



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO INICIAL *IN VITRO* DE *Lavandula angustifolia*

RAYSSA CAMARGO DE OLIVEIRA

2016

RAYSSA CAMARGO DE OLIVEIRA

GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO INICIAL *IN VITRO* DE *Lavandula angustifolia*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Jose Magno Queiroz Luz

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

O48g Oliveira, Rayssa Camargo de, 1990
2016 Germinação e estabelecimento inicial *in vitro* de *Lavandula angustifolia* / Rayssa Camargo de Oliveira. - 2016.
47 f. : il.

Orientador: Jose Magno Queiroz Luz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia.
Inclui bibliografia.

1. Agronomia - Teses. 2. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura - Teses. 3. Cultivo *in vitro* - Teses. 4. Reguladores de crescimento de plantas - Teses. I. Luz, Jose Magno Queiroz, 1967- . II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU: 631

RAYSSA CAMARGO DE OLIVEIRA

GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO INICIAL *IN VITRO* DE *Lavandula angustifolia*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 11/02/2016

Prof. Dr. Ernesto Jose Resende Rodrigues

IFTM

Dra. Simone Abreu Asmar

UFU

Prof Dra. Alcione da Silva Arruda

UEG

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz
ICIAG-UFU
(Orientador)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

Aos meus pais, Wilmar e Genilza, base da minha formação e que sempre me incentivaram nessa jornada. À minha irmã Michele, pelo carinho e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À Deus que é sempre minha fonte de força e referência.

À minha família que sempre me motivou nos estudos e ofereceu toda a base necessária.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Ciências Agrárias pela oportunidade de prosseguir meus estudos.

A Capes pela concessão da bolsa e incentivo a pesquisa nacional.

A FAPEMIG pelo suporte financeiro na condução do trabalho.

Ao professor José Magno Queiroz Luz que aceitou prontamente o meu pedido de orientação.

A Simone Abreu Asmar que co-orientou atenciosamente e com paciência instruiu na condução do trabalho agregando com certeza conhecimentos para a minha vida pessoal e profissional.

Ao corpo docente e demais funcionários do ICIAG que foram primordiais para a minha formação acadêmica.

Aos colegas de laboratório Herick, Sabrina e Daniela pelo companheirismo e bons momentos de trabalho em grupo.

Aos colegas da pós-graduação pela interação, trocas de conhecimentos e a boa disposição em ajudar.

A todos que de alguma forma ajudaram ou me deram a oportunidade de aprender mais.

Meu sincero obrigado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1 Lavanda	2
2.2 Metabolismo secundário e óleos essenciais.....	3
2.3 Cultura de tecidos vegetais e micropropagação	5
2.4 Meios de cultura e luz.....	6
2.5 Germinação <i>in vitro</i> e reguladores vegetais	10
2.6 Variáveis de germinação	13
3. OBJETIVO.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
6. CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos majoritários e densidade do óleo essencial (o.e.) de <i>Lavandula angustifolia</i> (SILVA, S. 2015 adaptado).....	4
Tabela 2. Comparação da composição dos meios de cultura LS e MS.....	6
Tabela 3. Tratamentos utilizados para o estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Lavandula angustifolia</i> Uberlândia – MG, 2015.....	15
Tabela 4. Tratamentos utilizados para estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Lavandula angustifolia</i> Uberlândia – MG, 2015.....	16
Tabela 5. Tratamentos utilizados para estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Lavandula angustifolia</i> Uberlândia – MG, 2015.....	17
Tabela 6. Resumo da análise de variância das características taxa de germinação (GER), comprimento da plântula (COM), número de folhas (FOL) e massa fresca (MAS) das plântulas desenvolvidas de <i>Lavandula angustifolia in vitro</i> em diferentes doses de GA ₃ com ou sem o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio H ₂ O ₂ . Uberlândia-MG, 2015.....	18
Tabela 7. Percentual de germinação de sementes de <i>Lavandula angustifolia in vitro</i> submetidas ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e doses de giberelina – Uberlândia-MG, 2015.....	19
Tabela 8. Médias do comprimento (cm), número de folhas e massa fresca (g) de plântulas de <i>Lavandula angustifolia in vitro</i> em função do pré-tratamento das sementes – Uberlândia-MG, 2015.....	20
Tabela 9a. Resumo da análise de variância das características número de folhas (FOL), comprimento da parte aérea (AER) e radicular das plântulas (RAD), massa fresca (MAS) das plântulas desenvolvidas, taxa de germinação (GER) e velocidade de emergência (VE) das plântulas desenvolvidas de <i>Lavandula angustifolia in vitro</i> em condição luminosa convencional, diferentes meios de cultura (MS e LS) e concentrações de meio (50 e 100%). Uberlândia-MG, 2015.	22
Tabela 9b. Resumo da análise de variância das características número de folhas (FOL), comprimento da parte aérea (AER) e radicular das plântulas (RAD), massa fresca (MAS) das plântulas desenvolvidas, taxa de germinação (GER) e velocidade de emergência (VE) das plântulas desenvolvidas de <i>Lavandula angustifolia in vitro</i> em condição luminosa growlux, diferentes meios de cultura (MS e LS) e concentrações de meio (50 e 100%). Uberlândia-MG, 2015.....	22
Tabela 10. Comprimento da parte aérea (cm) de <i>Lavandula angustifolia in vitro</i> sob diferentes condições luminosas, meios de cultura e concentrações de meio. Uberlândia-MG, 2015.....	23

Tabela 11. Comprimento da parte radicular (cm) de <i>Lavandula angustifolia in vitro</i> sob diferentes condições luminosas, meios de cultura e concentrações de meio. Uberlândia-MG, 2015.....	23
Tabela 12. Número de folhas de <i>Lavandula angustifolia in vitro</i> sob diferentes condições luminosas, meios de cultura e concentrações de meio. Uberlândia-MG, 2015	24
Tabela 13. Massa (g) de <i>Lavandula angustifolia in vitro</i> sob diferentes condições luminosas, meios de cultura e concentrações de meio. Uberlândia-MG, 2015.....	24
Tabela 14. Porcentagem germinação de <i>Lavandula angustifolia in vitro</i> sob diferentes condições luminosas, meios de cultura e concentrações de meio. Uberlândia-MG, 2015.	25
Tabela 15. Velocidade de emergência de <i>Lavandula angustifolia in vitro</i> sob diferentes condições luminosas, meios de cultura e concentrações de meio. Uberlândia-MG, 2015	26
Tabela 16. Resumo da análise de variância das características número de folhas (FOL), comprimento (cm) da parte aérea (AER) e radicular das plântulas (RAD), massa fresca (MAS) das plântulas desenvolvidas (g), porcentagem de plântulas anormais (ANO), taxa de germinação (GER) das plântulas de <i>Lavandula angustifolia in vitro</i> na presença de diferentes reguladores vegetais em duas concentrações. Uberlândia-MG, 2015.	27
Tabela 17. Número de folhas de plântulas <i>Lavandula angustifolia in vitro</i> na presença de diferentes reguladores vegetais em duas concentrações Uberlândia-MG,2015.	28
Tabela 18. Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de <i>Lavandula angustifolia in vitro</i> na presença de diferentes reguladores vegetais em duas concentrações. Uberlândia-MG, 2015.....	28
Tabela 19. Comprimento da parte radicular (cm) de plântulas de <i>Lavandula angustifolia in vitro</i> na presença de diferentes reguladores vegetais em duas concentrações. Uberlândia-MG, 2015.....	29
Tabela 20. Massa fresca (g) de plântulas de <i>Lavandula angustifolia in vitro</i> na presença de diferentes reguladores vegetais em duas concentrações. Uberlândia-MG, 2015.	29
Tabela 21. Incidência de plântulas anormais em <i>Lavandula angustifolia in vitro</i> na presença de diferentes reguladores vegetais em duas concentrações. Uberlândia-MG, 2015.	30
Tabela 22. Porcentagem (%) de germinação de sementes de <i>Lavandula angustifolia in vitro</i> na presença de diferentes reguladores vegetais em duas concentrações. Uberlândia-MG, 2015.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de produção e armazenamento do óleo essencial	4
Figura 2. Taxa fotossintética das plantas segundo o comprimento de onda de luz	9
Figura 3. Estrutura química das poliaminas putrescina, espermidina e espermina respectivamente.	12
Figura 4. Percentual de germinação <i>in vitro</i> de sementes não-tratadas de <i>Lavandula angustifolia</i> em função de doses de GA ₃ – Uberlândia-MG, 2015.	19
Figura 5. Número médio de folhas de plântulas <i>in vitro</i> de <i>Lavandula angustifolia</i> em função de doses de GA ₃ – Uberlândia-MG, 2015.	21

RESUMO

RAYSSA CAMARGO DE OLIVEIRA. **Germinação e estabelecimento inicial *in vitro* de *Lavandula angustifolia*** 2016. 47 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.¹

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado sob condições assépticas, em meio nutritivo artificial. Este processo baseia-se no princípio da totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula de organismo vegetal apresenta todas as informações genéticas necessárias à regeneração de uma planta completa. Algumas espécies vegetais entretanto apresentam dificuldade de germinação, como é o caso da *Lavandula angustifolia*, além de uma desuniformidade no desenvolvimento das mudas e das plantas à campo, devido à variabilidade natural resultante da propagação sexuada. Neste contexto, o cultivo *in vitro* pode resolver ou minimizar pontos críticos comuns no estabelecimento de plantas com propriedades medicinais e ou produtoras de óleos essenciais pelo processo de micropropagação. Dessa forma, foram realizados três experimentos no intuito de estudar o estabelecimento *in vitro* e desenvolvimento inicial dessa espécie. No primeiro experimento avaliou-se a eficiência da utilização de peróxido de hidrogênio no pré-tratamento de sementes inoculadas em meio de cultura com diferentes concentrações de ácido giberélico em cultivo *in vitro*: 0,0; 1,0; 2,0 e 3,5 mg L⁻¹. No segundo, avaliou-se a influência do uso das lâmpadas growlux e convencional em meios MS e LS nas concentrações de 50 e 100% dos sais. E por fim, avaliou-se o efeito da classe de reguladores de crescimento poliaminas que compreendem a putrescina, espermina e espermidina em diferentes concentrações. Em todos os experimentos foram avaliadas características biométricas como número de folhas, comprimentos de parte aérea e radicular, massa fresca, porcentagem de plântulas anormais, e os parâmetros da germinação da espécie como porcentagem de germinação e velocidade de emergência. Melhores resultados foram encontrados quando se aplicou pré- tratamento com peróxido de hidrogênio nas sementes com a posterior inoculação em meio contendo 2,5 mg L⁻¹ de ácido giberélico. O uso de lâmpadas growlux não apresentou diferença frente as lâmpadas convencionais nas características avaliadas, porém foi identificado que a espécie desenvolve melhor em meio LS. Quanto ao uso das poliaminas verificou-se em geral um favorecimento da germinação, parte aérea e número de folhas das plântulas de lavanda na concentração de 0,5 mg L⁻¹ exceto quando se aplicou espermina que gerou menor número de folhas nessa condição.

