



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ensaio de cultura *in vitro* e poliploidização de *Lavandula multifida* L. e *Lavandula viridis* L'Her L.

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto (Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Lígia Maria Ribeiro Salgueiro (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra).

Hélia Joana da Silva Peixoto de Sales

2013

*“Deus ao mar o perigo e o abismo deu, mas nele é que espelhou
o céu.”*

Fernando Pessoa

“À minha família e ao Miguel, pela sua paciência e apoio, e por nunca me terem deixado desistir nos momentos mais difíceis”

Agradecimentos

Ao terminar esta fase da minha vida não posso deixar de agradecer a todos aqueles que sempre me incentivaram, apoiaram e contribuíram, de uma ou outra forma, para que este trabalho fosse concretizado.

Em primeiro lugar, agradeço ao Professor Doutor Jorge Canhoto, orientador deste trabalho, por tudo o que me tem ensinado ao longo destes anos, por toda a disponibilidade, apoio, conselhos e simpatia constantes... O meu muito, muito, muito obrigada!

À Professora Doutora Lígia Salgueiro, minha co-orientadora, uma agradecimento muito especial pela sua disponibilidade no esclarecimento de dúvidas e pelos conselhos aquando da revisão do texto.

À Mónica Zuzarte, o meu “braço direito”, pela sua presença constante apesar das distâncias, por toda a sua paciência, calma, boa disposição, incentivo e amizade! Um obrigada gigante!

Ao Professor Doutor Kiril Bahcevandziev e ao Professor Doutor João Loureiro, por toda a ajuda na parte da citometria de fluxo, pela disponibilidade e simpatia.

Ao Doutor José Dias pela sua ajuda no Laboratório de Microscopia Eletrónica e pelos sábios conselhos, o meu muito obrigada!

À D. Eulália Rosa pela sua ajuda incondicional no fornecimento de material, na preparação de meios, nos cuidados de laboratório, por toda a preocupação demonstrada e pela força e convívio nestes dois últimos anos.

À Lara Currais por todos os conselhos sobre a observação e manutenção culturas, pelos cuidados de laboratório e pela utilização dos equipamentos.

Às bibliotecárias do Departamento de Ciências da Vida e da Faculdade de Farmácia, agradeço a forma simpática e atenciosa com que sempre atenderam as minhas solicitações.

Aos meus colegas de mestrado e de laboratório, pela sua simpatia, ajuda e momentos de convívio e a todos os meus amigos e familiares que me incentivaram e apoiaram nesta caminhada... Obrigada!

À Mariana Carvalho e ao António Pedro Carvalho, por se terem disponibilizado a desenhar duas das “minhas plantinhas”. Obrigada primos!

Ao Miguel, por me ter feito olhar a vida de forma diferente, por me ajudar a tornar numa pessoa melhor, pela sua paciência, apoio incondicional, por estar sempre ao meu lado quando precisei, pela sua compreensão dada a minha “ausência” e falta de tempo, pela sua

cumplicidade, pela dedicação e por nunca me ter deixado desistir. Obrigada pelo nosso passado, presente e futuro!

Aos meus pais, Mário e Manuela, por todo o seu amor e apoio incondicionais, por estarem presentes em todos os momentos, pelo carinho e confiança ao longo de toda a minha vida e por sempre acreditarem em mim... Simplesmente obrigada do fundo do meu coração!

Finalmente, desejo expressar a minha gratidão a todos quantos, aqui não mencionados, contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

Muito obrigada!

Índice

Abreviaturas	xiii
Resumo.....	xv
Abstract	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1- Considerações gerais.....	3
1.2- O género <i>Lavandula</i>	4
1.2.1- Caracterização e distribuição	4
1.2.2- Estado da arte	6
1.2.3- Importância económica.....	7
1.2.4- Espécies nativas de Portugal.....	7
1.2.5- <i>Lavandula multifida</i> L.....	8
1.2.6- <i>Lavandula viridis</i> L'Hér L.	10
1.3- Óleos essenciais	12
1.3.1- Considerações gerais.....	12
1.3.2- Estruturas secretoras	14
1.3.3- Composição química.....	15
1.4- Biotecnologia Vegetal.....	16
1.4.1- Breve resenha histórica	16
1.4.2- Cultura <i>in vitro</i> - considerações gerais.....	17
1.4.3- Poliploidia e sua indução <i>in vitro</i>	18
1.4.4- Melhoramento vegetal em <i>Lavandula</i> spp.	22
1.5 – Contextualização do trabalho e objetivos.....	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
2.1- Material Vegetal.....	27
2.2- Proliferação de meristemas axilares.....	27

