

Influência da benzilaminopurina e da cinetina na micropropagação de plantas jovens de *Lavandula luisieri* (Rozeira) Rivas-Martínez

J.C. Gonçalves^{1,2}, M. Marchueta¹, G. Diogo¹

¹Lab. Biologia Vegetal, Escola Superior Agrária, 6001-909 Castelo Branco, Portugal

²CERNAS, Centro de Estudos de Recursos Naturais, Ambiente e Sociedade

Palavras chave: citocininas, *Lavandula luisieri*, micropropagação.

Resumo

Com o objectivo de desenvolver metodologias de micropropagação de *Lavandula luisieri*, foram realizados um conjunto de ensaios tendo como material vegetal explantes provenientes de germinação de sementes *in vitro*. Os ensaios de multiplicação estabelecidos com explantes secundários provenientes das plantas *in vitro* da população stock mostraram que a 6-benzilaminopurina se mostrou mais eficaz, comparativamente com a cinetina, na promoção e desenvolvimento dos rebentos tendo na concentração de 0.44 μM sido obtidos uma média de 2.2 rebentos com taxa de multiplicação de 3 e comprimentos de 20.9 mm. Contudo a utilização de concentrações mais elevadas de 6-benzilaminopurina são susceptíveis de promoverem elevadas taxa de vitrificação (35%) com consequente perda das culturas. Durante esta fase de multiplicação registou-se a formação de raízes nos rebentos tendo as percentagens de enraizamento sido maiores nos meios com cinetina, 57.5% com 0.46 μM , e no controlo. A aclimatização destas plantas foi feita com 100% de sobrevivência o que indicia o bom estado fisiológico das plantas regeneradas *in vitro*.

Resumen

Con el fin de desarrollar metodologías para la micropropagación de *Lavandula luisieri* se ha realizado una serie de pruebas con el material vegetal a partir de los explantes de la germinación *in vitro* de la semilla. La prueba de la multiplicación con explantes secundarios de plantas *in vitro* de la población mostró que 6-benzilaminopurina fue más eficaz comparativamente con la cinetina, en la la promoción y el desarrollo de brotes, siendo la concentración de 0.44 μM tenido un promedio de 2.2 brotes con tasa de multiplicación de 3 y la longitud de 20.9 mm. Sin embargo, el uso de mayores concentraciones de 6-benzilaminopurina son susceptibles de promover la vitrificación de alto nivel (35%) con la consiguiente pérdida de cosechas. Durante esta fase de multiplicación ha sido registrada la formación de raíces siendo el porcentaje de enraizamiento mayor en los medios con cinetina, el 57.5%, con 0.46 μM , y en el control. La aclimatación de estas plantas se hizo con el 100% de supervivencia que sugiere el buen estado fisiológico de las plantas regeneradas *in vitro*.

INTRODUÇÃO

O género *Lavandula* pertence à família das *Lamiaceae* (*Labiatae*) com designação vulgar de Labiadas. Recebem este nome porque possuem flores tubulares cuja “boca” termina em dois lábios, superior e inferior, ou, mais raramente, num só (Franco, 1984). Este género é nativo das Ilhas Canárias, África, sul da Europa e Mediterrâneo, Arábia e Índia. Dentro da secção *Stoechas*, que se distingue pelas três longas brácteas violetas ou brancas no topo da espiga, a *L. pedunculata* separa-se da *L. luisieri* pelo longo pedúnculo da inflorescência e a *L. viridis* distingue-se pela tonalidade verde-amarelado ou branco da espiga e pela intensa concentração de pêlos glandulares. As espécies *L. luisieri* e *L. pedunculata* abundam no nordeste, centro e sul de Portugal, enquanto que a *L. viridis*, bastante menos fácil de encontrar, ocorre apenas e esporadicamente no sudoeste e sudeste alentejanos e no barlavento algarvio.

A importância e utilidade das plantas aromáticas e medicinais tem, desde há alguns anos a esta parte, vindo a ganhar consistência numa altura em que tem sido importante a valorização

destas espécies em regiões onde a desertificação começa a ser marcante (Regato *et al.*, 1996) e onde a *Lavandula luisieri* pode vir a ter papel de destaque (Delgado *et al.*, 2007).