Palavras chave: cultura de tecidos, reguladores de crescimento, meio de cultura, lâmpadas

¹Orientador: José Magno Queiroz Luz- UFU.

ABSTRACT

OLIVEIRA, RAYSSA CAMARGO. **Germination and initial in vitro establishment of *Lavandula angustifolia*** 2016. 47 p. Dissertation (Master's Program Agronomy/crop Science) Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG¹

The plant tissue culture techniques includes a set in which each explant (cell, tissue or organ) is isolated under aseptic conditions on artificial nutrient medium. This process is based on the principle of totipotentiality cells, or any plant organism cell has all the genetic information necessary for the regeneration of a whole plant. Nevertheless, some plant species have difficulty germination is the case of *Lavandula angustifolia*, and an unevenness in the development of seedlings and plants in the field, due to natural variability resulting from sexual propagation. In this context, the *in vitro* culture can solve or minimize hot spots in seedling establishment with medicinal properties and production of essential oils or by micropropagation. Thus, three experiments were carried out in order to study the germination and early development of this species. In the first experiment evaluated the efficiency of use of hydrogen peroxide in the pretreatment of seed treated with different concentrations of gibberellic acid *in vitro* culture: 0.0; 1.0; 2.0 and 3.5 mg L⁻¹. Then, we assessed the influence of using conventional lamps and growlux MS and LS media at concentrations of 50 and 100% of the salts. Finally, an assay which evaluated the effect of the new class of regulators comprising polyamines putrescine, spermine and spermidine concentrations in different under conventional lamps. In all experiments biometric characteristics such as number of leaves were evaluated, shoot length and root fresh weight, percentage of abnormal seedlings, survival rate and the kind of germination parameters such as germination, emergence rate, start time, end and average germination, sync, uncertainty. Best results were found when retracted the seeds with hydrogen peroxide and inoculated in medium containing 2.5 mg L⁻¹ of gibberellic acid. The use of growlux lamps did not differ across conventional light bulbs in the evaluated characteristics, but it was identified that the species grows best in LS means . As for the polyamines found a generally favoring the germination, shoot and leaf number of lavender seedlings at 0.5 mg L⁻¹ spermine. except when applied spermine generating fewer sheet in this condition.

Keywords: tissue culture, growth regulator, culture medium, light.

¹Major: José Magno Queiroz Luz – UFU.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Do ponto de vista biológico, os organismos vivos reproduzem-se de forma sexual ou assexuadamente. No primeiro caso, a variabilidade genética e a evolução são favorecidas; enquanto que no segundo isso não acontece. Nas plantas superiores, como é o caso da lavanda (*Lavandula* spp), a reprodução assexuada pode ocorrer por meio de vários métodos de propagação, tais como: o enraizamento de estacas, a apomixia e a micropropagação (CID, 2010).

Do ponto de vista comercial, é interessante que cultivares de importância agronômica sejam propagadas assexuadamente, pois esse tipo de propagação resulta em plantas uniformes quanto ao seu fenótipo. Isso é interessante no caso de plantas aromáticas cujo objetivo é a extração de óleo essencial rico em determinada substância de interesse (BOREM, 2005).

Por via sexual, ou seja, semente, a conservação dessas características desejadas pode ser obtida por endogamia, ou seja, pelo cruzamento entre indivíduos relacionados pela sua descendência ou com eles mesmos. Porém, nem todas as plantas de importância agronômica podem cruzar-se por autofecundação, e mesmo que isso fosse possível, deve-se considerar o problema da depressão endogâmica, que resulta na perda de vigor, além de carregar heranças indesejáveis ao retrocruzar (CID, 2010).

A outra técnica existente é a estaquia que apesar de ser uma importante técnica de propagação assexuada, é de difícil produção em larga escala e a capacidade de indução de raízes adventícias diminui com a idade da planta doadora de estacas (BIASI E BONA, 2010). A apomixia não deixa de ser um modelo interessante do ponto de vista clonal, Nigel (2014) testou a geração e caracterização de poliploidia induzida por colchicina em *L. intermedia* na tentativa de corrigir a qualidade do óleo essencial.

Assim, a cultura de tecidos pode contribuir para programas de melhoramento genético com a obtenção massal de clones e constitui-se como um importante método por viabilizar a formação de grandes populações de alto genótipo e, portanto de óleos essenciais de alta qualidade.

O controle quase absoluto do crescimento e da morfogênese a partir de explantes *in vitro* é uma das principais características da cultura de tecidos vegetais, sendo que esses fenômenos ocorrem mantendo-se os explantes em um meio de cultura (PASQUAL et al., 1998). Dessa forma, surge a importância de se estudar e conhecer

detalhadamente quais são os componentes e propriedades dos meios de cultura e ambiente para cada espécie em específico que levou a esse estudo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Lavanda

A espécie *Lavandula angustifolia* Miller. conhecida popularmente como lavanda (Lamiaceae) apresenta fitofisionomia de um subarbusto com base lenhosa, de 30 a 70 cm de altura, folhas de formato estreito-lanceoladas, disposição opostas rígidas e pubescentes e a inflorescência terminal, composta de flores pequenas azuis e dispostas em racemos terminais (PARKASH e SINGH, 2013). Multiplica-se tanto por sementes como por estacas, desenvolvendo-se bem no Brasil apenas algumas variedades e que se concentram nas regiões de altitude da região Sul.

Originária da região do mar Mediterrâneo, ilhas do oceano Atlântico, Turquia, Paquistão e Índia, essa gênero pode ser encontrado também como nativa no nordeste e sudeste do continente africano, Micronésia, Península Arábica, Bulgária e na Rússia (PARKASH e SINGH, 2013). É cultivada em extensão principalmente na França, Itália e Espanha e também na Bulgária, Rússia, Inglaterra, Estados Unidos e Austrália (VERMA et al., 2010).

Na Europa é cultivada em larga escala, especialmente no Sul da França, para extração de seu óleo essencial para perfumaria. Nessa região de Provançe existe mais de 5000 hectares de produção e outras espécies aromáticas, envolvendo em torno de 1000 produtores rurais. De toda a produção, estima-se que 87% seja do híbrido lavandin e 13% de outras lavandas (DIRECTION DEPARTEMENTALES DES TERRITOIRES DE LA DROME – DDTD, 2010).

É uma importante espécie medicinal e aromática, utilizada principalmente na extração de óleo essencial, mas também tem sido utilizada como planta ornamental e melífera (MACHADO et al., 2013). Seu óleo essencial, obtido da destilação das flores, caules e folhas, é importante para as indústrias cosmética, farmacêutica e de perfumaria (CHEMAT et al., 2006).

No Brasil é ocasionalmente cultivada no Sul como planta ornamental e para fins medicinais. Segundo Silva (2015) o Brasil não está totalmente inserido na cadeia produtiva de plantas aromáticas e de produtos como os óleos essenciais, o que torna

emergente verificar o comportamento dessas plantas para demonstrar que também é possível obter produtividades de espécies de clima temperado como a lavanda, mesmo em solos tropicais e intemperizados utilizando tecnologia e inovação.

Quanto ao uso na medicina popular utilizam-se, principalmente as inflorescências e menos frequentemente as folhas, que são consideradas estimulante, digestivas, antiespasmódica, tônica, calmante dos nervos e antimicrobiana. É indicada também no tratamento da insônia, nevralgia, cólicas e gases intestinais e é contra indicada em caso de gravidez e lactação. Além disso, usa-se para afecções das vias respiratórias, asma, bronquite, tosse, catarro, gripe, sinusite, tensão nervosa, depressão, vertigens, cistite e enxaqueca (LORENZI e SOUZA, 2008).

Reações alérgicas por lavanda têm sido reportadas em função compostos potencialmente tóxicos como D-limoneno, geraniol, linalol e acetado de linalil (JIN e HA, 2005). Internamente, o óleo essencial, em doses não terapêuticas, é neurotóxico, e externamente pode provocar dermatites de contato quando usado não diluído. Não se deve usar via internamente durante a gravidez, a aleitação, em crianças menores de seis anos, ou em doentes com gastrites, úlceras pépticas, doenças inflamatórias intestinais ou com doenças neurológicas (MC NAUGHTON, 2010).

2.2 Metabolismo secundário e óleos essenciais

Conhecer o que é produzido pelas plantas é o que as tornam possuidoras de efeito medicinal e conforme o tipo de substância que as mesmas produzem, as condições do local e o modo de condução da cultura, pode influenciar na característica final do produto (RIBEIRO e DINIZ, 2008).

A atual revalorização das plantas medicinais levou ao aumento da demanda da identificação dos subprodutos e ingredientes ativos e conseqüentemente a intensificação do comércio dessas plantas. Assim, deve ser dada prioridade ao estudo e conservação dessas espécies (PARKASH e SINGH, 2013).

As plantas superiores possuem dois tipos de metabolismo, o primário e o secundário. No primário são produzidas substâncias como lipídeos, proteínas, carboidratos, aminoácidos e ácidos nucleicos, que estão relacionados com o crescimento e desenvolvimento da planta.

No metabolismo secundário são produzidas substâncias que possuem atividades de proteção contra pragas, doenças e atração de polinizadores, entre outras. Essas substâncias possuem um grande potencial econômico, especialmente na indústria

alimentícia, farmacêutica e setores de comércio como é o caso do óleo essencial de lavanda (PIMENTEL et al., 2006).

Os óleos essenciais são produtos aromáticos voláteis que podem ser encontrados concentrados em diversas partes da planta como: nas folhas, flores, células secretoras (Figura 1), tricomas e outras, e podem ser empregados nas indústrias de perfumaria, limpeza, cosmética, alimentícia e farmacêutica (TSURO et al., 2000).



Figura 1. Esquema de produção e armazenamento do óleo essencial (GARLET, 2007).

O óleo essencial da lavanda (do latim "lavare", "lavar") já era utilizado pelos romanos para lavar roupa, tomar banho, aromatizar ambientes e como produto curativo para insônia, calmante, relaxante e contra dores. Dentre as espécies do gênero *Lavandula*, a *L. angustifolia* apresenta maior valor econômico, devido ao alto teor de linalol e acetato de linalila (MOON et al., 2006) (Tabela 1). Na composição química desse óleo essencial são encontrados compostos como: acetato de linalil, cariofileno, alcoóis geraniol, furfurol, cineol, borneol, e seus ésteres, bem como cumarinas, taninos, saponina ácida e princípio amargo (LORENZI e MATOS, 2002).

Tabela 1. Compostos majoritários e densidade do óleo essencial (o.e.) de *Lavandula angustifolia* (SILVA, S. 2015 adaptado)

Características	Lavanda (<i>L. angustifolia</i>)
Densidade o.e	0,876 - 0,892
Cânfora	0,5 - 1%
Cariofileno	3 - 12%
1,8 – Cineol	1 - 2%

Linalol	30 - 49%
Acetato de linalina	30 - 45%
Ocimeno	2,5 - 6%

De acordo com Lima et al. (2003), a natureza e a quantidade de metabólitos especiais produzidos durante o desenvolvimento do vegetal podem ser afetadas por radiação (alta ou baixa), temperatura (excessivamente elevada ou baixa), precipitação (alta, deficiente e seca total), ventos fortes, solo, época, estação e horário de coleta, entre outros, que são fatores controlados no caso do cultivo *in vitro*.

