercial da espécie visando à produção de óleo essencial, como diferentes cultivares, em diferentes regiões e, testar indutores de florescimento.

ANEXOS

ANEXO 1. Esquema representativo das etapas da micropropagação de *Lavandula angustifolia* cv. Provence Blue.



ANEXO 2. Composição química dos meios de cultura MS, LS e WPM.

Componentes	MS		LS		WPM	
	mg L ⁻¹	μM	mg L ⁻¹	μM	mg L ⁻¹	μM
Macronutrientes						
NH ₄ NO ₃	1650	20612,12	1650	20612,12	400	5000,00
KNO ₃	1900	18791,41	1900	18791,41	-	-
K ₂ SO ₄	-	-	-	-	990	5680,40
KH ₂ PO ₄	170	1249,17	170	1249,17	170	1249,70
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	-	-	556	2354,40
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	2992,59	440	2992,59	96	652,93
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	1501,01	370	1501,01	370	1501,10
Micronutrientes						
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80	100,00	27,80	100,00	27,80	100,00
Na ₂ EDTA	37,30	100,20	37,30	100,20	37,30	100,20
H ₃ BO ₃	6,20	100,26	6,20	100,26	6,20	100,26
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30	99,97	22,30	99,97	22,30	99,97
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	29,91	8,60	29,91	8,60	29,91
KI	0,83	5,00	0,83	5,00	-	-
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25	1,03	0,25	1,03	0,25	1,03
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,10	0,025	0,10	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,10	0,025	0,10	0,25	1,00
Substâncias orgânicas						
	mg L ⁻¹		mg L ⁻¹		mg L ⁻¹	
Tiamina-HCl	0,1		0,4		0,1	
Piridoxina-HCl	0,5		-		0,5	
Ácido Nicotínico	0,5		-		0,5	
Glicina	2		-		2	
Mio-inositol	100		100		100	
Sacarose	30.000		30.000		30.000	

ANEXO 3. Composição iônica dos meios de cultura MS, MS/2, LS e WPM

ÍONS	MEIOS DE CULTURA			
	MS	MS/2	LS	WPM
Macroelementos (mM)				
NH ₄ ⁺	20,6	10,3	20,6	5,0
NO ₃ ⁻	39,4	19,7	39,4	9,71
K ⁺	20,04	10,02	20,04	12,61
Ca ⁺²	2,98	1,49	2,98	3,01
Mg ⁺²	0,30	0,15	0,30	1,50
SO ₄ ⁼	1,72	0,86	1,72	7,41
PO ₄ ⁼	1,24	0,62	1,24	1,25
Microelementos (μM)				
Mn ⁺²	100,0	50,0	100,0	100,0
Zn ⁺²	29,90	14,95	29,90	30,0
Na ⁺²	202,24	101,12	202,24	202,50
Fe ⁺²	100,0	50,0	100,0	100,0
Cl ⁻	6000	3000	6000	1306
Co ⁺²	0,104	0,052	0,104	-----
Cu ⁺²	0,1	0,05	0,1	1,00
MoO ₄ ⁼	1,02	0,51	1,02	1,03
B ⁺³	100,0	50,0	100,0	100,0
NH ₄ ⁺ + NO ₃ ⁻ (mM)	60,0	30,0	60,0	14,71
NH ₄ ⁺ / NO ₃ ⁻ (mM)	1,04	0,52	1,04	0,51
Total de íons (mM)	92,92	46,46	92,92	41,06

ANEXO 4. Resumo da análise de variância do efeito de diferentes meios de cultura na altura, número de folhas, número de brotações por explante, porcentagem de hiperidricidade e porcentagem de necrose apical de *L. angustifolia in vitro*.

Causas de variação	GL	QM				
		Altura (cm)	Folha (n°)	Brotação /explante	Hiperidricidade (%)	Necrose apical (%)
Bloco	3	0,0463*	1,601ns	0,214ns	0,0002ns	0,0003ns
Meios	3	0,770**	16,25**	1,403**	0,0003*	0,004**
Erro	9	0,0102	1,258	0,1181	0,000006	0,00009
Total	15					
Bartlett's (Q ²)		1,09378	3,11913	5,30455	5,05641	2,03037

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

** Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 5. Resumo da análise de variância do efeito de AIB e ANA em diferentes concentrações na altura, número de raízes, comprimento das raízes e porcentagem de enraizamento de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, na fase de enraizamento *in vitro*.

