

## Micropropagação de lavanda cultivar Lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex *Loiseleur*).

Dal Vesco, Lírio Luiz<sup>1</sup>; Jacomel Júnior, Nelson<sup>2</sup>; Caprestano, Clarissa Alves<sup>3</sup>; Holderbaum, Daniel Ferreira<sup>3</sup>; Guerra, Miguel Pedro<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais-RGV, Depto. de Fitotecnia/CCA/UFSC – Florianópolis, SC, CEP 88034-001, Fone (48) 3721-5336, email: [lirio@cca.ufsc.br](mailto:lirio@cca.ufsc.br); <sup>2</sup> Eng. Agr. MSc., Associação de Agricultura Biodinâmica do Sul. – Florianópolis, SC, CEP 88.034-002, Fone: (48) 3334-3712, email: [terranoaestrela@gmail.com](mailto:terranoaestrela@gmail.com); <sup>3</sup> Acadêmico de Agronomia, Bolsista IC/CNPq, CCA/UFSC, email: [clarissacapre@hotmail.com](mailto:clarissacapre@hotmail.com); e email: [niko@grad.ufsc.br](mailto:niko@grad.ufsc.br); <sup>4</sup> Prof. Dr. RVG/Depto. de Fitotecnia/CCA/UFSC – Florianópolis, SC, CEP 88034-001, Fone (48) 3721-5331, email: [mpguerra@cca.ufsc.br](mailto:mpguerra@cca.ufsc.br).

### INTRODUÇÃO

As espécies de lavandas pertencem à família Lamiaceae (Labiatae) e o gênero *Lavandula* contém mais de 30 espécies e, tem seu habitat natural na Europa, na África e na Ásia. Entre as cultivares de maior importância mundial é a Lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex *Loiseleur*), híbrido estéril entre *L. angustifolia* Mill. e *L. latifolia* Medic, que está sendo amplamente cultivada na região do Mediterrâneo para a produção e óleo essencial (Dronne et al., 1999). A floração da Lavandin é vigorosa e seu óleo essencial diferencia-se daquele da *L. angustifolia* tendo notas menos doces. A produção do óleo essencial das lavandas é obtida a partir de flores e das hastes florais que, de acordo com a origem, apresenta características distintas. O óleo essencial tem alto valor, sendo empregado na indústria farmacêutica e de cosméticos e demonstra propriedades antimicrobianas e antifúngicas (Vokou et al., 2002; Cott, 2005).

No Brasil, o mercado de lavanda é ainda incipiente e baseia-se em consumidores domésticos de mudas e flores frescas e é encontrado em feiras livres e nas floriculturas. Seu emprego tem sido associado ao uso como medicamento fitoterápico, condimentos e aromaterapia.

A propagação convencional das lavandas é feita a partir de estacas herbáceas, porém, apresenta baixa eficiência e quando produzem sementes estas apresentam dormência. Uma alternativa frente estas limitações é a utilização de técnicas de cultura de tecidos vegetais o que permite a propagação clonal massal de genótipos elites por meio da captura e fixação do ganho genético.

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e aperfeiçoar o protocolo para a micropropagação da lavanda cultivar Lavandin em meios de cultura constituídos por diferentes formulações salinas e concentrações de BAP.

### MATERIAL E MÉTODOS

Gemas axilares excisadas de plantas matrizes, mantidas em Fitotron foram submetidas a um processo de desinfestação com álcool (70%), hipoclorito de sódio (40%) e três enxágües em água autoclavada. Para a indução de brotos, os segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 cm), contendo 15 ml do meio de cultura MS líquido, sobre ponte de papel, suplementado com BAP (0,5 µM), vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951) e com o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Após a indução os brotos foram repicados para o mesmo meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) + BAP (0,5 µM) e geleificado.

**ENSAIO 1.** Para a indução a proliferação de brotos foram testadas quatro concentrações de BAP (0; 0,5; 0,75 e 1,0 µM) suplementados ao meio de cultura MS geleificado com agar-agar (7g L<sup>-1</sup>). Foram utilizados brotos com um segmento de nó e duas gemas axilares, provenientes do terceiro subcultivo no meio de cultura de indução. Utilizou-se um delineamento completamente casualizado - DCC e, cada unidade experimental foi

constituída de cinco tubos de ensaios com dois segmentos de nó por tubo, repetidos quatro vezes. Após quatro semanas em cultivo foi avaliado o número de brotos por explante.