Dessa forma é necessário testar maneiras de se obter uma produtividade que supra a demanda do mercado nacional de produtos com concentrações, quantidade e qualidade desejáveis de óleos essenciais. Para isso, uma alternativa seria estudar diferentes condições de cultivo através da micropropagação.

2.3 Cultura de tecidos vegetais

O processo de cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado sob condições assépticas, em meio nutritivo artificial. Este processo baseia-se no princípio da totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula de organismo vegetal apresenta todas as informações genéticas necessárias à regeneração de uma planta completa (PASQUAL et al., 1998; GALLO e CROCOMO, 2011).

Assim, diversas partes da planta como gemas, meristemas apicais, embriões, segmentos de caule, extremidade de raízes e outras, podem ser cultivadas *in vitro* em meio nutritivo apropriado em ambiente asséptico (THORPE, 2012).

Pinhal et al. (2011) mencionam também que a cultura de tecidos vegetais mostra-se como alternativa através de diferentes técnicas, que permite a propagação de espécies que apresentam dificuldades de germinação como é o caso da lavanda, o que permite produzir mudas em larga escala, incluir espécies em bancos de germoplasma, além de promover o intercâmbio dessas.

A micropropagação é uma técnica de cultura de tecidos que engloba diferentes etapas que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até seu enraizamento, culminando com a aclimatização da planta micropropagada (BASTOS et al., 2007).

Apresenta bons resultados e tem sido utilizada para obtenção de plantas saudáveis e em larga escala (THORPE, 2012).

A micropropagação além de disponibilizar maior quantidade de mudas em curto período de tempo, permite o controle das condições ambientais durante a propagação e a preservação de plantas matrizes sem riscos de infecção por microrganismos (BARBOZA e CALDAS, 2001), no entanto, é necessário o estabelecimento de protocolos que melhor se adequem às exigências de cada espécie. Dessa forma, a cultura de tecidos mostra-se como técnica de grande relevância, que otimiza o processo propagação mantendo as características desejadas.

2.4 Meios de cultura e luz

Os meios de cultura de tecidos são constituídos basicamente por água, macro e micronutrientes, vitaminas, mio-inositol, uma fonte de energia (carboidrato) e um agente geleificante. Silva, (2015) menciona que juntos esses componentes oferecem as condições necessárias para o desenvolvimento das plantas, porém, diferentes combinações são requeridas a depender da espécie.

No desenvolvimento dos meios nutritivos para a cultura de tecidos de plantas, houve desde o início uma busca por meios definidos, de composição conhecida e controlada (CALDAS et al., 1998). Porém, algumas modificações além de proporcionarem melhores condições de desenvolvimento das plantas, têm ainda grande aplicabilidade na melhoria da conservação *in vitro*, conforme citado por Souza et al., (2011). Na maioria das vezes essas alterações se baseiam na redução da concentração de seus componentes originais, utilização de agentes alternativos, alteração do potencial hidrogeniônico (pH) ou ainda adição de reguladores de crescimento.

Os meios de cultura, segundo Caldas et al., (1998), além de fornecer as substâncias essenciais para o crescimento, também controlam o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Alguns desses meios foram especificamente desenvolvidos para fornecer os requisitos particulares à espécie trabalhada, como o meio básico de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), desenvolvido inicialmente para tecido medular de *Nicotiana tabacum* e que atualmente é utilizado para um grande número de espécies e também o LS (LINSMAIER e SKOOG, 1965) (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação da composição dos meios de cultura LS e MS.

Sais	LS mg L ⁻¹	MS mg L ⁻¹
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	440	440
KH ₂ PO ₄	170	170
KNO ₃	1900	1900
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	370
NH ₄ NO ₃	1650	1650
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025	0,025
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025	0,025
H ₂ BO ₃	6,2	6,2
KI	0,83	0,83
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	22,3
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	0,25
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	8,6
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	27,8
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	37,2	37,2
Acido nicotínico		0,5
Glicina		2,0
Mio-inositol	100	100
Piridoxina Hcl		0,5
Tiamina Hcl	0,4	0,1

Conforme a Tabela 2 é possível verificar que o meio LS difere do meio MS por não conter as vitaminas ácido nicotínico e piridoxina e o aminoácido glicina além de conter maior quantidade da vitamina tiamina.

O ácido nicotínico (niacina ou vitamina B) é um alcaloide presente nas moléculas de NAD e NADP (nicotinamida adeninadineotídeo), e é um precursor da nicotina. Nem todas as plantas são capazes de sintetizar suas próprias vitaminas, portanto a incorporação dessas substâncias no meio deve ser estudada. Contudo, em se

tratando de drenos, raízes, por exemplo, a suposição de que nem todos os seus requerimentos nutricionais orgânicos sejam sintetizados ficou evidenciada quando se observou que, na presença de algumas vitaminas (tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, etc.), o crescimento das raízes (tomate, ervilha e rabanete) melhorava sensivelmente (SALISBURY e ROSS, 2012).

A necessidade de vitaminas é variável para cada espécie e há relatos de cultura que dispensam a adição de vitaminas no meio nutritivo. A tiamina, na forma de pirifosfato de tiamina é um co-fator essencial no metabolismo do carboidrato e é diretamente envolvida na biossíntese de alguns aminoácidos. A tiamina tem sido adicionada aos meios de cultura mais frequentemente porque as plantas a requerem para crescer (PASQUAL et al., 1998).

Outro fator muito importante no cultivo *in vitro* é a luz em função da sua energia radiante transmitida que é determinante no desenvolvimento e é caracterizada pelo fotoperíodo, irradiância e composição espectral. A composição espectral está relacionada a características dos tubos fluorescentes que serão utilizados, podendo ser de sódio ou mercúrio no caso das lâmpadas fluorescentes. A descarga elétrica, em síntese, passa através das partículas de vapor que estão dentro dos tubos e causam emissão de luz branca com predominância de algum tipo de comprimento de onda: alaranjada, no caso do sódio e azulada no caso do mercúrio (CID, 2010).

A luz é entendida também como uma forma de energia radiante e resulta da superposição de campos magnéticos elétricos que se propagam como ondas, como “partículas” ou fótons. Os fótons têm diferentes valores de energia e os da região ultravioleta são mais energéticos que os da região vermelha. Um mol de fótons de qualquer comprimento de onda tem $6,023 \times 10^{23}$ fótons.

A respeito dos efeitos da composição espectral sobre a morfogênese, os resultados têm sido variados segundo as espécies e órgãos. A luz da região azul e vermelha estimulam diferentes organogêneses (raiz/brotos) (Figura 2).

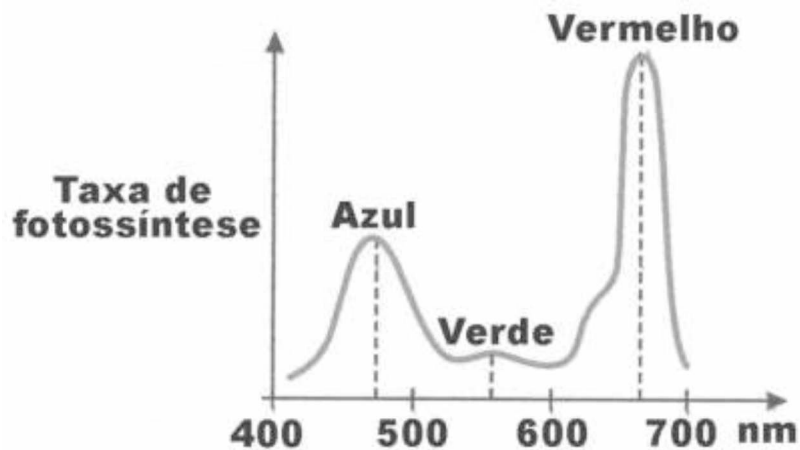


Figura 2. Taxa fotossintética das plantas segundo o comprimento de onda de luz (SANTOS, 2011).

Lâmpadas fluorescentes, frequentemente usadas nas câmaras de crescimento de planta, apresentam espectro por duas linhas individuais da emissão de mercúrio sobreposta em um espectro contínuo do fosforo. Essa luz é particularmente rica em comprimentos de ondas azuis, mas pode ser enriquecida com comprimentos de onda vermelhos (SALISBURY e ROSS, 2012).

O gênero *Lavandula* é geralmente composto por plantas de dia longo, e a sua floração ocorre em regimes fotoperiódicos de 16h luz/8h de escuro. É então possível que se alterarmos o fotoperíodo, aumentando-o ou diminuindo-o, possamos causar diferenças nas estruturas da planta, inclusive na produção de secreções (MCNAUGHTON, 2010). Isso ocorre pela presença dos fitocromos e outros fotorreceptores na planta que controlam os processos fotomorfogênicos, iniciando com a germinação da semente e o desenvolvimento das mudas e culminando na formação de novas flores e sementes (SALISBURY e ROSS, 2012).

O fitocromo é o principal fotorreceptor das plantas vasculares e absorve mais fortemente as luzes vermelha e vermelha distante, e em menor quantidade absorve a luz azul. Quimicamente, o fitocromo é um homodímero de dois polipeptídios idênticos, cada um com um peso molecular de aproximadamente 120 KDa. Cada polipeptídio tem um grupo prostético chamado de cromóforo que é ligado por um átomo de enxofre e a um resíduo de cisteína do polipeptídio. É o cromóforo, e não a proteína, que absorve a luz que causa a resposta a luz pelo fitocromo (SALISBURY e ROSS, 2012).

2.5 Germinação *in vitro* e reguladores vegetais

Na propagação de lavanda por sementes observa-se desuniformidade no desenvolvimento das mudas e das plantas a campo, devido à variabilidade natural resultante da propagação sexuada (BIASI e DESCHAMPS, 2009). Neste contexto, o cultivo *in vitro* pode resolver ou minimizar pontos críticos na multiplicação sistematizada de plantas com propriedades medicinais e ou produtoras de óleos essenciais pelo processo de micropropagação a partir de sementes.

A falta de conhecimento dos principais processos básicos da germinação que ocorrem nas sementes de várias espécies têm dificultado a realização de programas de melhoramento genético e cultivos comerciais. Diversos fatores podem afetar o potencial germinativo das sementes e promoverem a formação de plântulas anormais, dentre eles, a presença de microrganismos, dormência e fenômenos comuns no cultivo *in vitro* como a hiperhidricidade no caso da lavanda.

A dormência é a incapacidade de germinar decorrente de condições internas, mesmo que a externas (por exemplo, temperatura, umidade e atmosfera) sejam adequadas (SALISBURY e ROSS, 2012). No caso de *L. angustifolia*, o tegumento do diásporo para ser o tecido que dificulta a germinação e por isso Delgado (2010) testou acetona, ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio no intuito de escarificar quimicamente o pericarpo do fruto tipo núcula de *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* e obteve resultados positivos de germinação da ordem dos 71,75%, 83% e 83,25% respectivamente.