2.3- Indução da poliploidia.....	28
2.4- Monitorização das culturas	29
2.4.1 – Observação dos níveis de desenvolvimento e sobrevivência	29
2.4.2 – Análise do nível de ploidia por citometria de fluxo	30
2.4.3- Observação do cariótipo das plântulas.....	31
2.4.4 – Microscopia eletrónica de varrimento.....	32
2.5- Enraizamento em <i>Lavandula multifida</i> e <i>Lavandula viridis</i>	32
2.6- Aclimação de plântulas de <i>Lavandula multifida</i> e <i>Lavandula viridis</i>	33
2.7- Análise das plantas aclimatadas.....	33
2.8- Embriogénese somática em <i>Lavandula multifida</i>	33
2.8- Análise estatística.....	34
3. RESULTADOS.....	35
3.1- Proliferação de meristemas axilares.....	37
3.2- Taxas de sobrevivência e desenvolvimento	38
3.3 – Análise do nível de ploidia por citometria de fluxo	39
3.4 – Observação do cariótipo das plântulas	42
3.5 – Microscopia eletrónica de varrimento	43
3.6 – Aclimação de <i>L. multifida</i> e <i>L. viridis</i>	47
3.6 – Análise das plantas aclimatadas	48
3.7 – Embriogénese somática.....	50
4. DISCUSSÃO	53
4.1- Proliferação de meristemas axilares.....	55
4.2- Indução da poliploidia e taxas de sobrevivência e desenvolvimento.....	55
4.3 – Observação do cariótipo das plântulas	57
4.4 – Microscopia eletrónica de varrimento	58
4.5 – Aclimação de <i>L. multifida</i> e <i>L. viridis</i> e análise das plantas aclimatadas	59
4.6 – Embriogénese somática.....	60

5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	61
5.1- Conclusões	63
5.2 - Perspetivas futuras	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

Abreviaturas

2,4-D- diclorofenoxiacético

°C- graus Celsius

ANOVA- análise de variância

atm- atmosfera (unidade de pressão)

BAP- benzilaminopurina

CV- coeficiente de variação

CYTP450- hidroxilase do citocromo P450

DMADP- dimetilalil difosfato

DMSO- dimetilsulfóxido

FDP- farnesilo difosfato

FeEDTA- tetra-acetato de etileno diamina de ferro

FPS- FDP sintase

GDP- geranyl difosfato

GlyAld-3P- gliceraldeído-3-fosfato

GPS- GDP sintase

HCL- hipoclorito de cálcio

HMG-CoA- hidroximetilglutaril-CoA

HMGR- HMG-CoA redutase

IAA- ácido-3-indol acético

IDP- isopentenilo difosfato

IP- iodeto de propídio

M-Molar

mA- miliampere

Mbp- números de base de pares

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

MEP- metilo eritritol fosfato

MEP/DOXP- 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato/1- deoxi-D-xilulose-5-fosfato

MTS- monoterpene sintase

MVA- ácido mevalônico

NAA- ácido α -naftaleno-acético

nm- nanómetro

PAM- plantas aromáticas e medicinais

Pg- picogramas

SD- desvio padrão

SEM- microscopia eletrônica de varrimento

STS- sesquiterpene sintase

V- volts

v/v- volume/volume

WPB - “woody plant buffer”

μ L- microlitro

μ m- micrómetro

μ g- micrograma

Resumo

O género *Lavandula* é constituído por plantas aromático-medicinais com elevado interesse económico devido essencialmente à produção de óleos essenciais. A crescente procura de produtos naturais justifica o aumento da produção das respetivas plantas, recorrendo à cultura *in vitro* e prevenindo, assim, a colheita abusiva das espécies vegetais. Deste modo, a otimização de técnicas de micropropagação e o desenvolvimento de protocolos de melhoramento das espécies relevantes são fundamentais para a exploração do seu potencial. Como parte integrante de trabalhos em curso sobre a valorização das lavândulas portuguesas, pretende-se agora melhorar a produção de óleos essenciais de *Lavandula multifida* e *Lavandula viridis*, através da indução de poliploidia.

Segmentos nodais de *L. multifida* e *L. viridis* obtidos de plântulas estabelecidas *in vitro*, foram sub-cultivados em meio MS (Murashige and Skoog, 1962), suplementado com colquicina 125 mg/L e 1% (v/v) de DMSO por 5 dias no escuro, a 24°C. Após este tratamento, os meristemas axilares foram transferidos para meio MS suplementado com 0,2 mg/L de BAP e mantidos sob um fotoperíodo de 16h a 24°C.