Grande parte das plantas medicinais e aromáticas propaga-se exclusiva ou predominantemente por via seminal. Contudo, algumas destas plantas, possuem baixas facultades germinativas e longos períodos de germinação, (Rodrigues e Almeida, 1996), pelo que as técnicas de micropropagação são uma alternativa a ter em consideração quando pretendemos plantas em larga escala.

Vários têm sido os trabalhos de micropropagação no género *Lavandula* (Jordan *et al.*, 1998, Calvo e Segura, 1989, Panizza e Tognoni, 1992, Nobre, 1996, Andrade *et al.*, 1999, Echeverrigaray *et al.*, 2005, Dias *et al.*, 2002 e Dronne *et al.*, 1999), sendo contudo inexistentes os estudos de micropropagação em *L. luisieri*. Assim, o objectivo deste trabalho, foi o de iniciar procedimentos de estabelecimento e de micropropagação nesta espécie no sentido de promover a sua valorização económica e ambiental.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

No presente trabalho foram utilizadas plantas obtidas por germinação de sementes *in vitro*. As sementes utilizadas foram recolhidas em Julho de 2005 na região da Mata, Castelo Branco, região centro interior de Portugal. A germinação das sementes foi feita em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) (MS), suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP) na concentração de 0.89 μM e 30 gl^{-1} de sacarose. O pH foi ajustado entre 5.7 e 5.8 com HCl 1N ou NaOH 1N. Por último, adicionou-se o agar, numa concentração de 7 gl^{-1} .

Estabelecimento *in vitro*

As plantas germinadas *in vitro*, foram sendo transferidas individualmente para tubos de ensaio, cada um com 15 ml de meio de cultura de MS (1962) com redução de nitratos a metade (MS1/2NO_3) e com concentrações de BAP entre 0.44 e 4.44 μM . As repicagens seguintes, para obtenção de população stock, efectuadas cada quatro semanas, foram feitas em frascos (85xø65 mm) com 50 ml de meio de cultura MS1/2NO_3 e suplementados com BAP na concentração de 0.44 μM contendo sete explantes por frasco. O explante secundário utilizado tinha entre 8 e 10 mm de comprimento.

Fases de multiplicação, enraizamento e aclimatização

O ensaio de multiplicação foi estabelecido com explantes com dimensões entre os 8 e 10 mm e que não apresentassem vitrificação, com diferentes concentrações de BAP (0.22, 0.44, 0.89 e 2.22 μM) e de cinetina (Ki) (0.23, 0.46, 0.93 e 2.32 μM). O meio de cultura utilizado foi o meio MS1/2NO_3 , suplementado com sacarose 30 gl^{-1} , agar, 7 gl^{-1} e o pH ajustado entre 5.7 e 5.8 com HCl 1N ou NaOH 1N antes de adicionar o agar. Foram utilizados tubos de ensaio (150xø25 mm) com um explante por tubo. Todas as culturas foram mantidas na sala de cultura, com fotoperíodo de 16h e uma temperatura 25/23°C, dia/noite. A iluminação foi feita por lâmpadas fluorescentes, tipo “cool white” com intensidade luminosa de 45±5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

As plantas que desenvolveram raízes durante o processo de multiplicação, foram colocadas em substrato de turfa:perlite (1:2, v:v) humedecido com solução nutritiva de 1/2 MS1/4NO_3 , em caixa de esferovite (80 x 40 x 17 cm) com tampa acrílica para serem aclimatizadas. As plantas foram colocadas na sala de cultura nas condições de cultura já descritas, durante uma semana, após o que foram transferidas para o estufim de aclimatização onde permaneceram durante 4 semanas sob intensidade luminosa de 250±10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas com redução gradual da humidade relativa de 95% até 50%.

Delineamento e tratamento estatístico

No ensaio de multiplicação foram utilizadas 40 replicações e os registos feitos 5 semanas após o seu início. Os parâmetros quantificados foram o número de rebentos diferenciados por

explante (Nreb), o número de segmentos (Nseg) que se traduz no número de explantes secundários possíveis de utilizar no subcultivo seguinte, o comprimento do maior rebento (Cmaior), o comprimento do menor rebento (Cmenor). Registou-se ainda o número de rebentos que sofreram vitrificação (em percentagem) o número de explantes enraizados (em percentagem), o número de raízes formadas por explante enraizado (Nraízes).