Palma e Kermode (2003) apontam que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) exógeno pode servir na mobilização de reservas de energia para a síntese das hidrolases. Outros autores como Schopfer et al. , (2002) mencionam que o H_2O_2 promove o afrouxamento da parede celular favorecendo a extensão celular. Çavusoglu e Kabar (2010) trabalhando com sementes de cevada tratadas com H_2O_2 sob estresse salino, também observaram que o peróxido de hidrogênio provocou alterações no equilíbrio hormonal das sementes, favorecendo a germinação e atuando de forma antagonica ao ABA.

Outro problema comum na cultura de tecidos é a hiperhidricidade que é uma tipo de desordem morfológica em que as plantas adquirem aspecto translúcido, caules largos e engrossados em diâmetro, entrenós mais curtos que os de plantas normais, órgãos menos verdes e facilmente quebráveis, menor formação de raízes ou o não enraizamento (IVANOVA E STADEN, 2009).

Nas folhas podem provocar hipertrofia do mesófilo e do córtex do caule, hipertrofia das células, maiores espaços intercelulares, falta de cera cuticular, folhas grossas, frágeis, alongadas e/ou enrugadas e com alterações na densidade e distribuição dos estômatos, nas células-guarda, no número e espessura das camadas da epiderme e do tecido parenquimático e nas estruturas de defesa mecânica e química, além de desorganização dos tilacóides e baixo número de granas, menor número de cloroplastos e menor quantidade de clorofila (ROJAS E DE KLERK, 2010; KEVERS et al., 2004; DEBIASI et al., 2007).

O crescimento das plantas que estão em meio de cultura é diretamente influenciado pelo uso de reguladores vegetais, que podem promover, inibir ou modificar os processos fisiológicos (PINHEIRO et al., 2001). Para superar a dificuldade de germinação das sementes de lavanda, se faz necessário a utilização de diferentes métodos como o uso de reguladores de crescimento.

No que se refere à germinação de sementes, Guerra (2004) ressalta o papel das giberelinas na germinação, estando envolvidas tanto na quebra da dormência como no controle da hidrólise de reservas, da qual depende o embrião em crescimento. Além da quebra de dormência, as giberelinas aceleram a germinação em sementes não dormentes e aumentam a hidrólise de reservas.

Muitos estudos têm tentado elucidar a ação dos hormônios e outros produtos químicos, a nível molecular, na quebra da dormência. Há relatos de vários autores que apontam também as giberelinas como precursoras tanto na quebra de dormência quanto na rapidez da germinação de sementes não dormentes, atuando na síntese de RNA e proteínas específicas da germinação (MARTINS e SILVA, 2001; STENZEL et al., 2003).

Em sementes de cereais, as giberelinas ativam a síntese de enzimas que irão hidrolisar as reservas da semente, liberando energia para o crescimento do embrião (TAIZ e ZEIGER, 2009). Aoyama (1996), testando as concentrações de 100 ppm e 200ppm de ácido giberélico (GA₃) em sementes de lavanda, concluiu que os dois tratamentos influenciaram positivamente na porcentagem de germinação, bem como reduziram o tempo médio de germinação.

Uma classe de reguladores já utilizada também *in vitro* são as poliaminas, que são classificadas como compostos amino-alifático necessários para o crescimento e são encontradas em todas as plantas e as mais comuns são: putrescina (uma diamina), espermina (uma triamina) e espermina (uma tetramina) (Figura 3.).

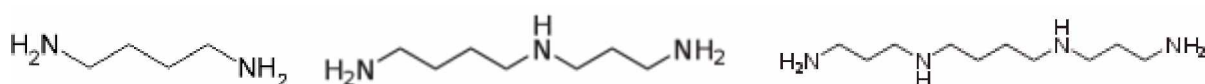


Figura 3. Estrutura química das poliaminas putrescina, espermidina e espermina respectivamente (MINOIS et al., 2011).

Em solução, em níveis de pH citoplasmático, estas poliaminas atuam sobre polications, complexando agentes. Têm-se observado também que elas atuam sobre estimulantes de crescimento das plantas, sugerindo que elas podem funcionar como precursores secundários para hormônios em células (PASQUAL et al., 1998).

As poliaminas apresentam efeitos similares aos das auxinas na divisão e alongação celular. Relacionado a isso se tem observado também que as poliaminas atrasam a senescência de células em cultura. Dentre os principais efeitos *in vitro* dessas substâncias podem ser citados: regulação da formação de brotações adventícias, estímulo da formação de raízes adventícias, da divisão celular, do florescimento e formação de embriões somáticos (PASQUAL et al., 1998).

As poliaminas têm um papel importante na indução da divisão, no alongamento de células e na xilogênese em explantes excisados de tubérculo de alcachofra (*Helianthus tuberosus*). A presença de poliamina junto à auxina e citocinina promove uma sequência de processos que se inicia com uma fase de ativação (0-24h); atividade mitótica (24-48h) e diferenciação do xilema (depois de 48h). As poliaminas estão também envolvidas nos sistemas dos protoplastos de muitas plantas. A aplicação exógena de giberelina pode também induzir um aumento nos níveis desses sistemas de protoplastos (PERREIRA, 2005).

O desenvolvimento de raízes, a iniciação e o desenvolvimento floral, a frutificação, a tuberização, e a senescência são processos nos quais as poliaminas podem estar envolvidas de maneira geral. Vários modelos sugerem que as poliaminas espermidina e espermina, junto com outros componentes da célula, como as histonas, contribuem com mudanças nas conformações do DNA, promovendo estabilização das duplas hélices, determinando as estruturas secundárias e terciárias do ácido nucléico. Espermidina e espermina, assim como seu precursor, a diamina putrescina, estão relacionadas com a regulação da divisão celular, diferenciação e na morfogênese. As poliaminas, quando adicionadas ao meio de cultura, têm-se mostrado estimuladoras de crescimento em várias plantas (TASSONI et al., 2000).

Estudos sobre a correlação entre adição de poliaminas e multiplicação *in vitro* de taro (*Calocasum esculenta*) demonstraram que as melhores regenerações, em ápices de brotações primárias, eram obtidas tanto em meios suplementados com precursores de putrescina, arginina e ornitina quanto com espermina (FRANCISCO et al., 2008).

2.6 Variáveis de germinação

Algumas variáveis de germinação podem nos ajudar a entender o mecanismo da germinação das sementes que se trata de um processo aparentemente estático mais que internamente acontecem em complexas fases de embebição, hidrólises, divisões e crescimento que culminam na fase visual da emergência.

A germinabilidade é uma variável em geral expressa em porcentagem, para informar a quantidade de sementes que germina nas condições do ensaio. Apesar de ser um termo pouco conhecido em algumas áreas do conhecimento que trabalham com germinação como as ciências agrárias, é amplamente utilizado na fisiologia da germinação (SANTANA e RANAL 2000).

O tempo de germinação é outra medida de germinação que ajuda entender o processo, em que o tempo para a primeira germinação expressa o tempo das sementes mais rápidas e tempo da última germinação o das mais lentas (SANTANA e RANAL 2004).

A velocidade de emergência aferida nos experimentos é uma outra medida adimensional (sem unidade), para predizer o vigor relativo de amostras de sementes. Apesar de não assumir uma unidade para o número obtido, a expressão comunica o número de plântulas emergidas em campo ou germinadas em laboratório, por dia (Equação 1). O valor obtido com esta expressão é influenciado pelo tempo médio de germinação e consequentemente pela velocidade de germinação das sementes, ou seja, se a germinação ocorrer logo no início da semeadura, o valor do índice será maior do que se isto ocorrer mais tardiamente. Esta é a grande vantagem do índice que, de fato, mede velocidade de germinação (SANTANA e RANAL 2000).

Equação 1. Demonstração do cálculo de velocidade de emergência em plântulas por dia (SANTANA e RANAL 2000).

$$VE = \frac{n^{\circ} \text{ de plântulas normais}}{\text{dias até a primeira contagem}} + \dots + \frac{n^{\circ} \text{ de plântulas normais}}{\text{dias até a contagem final}}$$

3. OBJETIVO

O presente trabalho objetivou avaliar a eficiência da utilização de peróxido de hidrogênio no pré-tratamento de sementes de lavanda inoculadas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de ácido giberélico no estabelecimento em cultivo *in vitro*. Além disso, identificar qual lâmpada, convencional fluorescente ou growlux favorece a germinação e desenvolvimento inicial dessa espécie em meio MS e LS nas concentrações de 50 e 100% dos sais. E por fim, testar o efeito das poliaminas espermina, espermidina e putrescina e ácido giberélico nas concentrações de 0,1 e 0,5 mg L⁻¹.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os três experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. Sementes de lavanda (*Lavandula angustifolia*) da marca Isla® foram desinfestadas em álcool 70% durante um minuto e em solução de hipoclorito de sódio 30% por vinte minutos. Em seguida, em câmara de fluxo laminar higienizada foram lavadas três vezes com água destilada e autoclavada.

Experimento 1. Neste experimento as sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 0,0; 1,0; 2,0 e 3,5 mg L⁻¹ de GA₃ e com adição de 30 g L⁻¹ de sacarose. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 e em seguida o meio foi autoclavado a 121°C e 1,2 atm durante 20 minutos.

Foram realizados dois experimentos independentes para análise estatística conjunta. No primeiro as sementes de lavanda foram submetidas a um pré-tratamento que consistiu na imersão em solução de peróxido de hidrogênio a 2,5% por 24 horas em mesa agitadora e no segundo experimento as sementes não foram pré-tratadas.

Os frascos de vidro transparentes de 200 mL contendo 30 mL de meio foram vedados com tampas de polipropileno, filme pvc e mantidos em sala de crescimento convencional, com fotoperíodo de 16 horas por dia, temperatura de 25±2°C, com intensidade luminosa de 52,5W m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (DBC) com quatro tratamentos e cinco repetições (Tabela 3). Cada parcela experimental consistiu de seis frascos sendo que cada frasco continham cinco sementes.

Tabela 3. Tratamentos utilizados para o estabelecimento *in vitro* de *Lavandula angustifolia* Uberlândia – MG, 2015.

Tratamentos	H ₂ O ₂ (%)	Ácido giberélico (mg L ⁻¹)
T1	0	0,0
T2	0	1,0
T3	0	2,0
T4	0	3,5
T1	2,5	0,0
T2	2,5	1,0
T3	2,5	2,0
T4	2,5	3,5

Aos 60 dias após inoculação das sementes foram avaliadas as seguintes características: taxa de germinação (%) (sendo consideradas germinadas as sementes que apresentavam protrusões de radícula e epicótilo), comprimento da plântula (cm), número de folhas e massa fresca (g) das plântulas desenvolvidas.

Experimento 2. Foi instalado de maneira similar ao primeiro experimento. As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MS e LS nas concentrações 50 e 100% dos sais e colocadas na sala de crescimento sob duas condições luminosas: lâmpadas fluorescentes convencionais e lâmpadas growlux caracterizando então dois experimentos independentes (Tabela 4).

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados (DBC) com quatro tratamentos e cinco repetições. Cada parcela experimental consistiu de dez tubos sendo que cada tubo continha uma semente.

Tabela 4. Tratamentos utilizados para estabelecimento *in vitro* de *Lavandula angustifolia* Uberlândia – MG, 2015.