O nível de ploidia das plântulas tratadas foi monitorizado por citometria de fluxo e confirmado por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e contagem do número de cloroplastos presentes nas células estomáticas da epiderme foliar. As plântulas com a ploidia desejada, mixoploidia ou tetraploidia, e plântulas controlo (não sujeitas ao tratamento com colquicina) foram transferidas para terra e aclimatadas.

Por último, foram efetuados ensaios de embriogénese somática, com diferentes combinações de hormonas e concentrações, com o objetivo de induzir a formação de embriões somáticos a partir de explantes foliares de *L. multifida*.

Em *L. multifida* obteve-se uma planta mixoplóide, sendo que a indução de tetraploidia ocorreu unicamente em *L. viridis*, obtendo-se 2 plantas tetraplóides e uma mixoplóide, que tiveram um bom desenvolvimento após a transferência para terra. Estes resultados foram comprovados por análises de citometria de fluxo, por observações em SEM onde se detetaram diferenças no tamanho dos tricomas glandulares peltados (em *L. multifida*) e nos tricomas glandulares peltados e tricomas glandulares capitados tipo II (em *L. viridis*) e por contagem do número de cloroplastos, onde se verificaram diferenças significativas entre o número de cloroplastos presentes em plantas diplóides, tetraplóides e mixoplóides.

Na indução de embriões somáticos, foi observada uma elevada percentagem de tecido caloso não embriogénico e a presença de estruturas globulares com potencial embriogénico, no meio MS suplementado com 2 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L cinetina.

O presente trabalho fornece, pela primeira vez, avanços relevantes no melhoramento de *L. multifida* e *L. viridis*, sendo que ainda são necessários mais esforços para aumentar o número de plantas tetraplóides obtidas. Trabalhos futuros incidirão sobre a multiplicação dos tetraplóides obtidos e a comparação do rendimento e composição química dos óleos essenciais produzidos com os das plantas diplóides.

Palavras-chave: colquicina, citometria de fluxo, óleos essenciais, tetraplóides, embriogénese somática.

Abstract

The genus *Lavandula* comprises aromatic and medicinal plants with high economic interest due essentially to the production of essential oils. The growing demand for natural products justifies the increase of plant production, thus avoiding spontaneous plant harvest and consequent dilapidation of natural resources. *In vitro* culture techniques that allow the production of higher oil-yielding plants are a key to exploiting the potential of these species. As part of our ongoing studies on the valorization of Portuguese lavenders we now intend to improve the production of *Lavandula multifida* and *L. viridis* essential oils, by inducing polyploidy.

Nodal segments from plantlets of *L. multifida* and *L. viridis* were cultured on MS (Murashige and Skoog, 1962) medium supplemented with 125 mg/L colchicine and 1% (v/v) DMSO for 5 days in the dark, at 24°C. After this treatment, axillary meristems were transferred to MS medium with 0.2 mg/L BAP under a photoperiod of 16h at 24°C.

The ploidy level of the treated plantlets was monitored by flow cytometry and confirmed by scanning electron microscopy (SEM) observations and chloroplast counting in the guard cells of leaf epidermis. Plantlets with the desired ploidy, mixoploids or tetraploids, and controls were transferred to soil and acclimatized.

Attempts to induce somatic embryogenesis in young leaves were also carried out in *L. multifida*, with different combinations and concentrations of hormones.

In *L. multifida* a mixoploid plant was obtained, and the induction of tetraploidy occurred only in *L. viridis*, yielding 2 mixoploid and tetraploid plants, which showed normal growth after transfer to soil. These results were confirmed by flow cytometry analysis, by SEM observations on the size of glandular peltate trichomes (in *L. multifida*) and glandular peltate trichomes and glandular capitate type II trichomes (in *L. viridis*) and counting of chloroplasts where significant differences were found among plants of different ploidy levels.

Regarding somatic embryogenesis, a large percentage of non-embryogenic callus tissue and some globular structures with embryogenic potential were obtained on MS medium supplemented with 2 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L kinetin.

This study gave significant insights for the breeding of these species. However, more efforts need to be performed to increase the number of tetraploid plantlets.

Further experiments will focus on the multiplication of tetraploid plants for essential oils extractions in order to compare their yield and chemical composition with those of diploid plants.