**ENSAIO 2.** Brotos da cultivar Lavandin, originados do ensaio 1, foram empregados como explantes para testar o efeito de diferentes formulações salinas na taxa regenerativa. O delineamento do experimento foi um fatorial com oito tratamentos: quatro diferentes formulações salinas MS; LPm (Von Arnold & Eriksson, 1981); QL (Quoirin et al., 1977), e DSD1 (Silva & Doazan, 1995) combinado com dois níveis de BAP (0 e 1  $\mu\text{M}$ ). Cada unidade experimental foi constituída de cinco tubos de ensaios com dois segmentos de nó, contendo quatro gemas, por tubo em forma de BCC repetidas quatro vezes. Após quatro semanas de cultivo foi avaliado o número de nós e de brotos por explante.

Brotos com altura superior a 3 cm foram transferidos para fitotron com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, intensidade luminosa de  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  com lâmpadas de vapor de sódio de modelo tubular de 400w, 15 dias antes da aclimatização. Após o isolamento dos brotos-microestacas foram acondicionados em bandejas de isopor de 128 células com substratos numa mistura na proporção de 1:2:1 (v/v/v) de: Plantmax HT®; Casca de arroz carbonizada e areia média, e mantidos em ambiente de fitotron por mais 15 dias. Em seguida foram transferidas para túnel com irrigação intermitente. Após 60 dias as mudas foram acondicionadas em recipientes plásticos, com a mesma mistura de substrato, e mantidas nas condições de campo.

Os dados coletados de cada parâmetro foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste Student-Newman-Keuls (SNK-5%) de separação de médias, quando necessário os dados originais foram transformados em  $\log(x+1)$  ou  $(x+0,5)^{0,5}$ , segundo as recomendações de Steel & Torrie (1980) e Compton (1994).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A excisão de brotações jovens de plantas matrizes mantidas em fitotron permitiu com sucesso a desinfestação dos explantes. A indução a proliferação de brotos de lavanda *in vitro* ocorreu em duas semanas após o isolamento das gemas (Figura 1a).

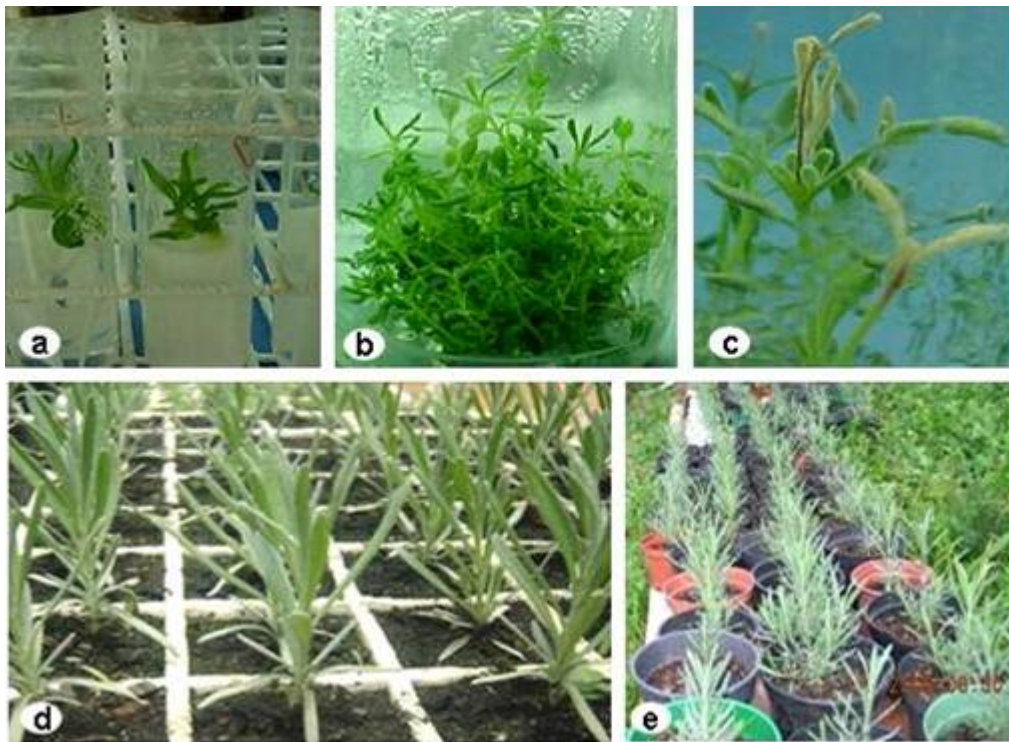
No primeiro ensaio o BAP (1,0  $\mu\text{M}$ ) suplementado ao meio MS resultou em valores significativamente superiores ( $p=0,05$ ) para o número médio de brotos por explantes (6,5 brotos) da cultivar Lavandin, após 30 dias de cultivo (Figura 2). Alta taxa de proliferação de brotos de *Lavandula viridis* também foi obtida com o cultivo em meio MS suplementado com 0,67  $\mu\text{M}$  de BA, após quatro semanas em cultivo (Dias et al., 2002).