Tratamentos	Lâmpada	Meio de cultura	Concentração (%)
T1	Convencional	MS	50
T2	Convencional	MS	100
T3	Convencional	LS	50
T4	Convencional	LS	100
T1	Growlux	MS	50
T2	Growlux	MS	100
T3	Growlux	LS	50
T4	Growlux	LS	100

Foram realizadas avaliações diárias e aos 60 dias após inoculação das sementes foi avaliado as seguintes características no experimento: comprimento da parte aérea e radicular das plântulas (cm), número de folhas, massa fresca (g) das plântulas desenvolvidas, taxa de germinação (%) (sendo consideradas germinadas sementes que apresentavam protrusões de radícula e epicótilo) e velocidade de emergência das plântulas.

Experimento 3. Neste ensaio também instalado de maneira similar aos demais, as sementes foram inoculadas em frascos de vidro transparentes 200 mL contendo 30 mL de meio de cultura LS acrescido de ácido giberélico, espermina, espermidina e

putrescina, nas concentrações 0,1 e 0,5 mg L⁻¹. Após isso, os frascos foram colocados na sala de crescimento sob condição luminosa de lâmpadas brancas fluorescentes convencionais (Tabela 5).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com oito tratamentos e cinco repetições. Cada parcela experimental foi constituída de 4 frascos sendo que cada tubo continha 5 sementes.

Tabela 5. Tratamentos utilizados para estabelecimento *in vitro* de *Lavandula angustifolia* Uberlândia – MG, 2015.

Tratamentos	Regulador vegetal	Concentração (mg L ⁻¹)
T1	GA ₃	0,1
T2	GA ₃	0,5
T3	Espermina	0,1
T4	Espermina	0,5
T5	Espermidina	0,1
T6	Espermidina	0,5
T7	Putrecina	0,1
T8	Putrescina	0,5

Aos 60 dias após inoculação das sementes foram avaliadas as seguintes características: taxa de germinação (%) (sendo consideradas germinadas sementes que apresentavam protrusões de radícula e epicótilo), comprimento da parte aérea e radicular das plântulas (cm), número de folhas, massa fresca (g) das plântulas desenvolvidas, porcentagem de plântulas anormais e de sobrevivência das plântulas.

Os dados obtidos em todos os experimentos foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa estatístico Sisvar 4.3 (FERREIRA, 2000). Através do SPSS foram testadas e atendidas as pressuposições de normalidade dos resíduos, homogeneidade das variâncias e aditividade de blocos, com os testes de Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov ($\alpha = 0,01$), Levene e Tukey ($\alpha = 0,01$).

Realizou-se análise conjunta do primeiro e segundo experimento através do programa estatístico Genes (CRUZ, 2006) com posterior aplicação do teste de Tukey e de regressão polinomial para estudo do pré-tratamento e das doses de GA₃, respectivamente a 5% de significância. Quando observada a significância das doses, mas não ajuste dos modelos de regressão, procedeu-se ao teste de Tukey para comparação entre médias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento1: Uso de peróxido de hidrogênio no pré-tratamento de sementes de lavanda inoculadas em diferentes concentrações de ácido giberélico.

Através do resumo da análise de variância (Tabela 6), observa-se que houve interação significativa entre os fatores apenas para a variável germinação (GER). Já para as características comprimento de plântula (COM), número de folhas (FOL), massa fresca das plântulas (MAS), a interação não foi significativa, o que caracteriza independência dos fatores estudados, sendo assim, foram analisados isoladamente.

Tabela 6. Resumo da análise de variância das características taxa de germinação (GER), comprimento da plântula (COM), número de folhas (FOL) e massa fresca (MAS) das plântulas desenvolvidas de *Lavandula angustifolia in vitro* em diferentes doses de GA₃ com ou sem o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio H₂O₂. Uberlândia-MG, 2015.

FV	GL	GER	COM	FOL	MAS
Pre trat H ₂ O ₂	1	93,88*	56,28*	17,93*	18,10*
Doses GA ₃	3	40,34*	2,46 ^{ns}	2,51 ^{ns}	0,95 ^{ns}
Doses*Pre trat	3	11,21*	1,88 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,24 ^{ns}
Média geral		48,18	3,78	8,98	0,21

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, ^{ns} não significativo pelo teste F.

Os dados obtidos apontam que as sementes quando pré- tratadas com peróxido de hidrogênio foram superiores no percentual de germinação para todas as concentrações de GA₃, exceto para a dose de 3,5 mg L⁻¹ onde as sementes tratadas não apresentaram diferença significativa em relação as não tratadas (Tabela 7).

Comparando o efeito das doses de GA₃ dentro das sementes tratadas nota-se que a maior dose proporcionou um maior percentual de germinação em relação às outras concentrações, entretanto a dose de 1,0 mg L⁻¹ proporcionou resultados iguais ao da dose máxima.

Tabela 7. Percentual de germinação de sementes de *Lavandula angustifolia in vitro* submetidas ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e doses de giberelina – Uberlândia-MG, 2015.

Dose de GA ₃ (mg L ⁻¹)	Germinação (%) ¹	
	Tratadas	Não-tratadas
0,0	45,22 A c	9,46 Bc
1,0	71,60 A ab	26,00 Bc
2,0	57,98 Abc	46,68 Bb
3,5	73,34 A a	63,20 Aa
DMS = 10,95	² F (Tukey) = 6,425	² W = 0,981 ² F= 0,553

¹médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

²F (Tukey); W; F: estatísticas dos testes de Tukey para aditividade, Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente; valores em negrito indicam tratamentos e blocos com efeitos aditivos, normalidade dos resíduos e variâncias homogêneas, respectivamente.

As sementes que não receberam pré-tratamento com H₂O₂ apresentaram um comportamento linear em relação às concentrações de GA₃, ou seja, quanto maior a dose desse regulador de crescimento, maior foi o percentual de germinação, que chegou a 63,20%, não sendo demonstrado efeito fitotóxico dentro do intervalo de concentrações testadas (Figura 4). Resultados semelhantes foram encontrados por Pauletti et al., (2007) que testando a dose de 250 ppm de GA₃ em sementes de poejo do campo (*Cunila galioides*) encontraram uma porcentagem de 54,5% de germinação.

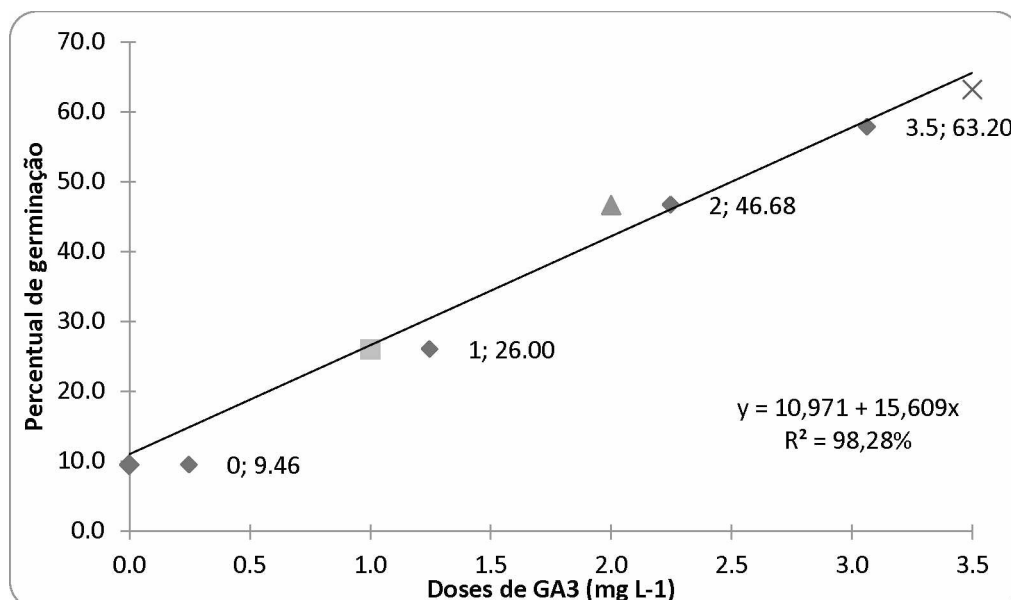


Figura 4. Percentual de germinação *in vitro* de sementes não-tratadas de *Lavandula angustifolia* em função de doses de GA₃ – Uberlândia-MG, 2015.

Os tratamentos das sementes com o peróxido de hidrogênio resultaram em valores superiores para comprimento das plântulas, número de folhas e massa fresca, sendo que para essa última característica o pré-tratamento e o GA₃ exerceram efeitos isolados. Esses resultados demonstram que o H₂O₂ favorece não só a germinação como também o desenvolvimento das estruturas vegetativas (Tabela 8).

Resultados semelhantes foram encontrados por Çavusoglu e Kabar (2010) que trabalhando com sementes de cevada tratadas com H₂O₂ obtiveram comprimento radicular cerca de duas vezes superior em relação à testemunha (água destilada).

Isso ocorre porque o peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa do oxigênio atua na parede celular da semente afrouxando as ligações por processos degenerativos, devido a propriedade de serem ou gerarem radicais livres. Radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétron desemparelhados, sendo assim, altamente reativo e capazes de atacar qualquer biomolécula, e de meia vida curta (SALISBURY e ROSS, 2012).

Tabela 8. Médias do comprimento (cm), número de folhas e massa fresca (g) de plântulas de *Lavandula angustifolia in vitro* em função do pré-tratamento das sementes – Uberlândia-MG, 2015.

Pré-tratamento (H ₂ O ₂) ¹	Comprimento (cm)	Número de folhas	Massa fresca (g)
Tratadas	4,44 a	10,97 a	0,28 a
Não-tratadas	3,12 b	7,00 b	0,14 b
DMS	0,36	1,01	0,07
² F (Tukey)	0,000	0,069	0,797
² W	0,970	0,984	0,969
² F	0,885	1,778	1,547

¹médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

²F (Tukey); W; F: estatísticas dos testes de Tukey para aditividade, Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente; valores em negrito indicam tratamentos e blocos com efeitos aditivos, normalidade dos resíduos e variâncias homogêneas, respectivamente.

Dentro das concentrações testadas o efeito do GA₃ mostrou ser favorável ao número de folhas até a concentração de 2,5 mg L⁻¹. Doses mais elevadas atuam de forma antagônica a essa característica, ocorrendo um decréscimo do número de folhas e necrose apical em algumas plantas, como foi observado (Figura 5). Esse comportamento vai de encontro aos dados obtidos por Deccetti (2005), que relatou efeito prejudicial do GA₃ no desenvolvimento de brotações de araticum bravo (*Annona glabra*) em concentração de 2 mg L⁻¹, além da ocorrência de abscisão foliar.