Para os parâmetros de multiplicação e número de raízes os resultados foram submetidos a uma ANOVA unifactorial e para valores de F significativos ($P \leq 0,05$) foi aplicado o teste de comparação de médias de Duncan. O tratamento foi feito com o programa SPSS V.16 para Windows. Para os parâmetros vitrificação e percentagem de explantes enraizados foi utilizado o programa estatístico Minitab 15, versão para Windows, por comparação de duas proporções através do cálculo do p -Value a 95% do intervalo de confiança (CI) para a diferença dessas proporções.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fase de multiplicação

Na Tabela 1 estão representados os resultados obtidos para os diferentes parâmetros de regeneração. Quanto ao parâmetro de número de rebentos por explante, verificou-se que o tratamento com $0.89 \mu\text{M}$ de BAP permitiu a obtenção do maior número de rebentos, com 2.2 rebentos não diferindo significativamente do número de rebentos obtidos com a concentração de $0.44 \mu\text{M}$ de BAP (1.7 rebentos) (Fig. 3). As restantes combinações de Ki e de BAP deram valores inferiores e não diferentes significativamente entre si. Este efeito positivo da BAP na multiplicação de rebentos em *Lavandula* foi referido por vários autores tais como Jordan *et al.* (1998), Calvo e Segura (1989), Panizza e Tognoni (1992), Nobre (1996) e Andrade *et al.* (1999). Contudo, o valor do número médio de rebentos obtido, 2.2 rebentos, é francamente inferior ao registado por outros autores, noutras espécies do género *Lavandula*, como por exemplo em *L. dentata*, onde o maior número de rebentos por explante é de 12.8, para uma concentração de $2.2 \mu\text{M}$ de BAP (Echeverrigaray *et al.*, 2005), em *L. viridis*, Dias *et al.* (2002), referem um número médio de rebentos de 11.6 utilizando meio de MS com macronutrientes a metade e suplementado com $0.67 \mu\text{M}$ de BAP, com a utilização da formulação de MS suplementada com $0.88 \mu\text{M}$ de BAP o número de rebentos obtidos foi de 6.7.

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações de BAP e de Ki na regeneração *in vitro* de rebentos de *L. luisieri*, após 4 semanas de cultura.

Tratamentos		Parâmetros			
RCV	μM	Nreb	Cmaior	Cmenor	Nseg
BAP	0.22	1.4 bc	20.1 c	10.7 bc	2.3 bc
	0.44	1.7 ab	15.1 de	10.2 c	2.0 bc
	0.89	2.2 a	20.9 bc	10.1 c	3.0 a
	2.22	1.5 bc	13.8 e	9.9 c	1.6 c
Ki	0.23	1.2 c	21.9 abc	13.3 ab	2.1 bc
	0.46	1.1 c	25.0 ab	12.2 abc	2.2 bc
	0.98	1.2 c	18.5 cd	10.4 c	1.7 c
	2.46	1.1 c	18.7 cd	10.0 c	1.7 c
Controlo	0	1.3 bc	25.5 a	13.8 a	2.5 ab

(Médias na coluna seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$)).

Dronne *et al.* (1999), num estudo na espécie lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur), onde foram usadas folhas como explante, o melhor resultado foi obtido numa das cinco cultivares, apresentando um número médio de 7 rebentos por explante.

Estas diferenças de valores podem ter alguma explicação no facto do ensaio ter sido estabelecido com explantes que estavam apenas no seu terceiro subcultivo após o início da fase de multiplicação, havendo autores que confirmaram o aumento do número de rebentos após

subcultivos sucessivos de multiplicação *in vitro* (Lall *et al.*, 2006), para além das diferenças na formulação nutritiva utilizada.

Quanto ao Nseg (Tab. 1), registou-se o valor mais elevado na modalidade 0.89 μM de BAP, com 3 segmentos, não diferindo significativamente do número de segmentos obtidos com a modalidade de controlo (2.5). As restantes sete modalidades apresentaram valores mais baixos e não diferentes significativamente entre si, com valores entre 2.3 e 1.6 segmentos.