Key words: colchicine, flow cytometry, essential oils, tetraploids, somatic embryogenesis.

1. INTRODUÇÃO



1.1- Considerações gerais

Os produtos naturais têm sido empregues ao longo dos tempos no fabrico de vestuário, na construção de abrigos e armadilhas, em ferramentas e armas, em venenos para caça e pesca, em agentes protetores das culturas, entre outras utilizações (Copping & Duke, 2007). Destes produtos naturais destacam-se as plantas aromáticas e medicinais (PAM), que têm vindo a ser utilizadas na medicina, na cosmética, em cerimónias religiosas e para conferir aroma e sabor aos alimentos (De La Cruz, 2006). Uma das evidências escritas mais antigas da sua utilização para preparação de drogas é uma laje de argila suméria de Nagpur, com aproximadamente 5000 anos, composta por 12 receitas, referindo mais de 250 plantas diferentes e alguns compostos, como os alcalóides (Petrovska, 2012).

Com o desenvolvimento e progresso da humanidade e o avançar das civilizações, foram sendo identificadas as propriedades curativas de certas plantas medicinais. Este conhecimento foi passando de geração em geração, o que levou a novas investigações e a novas descobertas até aos nossos dias (Petrovska, 2012). Atualmente, a maioria dos produtos fitoterápicos, antibióticos e medicamentos anticancerígenos foram inicialmente identificados ou obtidos a partir de produtos naturais, que continuam a ser uma fonte significativa de potenciais drogas (Tavares *et al.*, 2010).

Nas últimas décadas tem-se observado um elevado interesse pelo potencial terapêutico das PAM (Yunes *et al.*, 2001). A suportar este facto os dados que mostram que cerca de 30% das drogas prescritas no mundo são obtidas direta ou indiretamente de plantas. Além disso, 50% das drogas desenvolvidas entre 1981 e 2002 foram obtidas a partir de produtos naturais ou análogos semi-sintéticos ou ainda de compostos sintéticos baseados em produtos naturais (Franco *et al.*, 2007).

Das inúmeras famílias de plantas destaca-se a família Lamiaceae (Labiatae), com uma elevada diversidade de PAM.

Esta família, amplamente representada em todo o mundo, é uma das mais importantes na região mediterrânica (Cela *et al.*, 2003). Compreende cerca de 200 géneros e 3000 espécies, sendo a maioria das espécies herbáceas ou de porte arbustivo ou semi-arbustivo. As labiadas têm um grande valor económico e são utilizadas maioritariamente como plantas ornamentais e pelos seus óleos essenciais (Hedge, 1979). Um dos géneros incluídos na família das labiadas e com grande valor económico é o género *Lavandula*. Este género engloba cerca de 39 espécies, muitas delas relevantes pelo elevado potencial dos óleos essenciais em

diversas indústrias, nomeadamente na perfumaria, cosmética, industria alimentar e farmacêutica (Upson & Andrews, 2004).

1.2- O género *Lavandula*

1.2.1- Caracterização e distribuição

Etimologicamente, a palavra *Lavandula* remete-nos para a palavra latina *lavare*, devido ao uso de algumas destas plantas para perfumar os banhos (Boeckelmann, 2008). Contudo, como não existem evidências escritas de que estas plantas eram empregues nos banhos romanos ou gregos, é bastante provável que a palavra tenha surgido do latim *livere*, que significa lívido ou azulado, em referência à cor da flor (Upson & Andrews, 2004).

O género *Lavandula*, criado por Lineu (1753), pertence à família das Lamiaceae e compreende cerca de 39 espécies de plantas aromáticas, distribuídas por oito secções (Upson & Andrews, 2004). A classificação do género encontra-se sistematizada no esquema da figura 1.

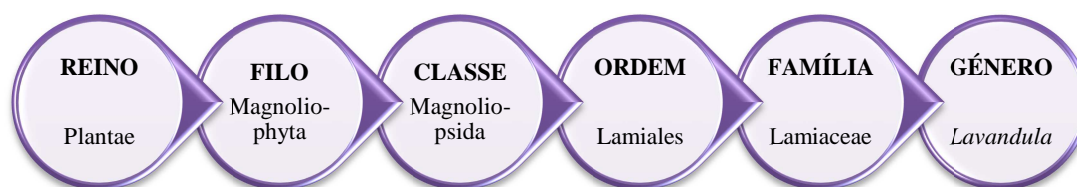


Figura 1. Classificação de *Lavandula* spp.