A evolução do número de brotos em resposta aos níveis de BAP testados (Figura 2) seguiu um modelo quadrático da análise de regressão. A confiabilidade destas trajetórias foi expressa pelos altos valores do coeficiente de determinação ( $r^2= 0,99$ ) e T-valor significativo ( $p<0,05$ ). Em sistemas biológicos, consideram-se altos aqueles valores de  $r^2$  que ocorrem entre 0,5 e 0,9 (Compton, 1994).

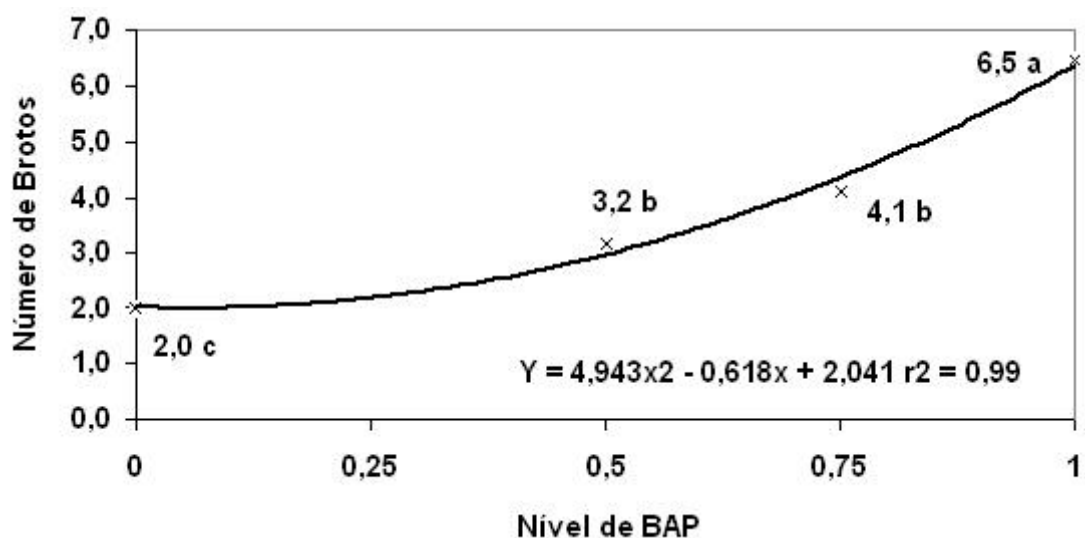
O aumento do nível de BAP também induziu um maior número de brotos hiperhídricos enquanto que a ausência de BAP no meio de cultura resultou em maior alongamento de brotos, procedimento este que pode ser indicado para o cultivo de brotos que serão destinados para a aclimatização. O cultivo de *L. vera* em meio de cultura MS suplementado com altos teores dos fitorreguladores TDZ (4,5  $\mu\text{M}$ ) e BAP (4,4 a 8,8  $\mu\text{M}$ ) também resultou na formação de brotos hiperhídricos (Andrade et al., 1999). Em estudos semelhantes com a espécie *Lavanda angustifolia* também se verificou a presença de brotos hiperhídricos em meio de cultura suplementado com BAP (Caprestano et al., 2005).