Quanto ao Cmaior rebento (Tab. 1), verifica-se que o valor mais elevado se obteve no controlo, com 25.5 mm (Fig. 4), não diferindo significativamente dos comprimentos obtidos nas modalidades 0.23 e 0.46 μM Ki, que apresentam valores de 21.9 e 25.0 mm, respectivamente. Estes valores obtidos são semelhantes ao da espécie *L. dentata*, onde os rebentos de maior comprimento registaram um valor de 24.5 mm, para uma concentração de 2.2 μM de BAP (Echeverrigaray *et al.*, 2005). Também Dias *et al.* (2002), referem um comprimento médio dos rebentos de *L. viridis* de 23.2 mm quando utilizada a concentração de 0,46 μM de Ki e valores ligeiramente superiores (44,4 mm) com 0,67 μM de BAP.

Quanto ao Cmenor rebento (Tab. 1), a modalidade que apresentou o comprimento maior do menor rebento é o controlo, com 13.8 mm, não diferindo significativamente dos valores obtidos nas modalidades 0.23 e 0.46 μM Ki, com valores de 13.3 e 12.2 mm, respectivamente.

A presença ou ausência de vitrificação foi outro dos parâmetros analisados (Fig. 1). A vitrificação é um fenómeno que apresenta sérios problemas na formação de rebentos, aumentando a fragilidade do material em causa (Fig. 5). Verificamos que a concentração de 2.32 μM de BAP é a que apresenta maior percentagem de vitrificação com um valor igual a 35%, não diferindo significativamente das modalidades 0.44 e 0.89 μM de BAP, com valores de 30 e 20%, respectivamente. As restantes modalidades deram percentagens inferiores e não diferentes significativamente entre si, sendo a menor percentagem (5%) obtida nas modalidades controlo e 0.46 μM de Ki. Também Andrade *et al.* (1999), registaram o fenómeno de hiperhidricidade na espécie *L. vera* sob altas concentrações de TDZ (4,54 μM) e BAP (4,44 e 8,88 μM).

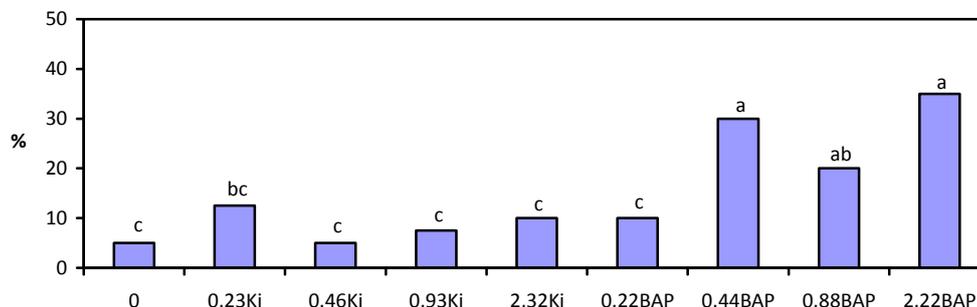


Fig. 1. Percentagens de vitrificação registadas na fase de multiplicação em cada uma das modalidades testadas. (Percentagens na coluna com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo cálculo do *p*-Value a 95% do intervalo de confiança (CI)).

Os sintomas de vitrificação ou hiperhidricidade, são provocados por desordens fisiológicas, que ocorrem, frequentemente nas culturas *in vitro* de muitas espécies e são atribuídas, principalmente, à idade do material utilizado como explantes (Ziv, 1991), o que, neste caso, não se aplica, pois trata-se de material jovem e com pouco tempo de permanência *in vitro*. Contudo a vitrificação pode ser originada por outros motivos, ou porque a concentração de agar no meio de cultura é baixa, ou porque o tipo de agar não é o mais adequado, ou porque a concentração de sacarose no meio é baixa ou ainda porque o hidrato de carbono utilizado não é o mais correcto (Rumary e Thorpe, 1984).

Fases de enraizamento e aclimatização

A fase de enraizamento registada foi simultânea com a multiplicação do material vegetal.