O género *Lavandula* subdivide-se em 3 subgéneros, de acordo com as características morfológicas: *Lavandula*, *Fabricia* e *Sabaudia*. Cada subgénero é ainda subdividido em secções, que se dissociam em inúmeras espécies (Upson & Andrews, 2004; Boeckelmann, 2008).

As espécies do género *Lavandula* são plantas perenes, lenhosas e aromáticas. De uma forma geral, apresentam caules eretos, mais ou menos ramificados, prismáticos ou cilíndricos. As folhas são simples, inteiras, dentadas ou bipinadas com margens revolutas. O indumento é composto ou simples, com tricomas ramificados e/ou glandulares. A inflorescência terminal possui um pedúnculo simples ou ramificado, formado por uma espiga simples ou por um

epicastro, disposto sobre pares de brácteas opostas, em várias filas verticais. O epicastro apresenta-se, por vezes, interrompido, laxo ou compacto, simples ou ramificado na base. As brácteas são membranosas, púrpuras, verde-acinzentadas ou amarelo-esverdeadas. Cada verticilo do epicastro tem um par de brácteas férteis e no final pode existir ou não um par de brácteas estéreis, que se diferenciam pela forma e pela cor. O cálice é simpétalo, podendo apresentar um pedicelo curto ou mais alongado, cilíndrico ou urceolado. É persistente na maturação com 5 a 8 dentes e 8, 13 ou 15 nervos. A corola apresenta uma coloração violeta-púrpura, azul ou amarelo-esverdeado, de tubo largo e estreito, excedendo pouco ou muito o cálice, com a garganta mais ou menos dilatada, com cinco lóbulos uniformes ou não, bilabiada, com a parte posterior vertical e a anterior mais ou menos horizontal ou inclinada. Existem quatro estames incluídos no tubo da corola e inseridos no seu interior, sendo o par anterior mais largo que o posterior e as anteras reniformes. O estilete de comprimento semelhante ao tubo da corola possui um estigma arredondado, mais ou menos bilobado, fendido-lanceolado ou fendido-aplanado; glanduloso e de cor violeta intenso, verde ou lilás (Cela *et al.*, 2003; Morales, 2010).

As lavândulas ocorrem na bacia Mediterrânica e região Macaronésica, África, Península Arábica, Irão e Índia, principalmente nas zonas montanhosas (Fig. 2). Toleram solos pobres e rochosos, preferindo os arenosos e bem drenados. No geral as espécies ocorrem em solos neutros e alcalinos. No entanto, as espécies da secção *Stoechas* toleram solos ácidos. As plantas deste género caracterizam-se, também, por serem heliófitas e resistentes às geadas. Em Portugal, ocorrem em locais secos, sendo abundantes nas charnecas e nos matos xerofíticos (Franco, 1984).

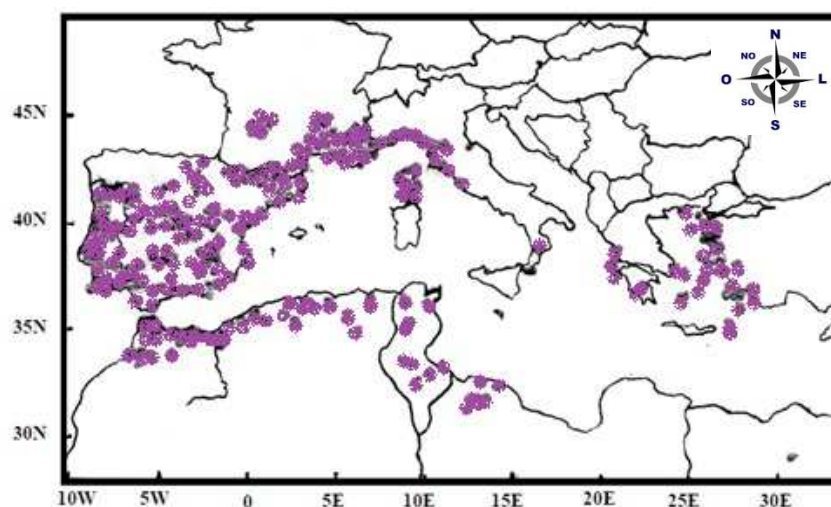


Figura 2. Distribuição geográfica de *Lavandula* spp. (adaptado de Upson & Andrews, 2004).