No segundo ensaio o BAP (1  $\mu\text{M}$ ) também resultou em valores significativamente superiores ( $p<0,01$ ) para o número médio de brotos e de nós por explante comparativamente aos meios isentos deste fitorregulador. A suplementação de BAP (1  $\mu\text{M}$ ) à formulação salina QL resultou no mais alto número médio de nós (4,7 nós) e brotos por explante (2,3 brotos). No entanto, estes valores não se diferenciaram para o teste SNK (5%) em relação aos resultados obtidos com o meio MS + 1  $\mu\text{M}$  de BAP (4,6 nós e 2,4 brotos) após 30 dias de cultivo (Figura 3). Contudo, brotos regenerados em meio contendo a

formulação salina QL mostraram-se mais vigorosos e com menor incidência de hiperhidricidade (Figura 1b) e com necrose das folhas e dos ápices caulinares (Figura 1c).

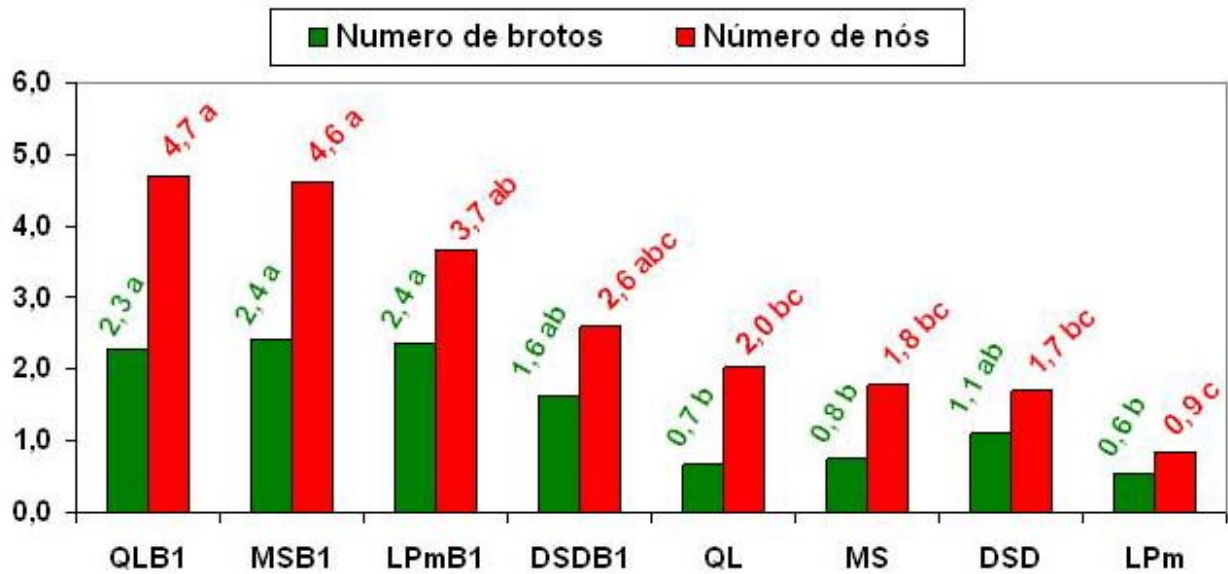


**Figura 1.** Micropropagação de lavanda cultivar Lavandin. **a)** Isolamento e Indução de gemas; **b)** Proliferação de brotos em meio de cultura básico QL + BAP (1 µM); **c)** Necrose do ápice em meio de cultura MS + BAP (1 µM); **d)** Mudas aclimatizadas após 45 dias em condições *ex vitro* e; **e)** Transferência para vasos após 90 dias.



**Figura 2.** Número médio de brotos/explante de Lavandin em resposta ao BAP (0, 0,5, 0,75 e 1 µM) suplementado ao meio de cultura MS, após quatro semanas de cultivo. \*Média de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas,

indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). CV(%) = 10,6. Dados transformados em log (x+1).