No que diz respeito à formação de raízes (Fig. 6), registaram-se diferenças significativas entre as modalidades onde se utilizou BAP ou Ki. As modalidades onde houve maior percentagem de enraizamento foram no controlo e em 0.46 μM Ki (57,5%), não diferindo significativamente da modalidade 0.23 μM Ki (52,5%). Para as concentrações de 0.22, 0.44 e 0.88 μM de BAP a percentagem de enraizamento foi de 10%, não diferindo significativamente da utilização da modalidade 2.22 μM Ki (22,5%). Com a modalidade 2.22 μM BAP a percentagem de enraizamento foi nula.

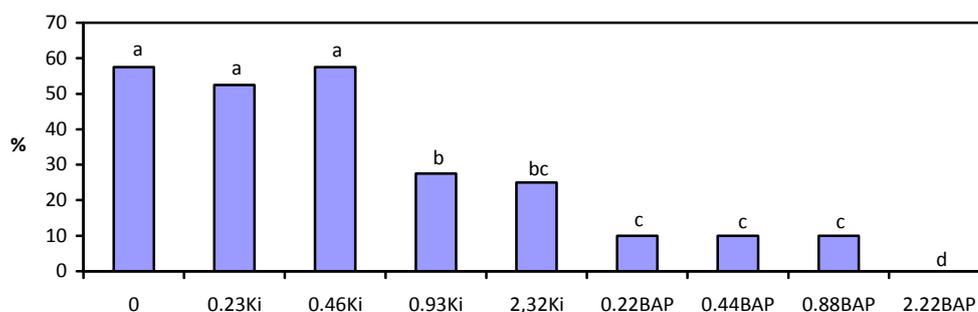


Fig. 2. Percentagens de enraizamento registadas durante a fase de multiplicação em cada uma das modalidades testadas. (Percentagens na coluna com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo cálculo do p -Value a 95% do intervalo de confiança (CI)).

Esta formação de raízes durante a fase de multiplicação, onde se aplicam citocininas, não é vulgar, sendo bem conhecido o seu efeito inibidor no processo de rizogénese, sendo as auxinas as hormonas promotoras da indução rizogénica (Pierik, 1987). Aliás verificou-se que a presença de BAP inviabilizou quase por completo a formação de raízes, sendo o valor mais elevado obtido na ausência de qualquer hormona (controlo) e nas concentrações mais baixas de Ki. Nos trabalhos de Echeverrigaray *et al.* (2005), na espécie *L. dentata*, estes autores referem uma percentagem de enraizamento de 100% quando os rebentos foram colocados em meio de MS durante 15 dias sem suplemento hormonal, tal como referem Jordan *et al.* (1998) para *L. dentata* e outras espécies. Dias *et al.* (2002), para a *L. viridis*, referem percentagens de enraizamento entre 26.7% e 86.8% tendo o melhor valor sido obtido com 10.74 μM de ANA.

Quanto ao número de raízes por rebento enraizado (Tab. 2), o maior número de raízes foi obtido na modalidade 0.23 μM Ki, com 3.6 raízes por explante enraizado, não diferindo significativamente das restantes modalidades, com exceção da modalidade 0.22 μM BAP.

Tabela 2. Efeito de diferentes concentrações de BAP e de Ki no número de raízes de rebentos de *L. luisieri*, após 4 semanas de cultura.

Tratamentos		
RCV	μM	N Raízes
BAP	0.22	1.3 b
	0.44	2.0 ab
	0.89	1.8 ab
	2.22	--
Ki	0.23	3.6 a
	0.46	3.1 ab
	0.98	2.2 ab
	2.46	1.8 ab
Controlo	0	3.3 a

(Médias na coluna seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$)).

Quando aplicado tratamento hormonal específico para enraizamento, segundo Echeverrigaray *et al.* (2005), na espécie *L. dentata* o maior número de raízes (25.4) foi obtido na modalidade 2.5 μM ANA.