1.2.2- Estado da arte

As espécies do género *Lavandula* foram objeto de estudo por diversos autores ao longo dos séculos XVIII e XIX, nomeadamente Lundmark (1780), Cavanilles (1802), Gingins (1826), Bentham (1833, 1834) e Briquet (1895), todos citados em Suárez-Cervera & Seoane-Camba (1986). Posteriormente, Chaytor (1937) *cit* em Suárez-Cervera & Seoane-Camba (1986), elaborou uma monografia bastante complexa deste género, com esquemas representativos de alguns *taxa* existentes na Península Ibérica; Rozeira (1949, 1964) *cit* em Suárez-Cervera & Seoane-Camba (1986) debruçou-se sobre as espécies da secção *Stoechas*, descrevendo as diversas espécies e subespécies e ilustrando o seu trabalho com imagens de plantas inteiras; Barbier (1962) *cit* em Gilly (1997) dedicou-se ao estudo das lavândulas francesas, representando esquemas das brácteas nas diferentes espécies. Estes trabalhos serviram de inspiração a Suárez-Cervera & Seoane-Camba (1986), que realizaram um estudo morfológico bastante completo do género *Lavandula* da Península Ibérica tendo por base a morfologia dos caracteres de maior importância na sistemática deste género, nomeadamente a morfologia das brácteas férteis e estéreis, o dente apendiculado do cálice, os estigmas, as inflorescências e o corte transversal das folhas, com especial atenção ao indumento das mesmas. Neste estudo, os autores utilizaram material fresco e analisaram diferentes exemplares de herbário, sugerindo uma divisão do género *Lavandula* em quatro secções-secção I- **Lavandula** L. (*L. angustifolia*, *L. lanata* e *L. latifolia*); secção II- **Stoechas** Gingins (*L. luisieri*, *L. pedunculata*, *L. sampaioana*, *L. stoechas*, *L. viridis*); secção III- **Dentata** Suárez-Cervera & Seoane-Camba (*L. dentata*) e secção IV- **Pterostoechas** Gingins (*L. multifida*) (Suárez-Cervera & Seoane-Camba, 1986).

Para além das características morfológicas referidas, outros caracteres foram tidos em conta para esta classificação, nomeadamente caracteres carpológicos (Suárez-Cervera, 1987; *cit* em Zuzarte, 2007); cariológicos (Suárez-Cervera, 1986) e palinológicos (Suárez-Cervera, 1985; Suárez-Cervera & Seoane-Camba, 1985, 1987; todos *cit* em Suárez-Cervera & Seoane-Camba, 1986). Contudo, nestes trabalhos não foram considerados aspetos fitoquímicos, nomeadamente a composição química dos óleos essenciais. Este carácter só foi valorizado mais tarde nos estudos de Garcia-Vallejo (1992) *cit* em Zuzarte (2007), que realizou um ensaio sobre a quimiotaxonomia das *Lavandulas* Ibéricas. Neste trabalho, a autora pretendeu iniciar o estabelecimento da taxonomia do género baseando-se fundamentalmente na composição química dos óleos essenciais.

1.2.3- Importância económica

O género *Lavandula* é cultivado, em grande parte, devido ao seu teor em óleo essencial, que é extraído por destilação pelo vapor de água a partir dos ramos floridos das plantas. Várias espécies são também cultivadas para o comércio das flores frescas ou secas e muitas são plantas ornamentais, sendo bastante frequentes em jardins. *Lavandula angustifolia*, *L. x intermedia*, *L. latifolia* e *L. stoechas* são as 4 espécies mais valorizadas principalmente na indústria alimentar, perfumaria, cosmética e farmacêutica (Urwin & Mailer, 2008).

A elevada importância económica do género *Lavandula* deve-se principalmente aos óleos essenciais produzidos em tricomas glandulares. Tricomas glandulares são estruturas secretoras externas frequentemente presentes nas Lamiaceae onde se produzem e acumulam óleos essenciais. Há uma grande diversidade de tricomas que depende principalmente do número de células secretoras e comprimento da célula peduncular. Há também diferenças no que respeita à densidade e a sua localização na epiderme, bem como o tipo de secreção produzida (Vianna, 2009).

O género *Lavandula* produz valiosos óleos essenciais, principalmente para a indústria alimentar (aromatizante), perfumaria, cosmética, aromaterapia (Zuzarte *et al.*, 2011a) e o seu consumo pode atingir cerca de 1000 toneladas em algumas espécies (Brud, 2010). No entanto, muitas outras aplicações podem ser perspectivadas, como sugerido em vários trabalhos sobre a atividade biológica deste género. Os óleos de *Lavandula* têm sido relatados como tendo propriedades sedativas e antiespasmódicas, bem como tendo atividade acaricida, antibacteriana, antifúngica e antioxidante (Zuzarte *et al.*, 2011a). Mais recentemente foi também sugerido a aplicação dos óleos de *Lavandula* como biopesticidas (González-Coloma *et al.*, 2006).