**Figura 3.** Número médio de brotos e nós por explante de Lavandin em resposta a diferentes formulações salinas, (MS-Murashige & Skoog, 62; LPm - email: Von Arnold & Eriksson, 1981; QL-Quoirin et al., 1977, e DSD1-Silva & Doazan, 1995), isenta ou suplementada com 1  $\mu$ M de BAP (B1) após quatro semanas em cultivo. \*Média de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas dentro de cada parâmetro, indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). CV(%) = 17,4; dados transformados em  $(x + 0,5)^{0,5}$ .

Estes fatores foram identificados no primeiro ensaio e durante as repicagens que antecederam para obtenção da fonte de explante para os experimentos. Estes eventos provavelmente influenciaram na redução da taxa média de multiplicação no ensaio 2, em relação ao ensaio 1. Por outro lado, a ausência de BAP no meio de cultura em todas as formulações salinas testadas, resultou em brotos mais alongados, ausência de brotos hiperhídricos e de coloração verde menos intenso.

Broto mais vigorosos com ou sem raízes e não hiperhídricos foram aclimatizados com sucesso em substratos e quando mantidos em ambiente controlado resultaram em mais de 80% de sobrevivência das mudas que mostraram um bom desenvolvimento após 45 dias (Figura 1d). Mudas transplantadas para recipientes plásticos com substratos baseados numa mistura na proporção de 1:2:1 (v/v/v) de: Plantmax HT ®; Casca de arroz carbonizada e areia média, tiveram excelente desenvolvimento em vaso a campo, após 90 em condições *ex vitro* (Figura 1e).

## CONCLUSÃO

A micropropagação da cultivar Lavandin é favorecida com a suplementação de 1,0  $\mu$ M de BAP ao meio de cultura básico MS. Quando se emprega a formulação salina QL suplementada com 1,0  $\mu$ M de BAP observa-se um melhor desenvolvimento dos brotos, com menor frequência de brotos vitrificados e com necrose foliar e apical. Brotos com altura superior a 3,0 cm com ou sem raiz quando transferidos para substratos, acondicionados em bandejas de isopor são aclimatizados com sucesso.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, LB; ECHEVERRIGARAY, S; FRACARO, F.; PAULETTI, GF.; ROTA L. 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.

CAPRESTANO, C. A.; STEINMACHER, D. A.; DAL VESCO, L. L.; JACOMEL JUNIOR, N.; GUERRA, M. P. Micropropagação de *Lavandula angustifolia* In: 3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2005, Gramado - RS. **Anais ...** Passo Fundo - RS: Embrapa Trigo, 2005.

COMPTON M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.37, p.217-242, 1994.

COTT, J. Lavander: The Genus *Lavandula*. **Phytomedicine**, v.12, p.160, 2005.

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

DRONNE, S.; JULLIEN, F.; CAISSARD, J.-C.; FAURE, O. A simple and efficient method for *in vitro* shoot regeneration from leaves of lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur). **Plant Cell Reports**, v.18, p. 429–433, 1999.

MOREL, G.M.; WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons **American Journal of Botany**, v. 38, p.138-140, 1951.

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

QUOIRIN M.; LEPOIVRE R.; BOXUS P., Un premier bilan de dix années de recherche sur la culture de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. C.R. **Recherches Agronomiques**, p. 93-117, 1977.

SILVA, A. L. ; DOAZAN, J. P. . Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des porte-greffes de vigne *in vitro*. **Journal International Des Sciences de La Vigne Et Du Vin, Bordeaux** (França), v. 29, n. 1, p. 01-09, 1995.

STEEL., R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics** – A biometrical approach. 2. Ed. New York: McGraw-Hill Book Co. 1980, 633p.

VOKOU, D.; CHALKOS, D.; KARAMANLIDOU, G.; YIANGOU M. Activation of soil respiration and shift of the microbial population balance in soil as a response to *Lavandula stoechas* essential oil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 4, p.755-768, 2002.

VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canada Journal Botany**, v.59, p. 870-874, 1981.

Palavras Chave: Micropropagação, *Lavandula x intermedia*, Lavandin, Lavanda.