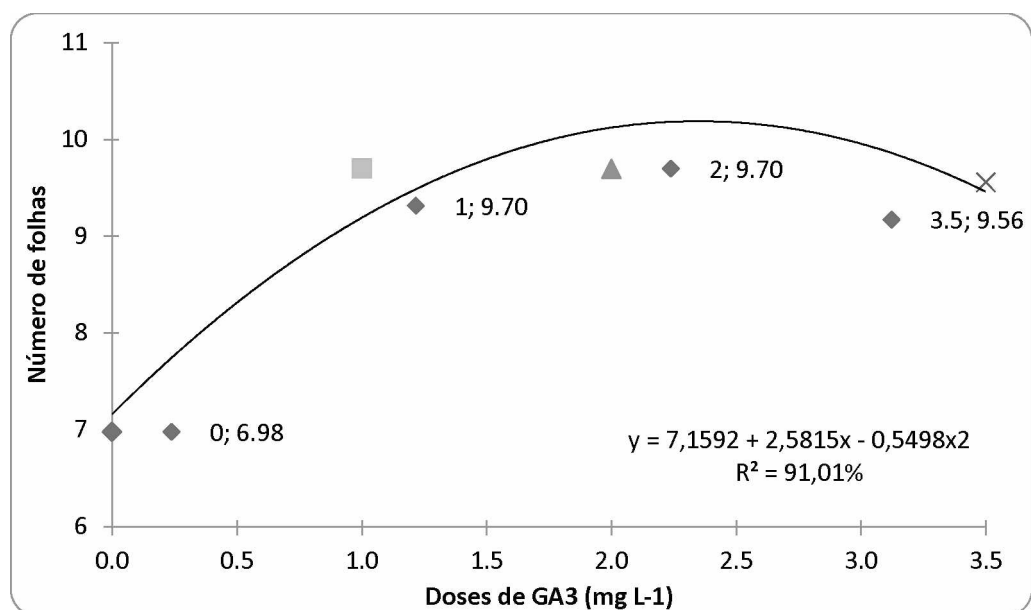


Figura 5. Número médio de folhas de plântulas *in vitro* de *Lavandula angustifolia* em função de doses de GA₃ – Uberlândia-MG, 2015.

Experimento 2: Uso de lâmpadas convencionais e growlux em diferente meios de cultura e concentração de meio.

Através do resumo da análise de variância do experimento em lâmpadas brancas fluorescentes convencionais (Tabela 9), observa-se que nessa condição luminosa houve interação significativa entre os fatores apenas para as variáveis número de folha (FOL) e germinação (GER). Já para as características comprimento parte aérea (AER), comprimento de parte radicular (RAD), massa fresca das plântulas (MAS) e velocidade de emergência (VE) a interação não foi significativa, o que caracteriza independência dos fatores estudados.

Tabela 9. Resumo da análise de variância das características número de folhas (FOL), comprimento da parte aérea (AER) e radicular das plântulas (RAD), massa fresca (MAS) das plântulas desenvolvidas, taxa de germinação (GER) e velocidade de emergência (VE) das plântulas desenvolvidas de *Lavandula angustifolia in vitro* em condição luminosa convencional, diferentes meios de cultura (MS e LS) e concentrações de meio (50 e 100%). Uberlândia-MG, 2015.

FV	GL	FOL	AER	RAD	MAS	GER	VE
Concentração	1	1,35ns	0,31ns	1,05ns	2,22ns	0,04ns	0,0ns
Meio	1	26,22*	0,52ns	0,00ns	2,86ns	2,16ns	1,25ns
Concentração x meio	1	4,55*	0,07ns	3,50ns	2,78ns	7,47*	2,00ns
Média geral		8,88	4,28	7,64	0,097	52,08	0,51

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, ^{ns} não significativo pelo teste F.

Além disso, através do resumo da análise de variância do experimento em lâmpadas growlux (Tabela 10), observa-se que nessa condição luminosa não houve interação significativa entre os fatores. Todas as características, exceto comprimento radicular (RAD) foram significativas quanto a característica concentração de meio.

Tabela 10. Resumo da análise de variância das características número de folhas (FOL), comprimento da parte aérea (AER) e radicular das plântulas (RAD), massa fresca (MAS) das plântulas desenvolvidas, taxa de germinação (GER) e velocidade de emergência (VE) das plântulas desenvolvidas de *Lavandula angustifolia in vitro* em condição luminosa growlux, diferentes meios de cultura (MS e LS) e concentrações de meio (50 e 100%). Uberlândia-MG, 2015.

FV	GL	FOL	AER	RAD	MAS	GER	VE
Concentração	1	19,40*	28,97*	0,83ns	7,98*	4,86*	8,17*
Meio	1	0,53ns	2,37ns	0,68ns	0,07ns	0,89ns	3,30ns
Concentração x meio	1	0,62ns	1,00ns	0,00ns	0,00ns	1,59ns	2,64ns
Média geral		7,90	2,59	7,14	0,09	63,33	0,62

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, ^{ns} não significativo pelo teste F.

Quanto a influencia das diferentes lâmpadas testadas, não foi identificada diferença nas características avaliadas exceto para comprimento de parte aérea que sob lâmpadas growlux e na condição de meio MS houve a formação de menores comprimentos de parte aérea (Tabela 11).

As lâmpadas growlux são compostas por feixes de luz azul e vermelho que são a faixa mais favorável a fotossíntese, porém, ainda assim desfavoreceu de algum modo a espécie lavanda que acabou crescendo menos. Erig et al. (2005), testando luz azul e vermelha em framboeseira obtiveram plantas mais alongadas na condição luminosa vermelha porém na azul não.

Tabela 11. Comprimento da parte aérea (cm) de *Lavandula angustifolia in vitro* sob diferentes condições luminosas, meios de cultura e concentrações de meio. Uberlândia-MG, 2015.

Meio	Dose (%)	Parte aérea	
		Convencional	Growlux
MS	50	4,06Aa	1,71Ba
MS	100	3,81Aa	1,51Ba
LS	50	5,00Aa	4,02Aa
LS	100	4,22Aa	3,10Aa
² F (Tukey) = 2,420 ² W= 0,966 ² F= 0,134 , ² F (Tukey) = 0,023 ² W= 0,945 ² F= 0,309			

¹médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

²F (Tukey); W; F: estatísticas dos testes de Tukey para aditividade, Shapiro-Wilk e Levene, para luz convencional e growlux respectivamente ; valores em negrito indicam tratamentos e blocos com efeitos aditivos, normalidade dos resíduos e variâncias homogêneas, respectivamente.

Os comprimentos radiculares das plântulas de lavanda cultivadas em meio MS ou LS na condição de luz branca convencional ou growlux não diferiram (Tabela 12). Esses resultados contradizem o que Gonçalves e Romano (2013) relatam a respeito do gênero, de que o mesmo é favorecido por meios de cultura de baixa concentração de macronutrientes como o MS com 50%.

Tabela 12. Comprimento da parte radicular (cm) de *Lavandula angustifolia in vitro* sob diferentes condições luminosas, meios de cultura e concentrações de meio. Uberlândia-MG, 2015.

Meio	Dose (%)	Parte radicular	
		Convencional	Growlux
MS	50	7,93Aa	5,69Aa
MS	100	7,35Aa	7,06Aa
LS	50	6,6Aa	7,21Aa
LS	100	8,64Aa	8,60Aa
² F (Tukey) = 0,053 ² W= 0,974 ² F= 0,179 , ² F (Tukey) = 0,863 ² W= 0,961 ² F= 1,607			

¹médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

²F (Tukey); W; F: estatísticas dos testes de Tukey para aditividade, Shapiro-Wilk e Levene para luz convencional e growlux respectivamente; valores em negrito indicam tratamentos e blocos com efeitos aditivos, normalidade dos resíduos e variâncias homogêneas, respectivamente.

Para a característica número de folhas verificou-se que nas duas condições luminosas, o LS proporcionou maior número de folhas principalmente na concentração 50% (Tabela 13). Gonçalves e Romano (2012) relatam que muitos autores testaram esse meio para condução de *Lavandula* spp, porém com metade da concentração.

Machado et al., (2013) testando *Lavandula angustifolia* cv Provence Blue não identificaram diferença aos 40 dias para a característica número de folhas, por explante quando se cultivou com meio MS e LS.

Tabela 13. Número de folhas de *Lavandula angustifolia in vitro* sob diferentes condições luminosas, meios de cultura e concentrações de meio. Uberlândia-MG, 2015

Meio	Dose (%)	Número de folhas	
		Convencional	Growlux
MS	50	4,97Ab	3,17Ab
MS	100	6,22Ab	3,30Ab
LS	50	14,28Aa	14,18Aa
LS	100	10,05Aab	10,98Aa
² F (Tukey) = 5,821 ² W= 0,980 ² F=1,723, ² F (Tukey) = 0,277 ² W= 0,940 ² F= 2,783			

¹médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

²F (Tukey); W; F: estatísticas dos testes de Tukey para aditividade, Shapiro-Wilk e Levene para luz convencional e growlux, respectivamente; valores em negrito indicam tratamentos e blocos com efeitos aditivos, normalidade dos resíduos e variâncias homogêneas, respectivamente.

As massas frescas das plântulas de lavanda foram maiores na condição convencional quando as mesmas foram cultivadas em meio LS com metade da concentração de sais ou em MS 100% (Tabela 14).

Tabela 14. Massa fresca (g) de *Lavandula angustifolia in vitro* sob diferentes condições luminosas, meios de cultura e concentrações de meio. Uberlândia-MG, 2015.

Meio	Dose (%)	Massa fresca	
		Convencional	Growlux
MS	50	0,04Ab	0,03Aa
MS	100	0,05Aab	0,04Aa
LS	50	0,25Aa	0,15Aa
LS	100	0,05Aab	0,16Aa
² F (Tukey) = 9,291 ² W=0,800 ² F= 0,848 , ² F (Tukey) = 3,645 ² W= 0,907 ² F= 5,596			

¹médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

²F (Tukey); W; F: estatísticas dos testes de Tukey para aditividade, Shapiro-Wilk e Levene para luz convencional e growlux, respectivamente; valores em negrito indicam tratamentos e blocos com efeitos aditivos, normalidade dos resíduos e variâncias homogêneas, respectivamente.

Conforme Taiz e Zeiger (2009), a pressão osmótica muito alta do meio concentrado limita a absorção de água, sendo que a diluição aumenta a disponibilidade de água à planta e reduz a oxigenação.

É importante ressaltar que durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e na morfogênese por meio de propriedades osmóticas (MALDANER et al., 2006).

A concentração absoluta de um meio nutritivo nem sempre é a mais adequada dependendo da espécie. No cultivo *in vitro* de cerejeira amarela (*Amburana acreana*), por exemplo, a germinação foi desfavorecida quando se aumentou as concentrações de sais MS (FERMINO JÚNIOR; PEREIRA et al., 2012).

A respeito da taxa de germinação de lavanda *in vitro* verificou-se que na condição luminosa de lâmpadas convencionais não houve diferença quando a espécie foi cultivada em meio MS ou LS nas duas concentrações. Entretanto, quando cultivada na condição de lâmpadas growlux, as sementes germinaram em uma taxa maior quando exposta ao meio com metades da quantidade de sais descrito no protocolo do meio LS (Tabela 15). Esse resultado concorda com a tendência encontrada na característica massa fresca comentada anteriormente.