1.2.4- Espécies nativas de Portugal

No que diz respeito a Portugal, estão identificadas cinco espécies: *L. pedunculata*, *L. viridis*, *L. latifolia*, *L. multifida* e *L. luisieri* (= *L. stoechas* subsp. *luisieri*)- Fig. 3 (Franco, 1984; Zuzarte, 2012). Neste trabalho, as espécies escolhidas foram *L. multifida* e *L. viridis* (Fig. 3A e Fig. 3D, respetivamente), por dois motivos principais: o primeiro prende-se com o facto de em *L. multifida* o rendimento dos óleos essenciais ser muito baixo e o segundo está ligado ao potencial interesse para futura exploração industrial, devido às propriedades

biológicas dos óleos essenciais, recentemente demonstradas nestas duas espécies (Zuzarte *et al.*, 2011a; 2011b; 2012).



Figura 3. Espécies do género *Lavandula*. A: *L. multifida*; B: *L. luisieri*; C: *L. latifolia*; D: *L. viridis*; E: *L. pedunculata* (Fonte: <http://www.flora-on.pt/#/1lavandula+multifida>)

1.2.5- *Lavandula multifida* L.

L. multifida é provavelmente a espécie mais conhecida e largamente cultivada da secção Pterostoechas. Esta espécie foi primeiramente descrita por Carolus Clusius (1526-1609) como *Lavandula multifido folio* em *Hispanias Observaturum Historia* publicada em 1576. O nome binomial atual da espécie foi dado por Lineu em 1753 (Upson & Andrews, 2004).

L. multifida é típica da região oeste Mediterrânea (Portugal, Espanha, Marrocos e Argélia, estendendo-se à Líbia, Itália, Egipto e ao norte do Sudão) - Fig. 4 (Upson, 2002).

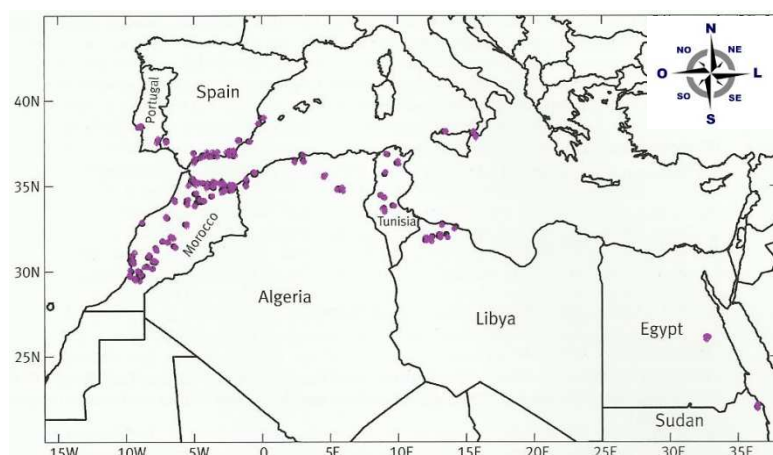


Figura 4. Distribuição de *Lavandula multifida* (adaptado de Upson & Andrews, 2004).

L. multifida (Fig. 5A) é um arbusto de base lenhosa com 30-50 cm. As folhas têm 3-6 cm (incluindo o pecíolo) x 15-30 mm, são ovadas, profundamente pinatissectas a bipinatissectas (Fig. 5B). Os caules têm tricomas brancos, simples e longos (por vezes só presentes perto da base) que cobrem os tricomas curtos ramificados (Figs. 5C, 5D). O pedúnculo da inflorescência é geralmente ramificado na base e a flor tem dimensões de 5-8 cm (Fig. 5E). Brácteas elípticas com ápice fortemente agudo, tipicamente com três nervos escuros \pm de igual comprimento do cálice (Fig. 5F). Lóbulo médio superior do cálice com uma forma distintamente deltóide. Corola bicolor (Fig. 5E), onde os lóbulos inferiores são de cor violeta a desvanecerem-se para azul-violeta dos lóbulos superiores, com diretrizes mais escuras (Upson, 2002).