Causas de variação	GL	QM			
		Altura (cm)	Número de raízes	Comprimento das raízes	Enraizamento (%)
Bloco	3	0,227ns	0,695ns	0,306*	0,052ns
Auxina (A)	1	0,031ns	0,611ns	0,340ns	0,273*
Concentração (B)	3	0,250ns	0,962ns	0,244ns	0,047ns
A x B	3	0,192ns	2,00*	0,784**	0,326**
Erro	21	0,096	0,373	0,090	0,058
Total	31				
Bartlett's (Q ²)		2,980	1,783	2,694	0,697

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

** Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 6. Resumo da análise de variância do efeito de AIB e ANA em diferentes concentrações na porcentagem de enraizamento e porcentagem de sobrevivência de *L. angustifolia*, após 30 dias de aclimatização.

Causas de variação	GL	QM	
		Enraizamento (%)	Sobrevivência (%)
Bloco	3	0,006ns	0,027ns
Auxina (A)	1	0,003ns	0,034ns
Concentração (B)	3	0,054**	0,058**
A x B	3	0,028*	0,213**
Erro	21	0,006	0,010
Total	31		
Bartlett's (Q ²)		5,428	5,963

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

** Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 7. Resumo da análise de variância do efeito de CaCl₂ na altura, número de folhas, número de brotações por explante, porcentagem de hiperidricidade e porcentagem de necrose apical de *L. angustifolia in vitro*, após o primeiro subcultivo.

Causas de variação	GL	QM				
		Altura (cm)	Folha (nº)	Brotação /explante	Hiperidricidade (%)	Necrose apical (%)
Bloco	3	0,41ns	0,074ns	0,755ns	0,0001ns	0,0001*
CaCl ₂	5	1,77ns	11,745**	0,772ns	0,002**	0,002**
Erro	15	0,183	0,143	0,530	0,0001	0,0001
Total	23					
Bartlett's (Q ²)		4,317	9,574	8,686	3,166	7,990

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

** Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 8. Resumo da análise de variância do efeito de CaCl_2 na altura, número de folhas, número de brotações por explante, porcentagem de hiperidricidade e porcentagem de necrose apical de *L. angustifolia in vitro*, após o segundo subcultivo.

Causas de variação	GL	QM				
		Altura (cm)	Folha (n°)	Brotação /explante	Hiperidricidade (%)	Necrose apical (%)
Bloco	3	0,038ns	0,4278ns	0,1304ns	32,477ns	0,016ns
CaCl_2	5	0,829**	20,909**	0,2714ns	641,56**	0,085**
Erro	15	0,1057	1,7711	0,1761	72,1096	0,018
Total	23					
Bartlett's (Q^2)		5,22063	9,83885	3,33213	7,93191	4,71913

ns – não significativo.

** Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 9. Resumo da análise de variância do efeito de CaCl_2 na altura, número de raízes, comprimento das raízes e porcentagem de enraizamento de *L. angustifolia*, na fase de enraizamento *in vitro*.

Causas de variação	GL	QM			
		Altura (cm)	Número de raízes	Comprimento das raízes	Enraizamento (%)
Bloco	3	0,028ns	0,1317ns	0,0082*	57,586ns
CaCl_2	5	0,525**	0,6057*	0,902**	95,894ns
Erro	15	0,0527	0,1570	0,1428	52,1356
Total	23				
Bartlett's (Q^2)		18,68740	4,92712	8,92241	45,02152

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

** Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 10. Resumo da análise de variância do efeito de duas concentrações de CaCl_2 combinadas com dois subcultivos na altura, número de folhas e número de brotações por explante de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, cultivadas *in vitro*.