Tabela 15. Porcentagem germinação de *Lavandula angustifolia in vitro* sob diferentes condições luminosas, meios de cultura e concentrações de meio. Uberlândia-MG, 2015.

Meio	Dose (%)	Germinação (%)	
		Convencional	Growlux
MS	50	53,33Aa	56,67Ab
MS	100	65,00Aa	58,33Aab
LS	50	70,00Aa	75,00Aa
LS	100	60,00Aa	63,33Aab

²F (Tukey) = **0,155** ²W = **0,977** ²F = **0,023** , ²F (Tukey) = **0,001** ²W = **0,977** ²F = **0,892**

¹médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

²F (Tukey); W; F: estatísticas dos testes de Tukey para aditividade, Shapiro-Wilk e Levene para luz convencional e growlux, respectivamente; valores em negrito indicam tratamentos e blocos com efeitos aditivos, normalidade dos resíduos e variâncias homogêneas, respectivamente.

Ao se avaliar a velocidade de emergência das plântulas de lavanda é possível confirmar o benefício promovido pelo meio LS com 50% verificado na taxa de germinação (Tabela 16).

Tabela 16. Velocidade de emergência de *Lavandula angustifolia in vitro* sob diferentes condições luminosas, meios de cultura e concentrações de meio. Uberlândia-MG, 2015

Meio	Dose (%)	Velocidade de emergência	
		Convencional	Growlux
MS	50	0,55Aa	0,56Ab
MS	100	0,62Aa	0,55Ab
LS	50	0,68Aa	0,79Aa
LS	100	0,61Aa	0,61Aab
² F (Tukey) = 0,047		² W= 0,954	² F= 0,184 , ² F (Tukey) = 1,170
		² W= 0,964	² F= 0,543

¹médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

²F (Tukey); W; F: estatísticas dos testes de Tukey para aditividade, Shapiro-Wilk e Levene para luz convencional e growlux, respectivamente; valores em negrito indicam tratamentos e blocos com efeitos aditivos, normalidade dos resíduos e variâncias homogêneas, respectivamente.

O meio LS favoreceu a maioria das características avaliadas na lavanda *in vitro*. Mesmo sendo um meio com menos vitaminas e aminoácido esse meio consegue proporcionar melhores condições, talvez pela condição osmótica mais favorável ou ainda pelo que Pasqual et al. (1998) comenta, que para muitas culturas os aminoácidos não são essenciais e pelo alto custo dos sais podem ser desnecessário, desde que a quantidade de nitrogênio acrescentado e a proporção de íons nitrato e amônio sejam corretas.

Experimento 3: Uso de reguladores vegetais poliaminas e ácido giberélico em diferentes concentração sob lavanda

Através do resumo da análise de variância (Tabela 17), observa-se que houve interação significativa entre os fatores apenas para a variável número de folhas (FOL). Já para as características comprimento de parte aérea (AER), comprimento de parte radicular (RAD), massa fresca das plântulas (MAS), porcentagem de plântulas anormais (ANOR) e porcentagem de germinação (GER) a interação não foi significativa, o que caracteriza independência dos fatores estudados, sendo assim, foram analisados isoladamente.

Tabela 17. Resumo da análise de variância das características número de folhas (FOL), comprimento (cm) da parte aérea (AER) e radicular das plântulas (RAD), massa fresca (MAS) das plântulas desenvolvidas (g), porcentagem de plântulas anormais (ANO), taxa de germinação (GER) das plântulas de *Lavandula angustifolia in vitro* na presença de diferentes reguladores vegetais em duas concentrações. Uberlândia-MG, 2015.

FV	GL	FOL	AER	RAD	MAS	ANO	GER
Poliaminas	3	8,36*	3,32*	1,30ns	3,05ns	1,676ns	1,27ns
Concentração	1	1,64ns	5,46*	0,075ns	2,64ns	1,22ns	5,00*
Poliaminas*Concentração	3	10,59*	3,05ns	1,728ns	0,59ns	1,62ns	0,06ns
Média geral		6,79	1,84	4,93	0,08	0,25	0,41

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, ^{ns} não significativo pelo teste F.

Dentre os reguladores vegetais testados no cultivo *in vitro* de lavanda todos favoreceram a produção de um maior número de folhas quando aplicado na maior concentração, exceto na presença do regulador poliamínico espermina (Tabela 18). Menores concentrações de espermidina e putrescina levaram a uma formação de menor número de folhas de lavanda.

Esse padrão de resposta conjunta espermidina e putrescina pode ter relação com o que Tassoni et al. (2000) encontraram testando o efeito de espermidina na atividade e regulação da biossíntese de enzimas em diferentes órgãos de *Arabidopsis thaliana* L. Eles identificaram que na maioria dos órgãos testados de *arabidopsis* a espermidina foi convertida em putrescina através da enzima poliamina putativa oxidase determinando, portanto respostas similares.

Tabela 18. Número de folhas de plântulas *Lavandula angustifolia in vitro* na presença de diferentes reguladores vegetais em duas concentrações Uberlândia-MG, 2015.

Reguladores	Concentração (mg L ⁻¹)		Média
	0,1	0,5	
Acido giberélico	8,95Aa	10,03Aa	9,49
Espermina	12,44Aa	5,11Ba	8,78
Espermidina	2,00Bb	6,27Aa	4,13
Putrescina	1,33Bb	8,17 Aa	4,75
Média	6,18	7,39	

S-K: **0,086**; F_{Levene}: **1,924**; CV (%): 75,21

¹médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância; S-W; F_{Levene}: estatísticas dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente; valores em negrito resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas a 0,01; CV (%): coeficiente de variação.

Plântulas com maior parte aérea foram formadas quando cultivadas com maior quantidade de reguladores no meio (Tabela 19). Essa tendência provocada pelas poliaminas também foi relatada por Tassoni et al. (2000) com a espécie *Arabidopsis thaliana* L. inoculada em meio com esses reguladores.

O melhor efeito de GA₃ encontrado nesse terceiro experimento concorda também com o encontrado no primeiro experimento aqui apresentado que testou diferentes concentrações desse regulador com ou sem pré-tratamento de peróxido de hidrogênio.

Tabela 19. Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de *Lavandula angustifolia in vitro* na presença de diferentes reguladores vegetais em duas concentrações. Uberlândia-MG, 2015.

Reguladores	Concentração (mg L ⁻¹)		Média
	0,1	0,5	
Acido giberélico	2,26	2,99	2,62a
Espermina	2,19	1,45	1,82ab
Espermidina	0,50	2,28	1,39b
Putrescina	1,00	2,06	1,53ab
Média	1,49b	2,20a	

S-K: **0,177**; F_{Levene}: 7,472; CV (%): 40,26

¹médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância; S-W; F_{Levene}: estatísticas dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente; valores em negrito resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas a 0,01; CV (%): coeficiente de variação.

O comprimento da parte radicular das plântulas de lavanda não foi influenciado pelo acréscimo de reguladores no meio (Tabela 20). Pasqual et al. (1998) relatam que as poliaminas apresentam efeitos similares aos das auxinas na divisão e alongamento

celular favorecendo o enraizamento. Talvez a característica número de raízes formadas evidenciasse esse favorecimento radicular.

Tabela 20. Comprimento da parte radicular (cm) de plântulas de *Lavandula angustifolia* *in vitro* na presença de diferentes reguladores vegetais em duas concentrações. Uberlândia-MG, 2015.

Reguladores	Concentração (mg L ⁻¹)		Média
	0,1	0,5	
Acido giberélico	7,06	5,49	6,27a
Espermina	6,98	3,61	5,30a
Espermidina	1,17	4,58	2,87a
Putrescina	3,83	6,75	5,29a
Média	4,76a	5,10a	

S-K: **0,137**; F_{Levene}: 5,827; CV (%): 63,11

¹médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância; S-W; F_{Levene}: estatísticas dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente; valores em negrito resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas a 0,01; CV (%): coeficiente de variação.

A massa fresca das plântulas de lavanda não diferiu quando se cultivou em meios com os diferentes reguladores (Tabela 21). Entretanto outros autores observaram incremento de massa fresca de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*, submetidas a meios suplementado com putrescina e espermina (STEINER, 2007)

Tabela 21. Massa fresca (g) de plântulas de *Lavandula angustifolia* *in vitro* na presença de diferentes reguladores vegetais em duas concentrações. Uberlândia-MG, 2015.

Reguladores	Concentração (mg L ⁻¹)		Média
	0,1	0,5	
Acido giberélico	0,11	0,11	0,11a
Espermina	0,10	0,14	0,12a
Espermidina	0,01	0,04	0,03a
Putrescina	0,01	0,10	0,06a
Média	0,06a	0,10a	

S-K: **0,186**; F_{Levene}: 8,136; CV (%): 78,11

¹médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância; S-W; F_{Levene}: estatísticas dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente; valores em negrito resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas a 0,01; CV (%): coeficiente de variação.

A incidência de plântulas com aspectos anormais como vitrificação, deformação, desproporcionalidade, perfilhamento, princípio de oxidação ou necrose foram percebidas no geral durante a condução do experimento, entretanto não foi verificada diferença estatística em virtude da exposição desses diversos reguladores vegetais e concentrações (Tabela 22).

Machado et al. (2013) testando *Lavandula angustifolia* cv Provence Blue identificaram aos 40 dias diferença para ocorrência de plântulas anormais quando se cultivou com meio MS e LS onde o primeiro gerou maior taxa. Gonçalves e Romano (2013) comentam que esse fenômeno frequentemente acontece com o gênero *Lavandula* spp em virtude das condições artificiais.

Park et al. (2004) relatam que esses tipos de desordem morfológicas e fisiológicas podem atingir até 60 % de brotos micropropagados em virtude do elevado teor de água no interior das células e tecidos.

Tabela 22. Incidência de plântulas anormais em *Lavandula angustifolia in vitro* na presença de diferentes reguladores vegetais em duas concentrações. Uberlândia-MG, 2015.

Reguladores	Concentração (mg L ⁻¹)		Média
	0,1	0,5	
Acido giberélico	0,17	0,15	0,16a
Espermina	0,33	0,27	0,30ab
Espermidina	0,23	0,32	0,27ab
Putrescina	0,17	0,38	0,27b
Média	0,22a	0,27a	

S-K: **0,120**; F_{Levene}: **0,823**; CV (%): 36,72

¹médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância; S-W; F_{Levene}: estatísticas dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente; valores em negrito resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas a 0,01; CV (%): coeficiente de variação.

Quanto à germinação das sementes de lavanda houve um aumento de maneira geral pela presença de maiores concentração de reguladores vegetal no meio de cultura (Tabela 23). Ayoama (1996) também encontrou maior porcentagem de germinação de lavanda quando a inoculou em meio com maior quantidade de reguladores.

Tabela 23. Porcentagem (%) de germinação de sementes de *Lavandula angustifolia in vitro* na presença de diferentes reguladores vegetais em duas concentrações. Uberlândia-MG, 2015.