Quanto à fase de aclimatização, o material vegetal apresentou 100% de sobrevivência (Fig. 7), um elevado crescimento, sendo notável o alongamento dos rebentos, o que será devido ao bom estado fisiológico do material regenerado *in vitro*, à funcionalidade do sistema radicular, ao tipo de substrato utilizado e às condições ambientais, em particular da temperatura e humidade. Contudo, devemos ter algumas reservas neste valor uma vez que o mesmo resultou apenas de um tratamento com 56 plantas sem qualquer repetição. Estes resultados são ligeiramente superiores aos referidos por Echeverrigaray *et al.* (2005), em *L. dentata*, com 87% de sobrevivência e aos 80% de sobrevivência referidos por Dias *et al.* (2002).



Fig. 3. Efeito da concentração de BAP na multiplicação de *L. luisieri*. (A) Aspecto dos rebentos na concentração de 0,2 mg l^{-1} . (B) Aspecto dos rebentos na concentração de 0,5 mg l^{-1} .



Fig. 4. Rebentos de *L. luisieri* na fase de multiplicação sem suplemento hormonal (controle).



Fig. 5. Rebentos de *L. luisieri* na fase de multiplicação da população stock evidenciando fortes sintomas de vitrificação.



Fig. 6. Rebentos de *L. luisieri* enraizados durante a fase de multiplicação. A barra representa 1 cm.



Fig. 7. Rebentos de *L. luisieri* no final da fase de aclimatização. A barra representa 7 cm.

Referências

- Andrade, L. B., S. Echeverrigaray, F. Fracaro, G. F. Pauletti, e L. Rota. 1999. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56:79-83.
- Calvo, M. C., e J. Segura. 1989. *In vitro* propagation of lavender. *HortScience* 24:375-376.
- Delgado, F., R. Oliveira, A. González-Coloma, N. Mohamed, A. C. Soria, J. Sanz, J. Burillo, J. Rodilha, L. Silva, e M. Reina. 2007. Adaptação ao Cultivo e Valorização de *Lavandula luisieri*. II Colóquio Nacional de Plantas Aromáticas e Medicinais, Gerês, Portugal.
- Dias, M. C., R. Almeida, e A. Romano. 2002. Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L'Hér through *in vitro* axillary shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68:99-102.
- Dronne, S., M. Colson, M. Moja, e O. Faure. 1999. Plant regeneration and transient GUS expression in a range of lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur) cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55:193-198.
- Echeverrigaray, S., R. Basso, e L. B. Andrade. 2005. Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grow adult plants. *Biologia Plantarum* 49:439-442.
- Franco, J. A. 1984. Nova Flora De Portugal (Continente e Açores). Vol II. Clethraceae-Compositae. Sociedade Astória Lda., Lisboa.
- Jordan, A. M., Calvo, M. C., Segura, J. 1998. Micropropagation of adult *Lavandula dentata* plants. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 73: 93-96.
- Lall, S., Z. Mandegaran, e A. V. Roberts. 2006. Shoot multiplication and adventitious regeneration in *Sorbus aucuparia*. *Plant Cell and Tissue Organ Culture* 85:23-29.
- Murashige, T, e F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nobre, J. 1996. *In vitro* cloning and micropropagation of *Lavandula stoechas* from field-grown plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46:151-155.
- Panizza, M., e F. Tognoni. 1992. Micropropagation of lavandin (*Lavandula officinalis* Chix x *Lavandula latifolia* Villars cv. Grosso). Pp. 295-305 in: Bajaj, Y. P. S. (ed.): *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 19. High-Tech and Micropropagation III. Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Regato, M., M. J. Mesquita, e J. Regato. 1996. Contribuição para o reconhecimento das plantas aromáticas e medicinais do concelho de Beja. Pp. 277-280. In: *Actas do 1º Colóquio Nacional de Plantas Aromáticas e Medicinais*. Vilamoura, Portugal.
- Rodrigues, A. S., e D. Almeida. 1996. Tratamento osmótico de sementes de *Origanum majorana* e *Hipericum androsaemum*. Pp. 145-148. In: *Actas do 1º Colóquio Nacional de Plantas Aromáticas e Medicinais*. Vilamoura, Portugal.
- Rumary, C. e Thorpe, 1984. Plant formation in black and white spruce I. *in vitro* techniques. *Can J. For. Res.* 14:31-40
- Ziv, M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. Pp. 45-69 in: Debergh, P. C., e R. H. Zimmerman (eds) *Micropropagation: Technology and Applications*. Kluwer Academic Publish, Dordrecht.