QM				
Causas de variação	GL	Altura (cm)	Número de folhas	Brotações/ explante
Bloco	3	0,124ns	2,638ns	0,3617ns
Conc. de CaCl_2 (A)	1	4,000*	2,560ns	0,3025ns
Subcultivo (B)	1	0,0225ns	2,890ns	0,0400ns
A x B	3	0,0100ns	1,960ns	0,2025ns
Erro	7	0,0946	1,4367	0,0463
Total	15			
Bartlett's (Q^2)		4,69222	2,03554	10,36896

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

** Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 11. Resumo da análise de variância do efeito de duas concentrações de CaCl_2 combinadas com dois subcultivos nas porcentagens de enraizamento, necrose apical e hiperidricidade de brotações de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, cultivadas *in vitro*.

QM				
Causas de variação	GL	Enraizamento (%)	Necrose apical (%)	Hiperidricidade (%)
Bloco	3	51,593ns	10,606ns	31,268*
Conc. de CaCl_2 (A)	1	960,966**	1210,52*	154,12**
Subcultivo (B)	1	10,905ns	1394,82**	784,43**
A x B	3	116,55ns	5,1326ns	6,5454ns
Erro	7	93,2561	16,3697	24,331
Total	15			
Bartlett's (Q^2)		8,14471	2,93525	1,63789

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

** Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 12. Resumo da análise de variância do efeito de duas concentrações de CaCl_2 combinadas com diferentes porções das brotações no conteúdo de Ca^{2+} do tecido vegetal das brotações de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, cultivadas *in vitro*.

Causas de variação	GL	QM	
		Cálcio (g kg^{-1})	
Bloco	2	0,089ns	
Conc. de CaCl_2 (A)	1	197,08**	
Porções da brotação (B)	2	42,79**	
A x B	2	11,74**	
Erro	10	0,068	
Total	17		
Bartlett's (Q^2)		3,680	

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

** Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 13. Resumo da análise de variância do efeito de dois comprimentos de microestacas e quatro concentrações de AIB no número de raízes, comprimento das raízes, porcentagem de enraizamento e porcentagem de sobrevivência de microestacas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue, na fase de enraizamento *ex vitro*.

Causas de variação	GL	QM			
		Número de raízes	Comprimento das raízes	Enraizamento (%)	Sobrevivência (%)
Comprimento (A)	1	47,045**	0,750ns	0,162**	0,306**
Conc. AIB (B)	3	81,001**	21,624**	0,449**	0,459**
A x B	3	5,727**	3,156ns	0,099**	0,075**
Erro	24	0,636	2,354	0,014	0,013
Total	31				
Bartlett's (Q^2)		5,230	3,113	5,207	2,442

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

** Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 14. Resumo da análise de variância do efeito de diferentes concentrações de AIB, aplicado via talco, na altura, número de raízes, comprimento das raízes, porcentagem de enraizamento e porcentagem de sobrevivência de microestacas de *L. angustifolia* cv. Provence Blue.

Causas de variação	GL	QM				
		Altura (cm)	Número de raízes	Comp. das raízes	Enraizamento (%)	Sobrevivência (%)
Blocos	3	0,332**	1,298*	1,141ns	0,003ns	0,052*
Conc. AIB	3	0,296*	8,623**	4,209*	0,143**	0,066**
Erro	9	0,0434	0,2794	1,1519	0,013	0,008
Total	15					
Bartlett's (Q ²)		1,16371	3,69258	6,32154	3,764	3,404

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

** Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.

ANEXO 15. Resumo da análise de variância do efeito de diferentes cultivares na altura, número de raízes, comprimento das raízes, porcentagem de enraizamento e porcentagem de sobrevivência de microestacas de *L. angustifolia*.

Causas de variação	GL	QM				
		Altura (cm)	Número de raízes	Comp. das raízes	Enraizamento (%)	Sobrevivência (%)
Blocos	3	0,080ns	10,874*	0,468ns	73,059ns	64,098ns
Cultivar	4	3,981**	103,0**	13,77**	644,99**	171,838ns
Erro	12	0,104	2,747	1,0164	92,372	71,6023
Total	19					
Bartlett's (Q ²)		2,83377	12,8089	2,504	16,85237	16,6443

ns – não significativo

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro.

** Significativo estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade de erro.