Reguladores	Concentração (mg L ⁻¹)		Média
	0,1	0,5	
Acido giberélico	50	50	50a
Espermina	45	38	42a
Espermidina	25	47	36a
Putrescina	18	55	37a
Média	35b	47a	

S-K: **0,165**; F_{Levene}: **1,573**; CV (%): 34,46

¹médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância; S-W; F_{Levene}: estatísticas dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente; valores em negrito resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas a 0,01; CV (%): coeficiente de variação.

6. CONCLUSÕES

O pré-tratamento de sementes de lavanda com peróxido de hidrogênio favorece ganhos para todas as características avaliadas, sendo recomendado o uso desse procedimento para o estabelecimento da espécie.

O uso de ácido giberélico promoveu maiores percentuais de germinação na maior dose, porém para a obtenção de plantas com melhores características qualitativas a concentração de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ mostrou ser a mais adequada.

O cultivo *in vitro* de lavanda com lâmpadas convencionais ou growlux o meio que favorece a maioria das características morfológicas e fisiológicas da germinação avaliadas é o LS.

Os reguladores poliaminas favorecem a germinação, crescimento da parte aérea e formação de folhas *in vitro* na concentração testada de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$

REFERÊNCIAS

- AOYAMA, E. M.; ONO, E. O.; FURLAN, M. R. Estudo da germinação de sementes de lavanda (*Lavandula angustifolia* Miller). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 53, n. 2-3, p. 267-272, 1996.
- BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S. Estiolamento e regeneração na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro híbrido PExSC – 52. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 417-423, 2001.
- BASTOS, L. P.; MOREIRA, M. J. S.; COSTA, M. A. P. C.; ROCHA, M. C.; HANSEN, D. S.; SILVA, S. A.; DANTAS, A. C. V. L.; SOUSA, C. S. Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl.2, p.1122-1124, 2007.
- BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009. 160 p.
- BIASI, L. A.; BONA, C. A. Influence of leaf retention on cutting propagation of *Lavandula dentata* L. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n. 4, 2010.
- BOREM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2 ed. Viçosa: Editora UFV, 2005. 969p.
- BOTREL, P. P.; PINTO, J. E. B. P.; ARAÚJO, A. C. C.; BERTOLUCCI, S. K. V. Variação no teor e na composição volátil de *Hyptis marruboides* EPL. cultivada no campo e em casa de vegetação. **Química nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 33-37, 2010.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.(Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa - CNPH, Parte II, p. 87-132, 1998.
- ÇAVUSOGLU, K.; KABAR, K. Effects of hydrogen peroxide on the germination and early seedling growth of barley under NaCl and high temperature stresses. **EurAsian Journal of BioSciences**. Izmir, v. 4, n. 9, p. 0-79, 2010.
- CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. 2010. 303p.
- CHEMAT, F. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 555, p. 157-160, 2006.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: biometria**. Editora UFV. Viçosa (MG). 382p. 2006.
- DECCETTI, S. F. C. PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. ALOUFA, M. A. I. La micropropagation d' *Annona glabra* L. à partir de segments nodaux. **Fruits**, Paris, v. 60, p. 319-325, 2005.

DDTD, DIRECTION DEPARTEMENTALE DES TERRITOIRES DE LA DROME – **Etude stratégique des filières agricole drômoises**. Plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales, Diataé: Montpellier, 2010, 80p.

DEBIASI, C.; FRÁGUAS, C. B.; LIMA, G. P. P. Estudo das poliaminas na morfogênese *in vitro* de *Hemerocallis* sp. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, 2007.

ERIG, A. C.; SHUCH, M. Tipos de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) “BATUM”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 488-490, 2005.

FERMINO JUNIOR, P. C. P.; PEREIRA, J. E. S. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - Fabaceae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2012.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FRANCISCO, A. A.; TAVARES, A. R.; KANASHIRO, S.; RAMOS, P. R. R.; LIMA, G. P. P. Reguladores vegetais e teores endógenos de poliaminas durante o desenvolvimento de taro cultivado *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1251-1257, 2008.

GALLO, L. A.; CROCOMO, O. J. A cultura de tecidos em fitopatologia. In: FILHO AB; KIMATI H; AMORIM L. **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos. 4 ed., São Paulo: Ceres, 2011, v.1.

GARLET, T. M. B. **Produtividade, teor e composição do óleo essencial de espécies de *Mentha* L. (Lamiaceae) cultivada em hidroponia com variação de potássio**. 2007. 112 f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2007.

GONÇALVES, S.; ROMANO, A. *In vitro* culture of lavanders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 31, p. 166-174. 2013.

GUERRA, M. P. Giberelinas. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452p.

IVANOVA, M.; STADEN, J. V. Nitrogen source, concentration, and $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, p. 167–174, 2009.

JIN, J. Z.; HA, C. Y. GC-MS Determination of chemical components of essential oil from Lavender. J. **Light Ind**, Wuxi, v. 24, p. 68-71, 2005.

KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cellular Tissue and**

Organ Culture, Dordrecht, v. 77, p. 181-191, 2004.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Revista Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 10, n. 2, p. 71 - 77, 2003.

LORENZI, H. E.; MATOS, F. J. DE A. **Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002. 512 p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de. **Plantas ornamentais do Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2008. 1123p.

LINSMAIER, E. M.; SKOOG, F. Medium modified after: **Plant Physiology**, Rockville, 18, 100-127, 1965.

MACHADO, M. P.; CIOTTA, M. N.; DESCHAMPS, C.; ZANETTE, F.; CÔCCO, L. C., BIASI, L.A. *In vitro* propagation and chemical characterization of the essential oil of *Lavandula angustifolia* cultivated in Southern Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.2, p.283-289, 2013.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T.; SANTOS, E. S.; FLORES, R.; SKREBSKY, E. C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1201-1206, jul./ago. 2006.

MARTINS, L.; SILVA, W. R. Comportamento da dormência em sementes de braquiária submetidas a tratamentos térmicos e químicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36. n. 7, p. 997-1003, 2001.

MATTOS, J. K. A. Tendências fitotécnicas e econômicas de espécies vegetais utilizadas na medicina popular. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 15, p.161-162, 1997. Palestra. Suplemento.

MCNAUGHTON, V. **Lavender the grower's guide**. Portland: Timber press 180 p., 2010.

MINOIS, N.; GUTIERREZ, D. C.; MADEO, F. Polyamines in aging and disease. **Aging**, Orchard Park, v.3, p.1-17, 2011.

MOON, T.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Antibacterial activity of essential oils, hydrosols and plant extracts from Australian grown *Lavandula* spp. **International Journal of Aromatherapy**, La Martre, v.16, n.1, p.9-14, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, Rockville, v.15, p. 473-97, 1962.

NIGEL, U. Generation and characterisation of colchicine-induced polyploid *Lavandula* Å intermedia. **Euphytica**, Amsterdam, v. 197 n.3, p331, 2014.

PALMA K.; KERMODE A. R. Metabolism of hydrogen during reserve mobilization and programmed cell death of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone layer cells. **Free Radical**

Biology and Medicine, San Diego, v.10, p. 1261-1270, 2003.

PARK, S. W.; JEON, H. H.; KIM, H.S.; PARK, Y. M.; ASWATH, C.; JOUNG, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, p. 199-205, 2004.

PARKASH, V.; SINGH, H. *Lavandula angustifolia* L. (Lavander): An important aromatic medicinal shrub and its *in vitro* micro-propagation for conservation. **Journal of Agriculture Technology**, Bangkok, v9, p.691-702, 2013.

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; HOFFMANN, A.; CARVALHO, G. R. **Cultura de tecidos vegetais: Tecnologia e aplicações**. Lavras/ Faepe 1998. 127p.

PAULETTI, G. F.; BARROSO, C. M.; BARROS, I. B. Estudo da germinação de sementes de poejo do campo (*Cunila galioides* Benth.). **Revista Brasileira Agroecologia**, Porto Alegre, v.2, n.1, fev. 2007.

PEREIRA, R. P. W. **Atenuação do processo de lignificação em *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) por GA₃ e BAP**. 2005. 98 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais), Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P. S. P.; AGUIAR, P. M.; SILVA, V. F.; MORAIS A. R.; NELSON D. L. A convenient method for determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, 2006.

PINHAL, H. F. **Estabelecimento *in vitro* de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.)**. 2011. 54 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia), Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N. de; MACÊDO, E. C. de; ALLOUFA, M. A. I. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, p. 413-416, 2001.

ROJAS, M. L.; DE KLERK, G. J. Drowning from within. Hyperhydricity in plant tissue culture. **Prophyta The Annual**, Velsen zuid, p. 22-25, 2010.

RIBEIRO, P. G. F.; DINIZ, R. C. **Plantas aromáticas e medicinais: cultivo e utilização**. Londrina: IAPAR, 2008, 218 p.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Fisiologia das plantas**. São Paulo: Cengage Learning, 774p. 2012.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. Análise estatística na germinação. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, (edição especial) p.205-237, 2000, v. 12.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. **Análise da germinação – um enfoque estatístico**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 248p, 2004.

SANTOS, D. **Teses de fotossínteses**. 2013. Disponível em:

< <https://djalmasantos.wordpress.com/2011/02/12/testes-de-fotossintese-13/>> Acesso em 30/01/2016.

SCHOPFER, P.; LISZKAV, A.; BECHTOLD, M.; FRAHRY, G.; WAGNER, A. Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. **Planta**, Berlin, v.214, p. 821-828, 2002.

SPSS v. 17,00 **SPSS**. Chicago, Illinois, 2008. CD-ROM.

SILVA, F. J. S. **Estabelecimento e desenvolvimento inicial de barueiro (*Dypterys alata*) in vitro**. 2015. 75f. Dissertação de mestrado. (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

SILVA, S. M. **Sistemas agrícolas e adubação na biomassa e óleo essencial de lavanda (*Lavandula dentada* L.)**, 2015, 96f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

SOUZA, G. L. O. D.; ALVES, K. A.; NETO, A. I.; ANDRADE, L. F.; DURÃES, N. N. L.; OLIVEIRA, M. B.; LONDE, L. N.; SOUZA, A. S. Efeito de Concentrações de Sacarose e de Meio de Cultura (8S) sobre o crescimento de mandioca cultivar Mico (BGM 1014) Conservadas *in vitro*. CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, **Anais...** 6, Búzios/RJ, Brasil, 2011.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; FLOH, E. I. S.; GUERRA, M. P. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.89, p. 55-62, 2007.

STENZEL, N. M. C.; MURATA, I. M.; NEVES, C. S. V.J. Superação da dormência em sementes de atemóia e fruta-do-conde. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21. n.2. p. 305-308, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TASSONI, A.; VAN BUUREN, FRANCESCHETTI, S. F.; NELLO BAGNI. Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. **Plant Physiology and Biochemistry**, Lagos, v.38, n.5, p.383-393, 2000.

THORPE, T. History of plant tissue culture. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 877, p. 9-27, 2012.

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**, Amsterdam, v.86, n.1, p.81-88, 2000.

VERMA, R. S.; RAHMAN, L. U.; CHANDAN, S.; CHANOTIYA, C. S.; VERMA, R. K. CHAUHAN, A.; YADAV, A.; SINGH, A.; YADAV, A. K. Essencial oli composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India. **Journal of the Serbian Chemical Society**, Outtarakhand, v.75, p.343-348, 2010.