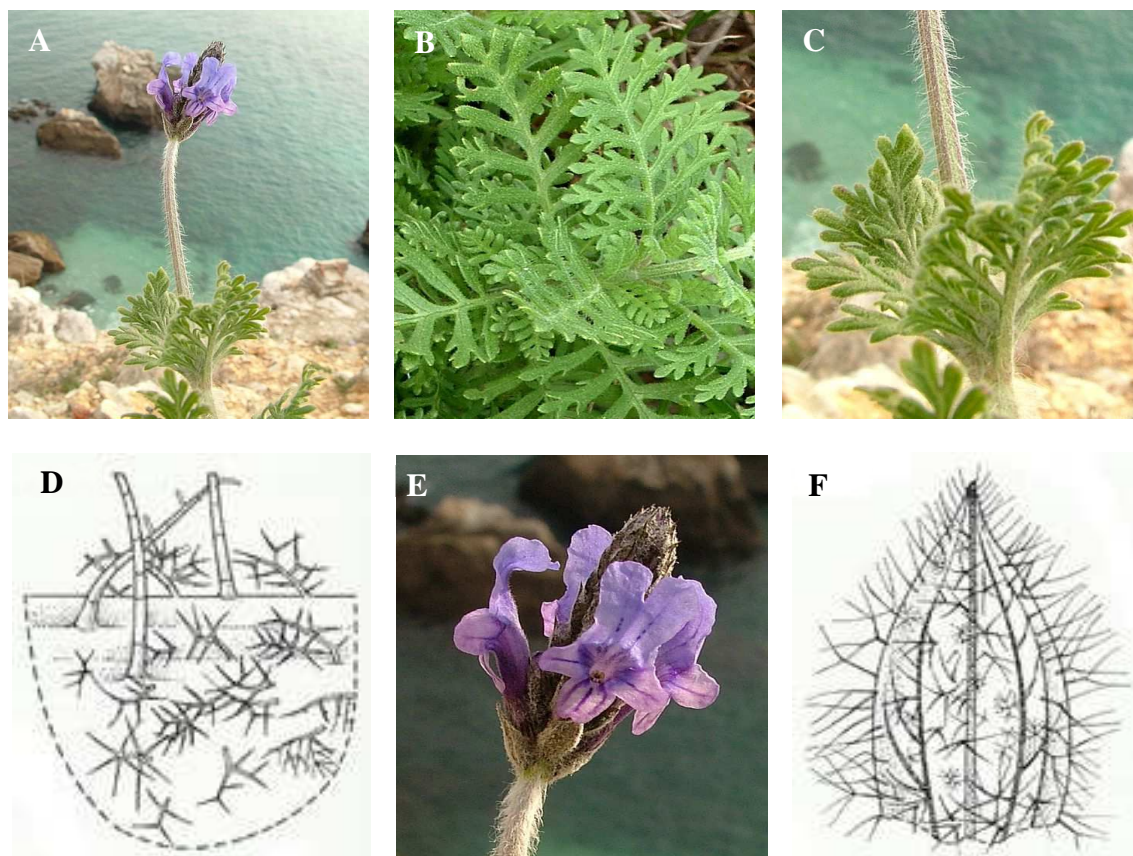


Figura 5. Diversos aspetos morfológicos de *L. multifida*- A: planta no seu habitat natural (Fonte: <http://www.flora-on.pt/#/1lavandula+multifida>); B: pormenor das folhas (Fonte: <http://www.flora-on.pt/#/1lavandula+multifida>); C: caule com os tricomas longos e curtos (<http://www.flora-on.pt/#/1lavandula+multifida>); D: pormenor da localização dos tricomas longos e curtos no caule (adaptado de Upson & Andrews, 2004); E: flor e corola bicolor

(Fonte: <http://www.flora-on.pt/#/1lavandula+multifida>); F: pormenor das brácteas (adaptado de Upson & Andrews, 2004).

Em termos de habitat, *L. multifida* é comum em matos subnitrófilos, em arribas litorais ou prados xerófilos. Encontra-se vulgarmente em substratos rochosos ou pedregosos básicos (preferencialmente calcários) mas também em siliciosos (xistos) em vertentes termófilas expostas a sul em altitudes que vão desde o nível do mar até 1500m (<http://www.flora-on.pt/#/1lavandula+multifida>).

O período de floração desta espécie é de fevereiro a abril e de outubro a novembro e o seu estado de conservação é pouco preocupante (Upson & Andrews, 2004).

No que toca à etnobotânica, *L. multifida* é cultivada como ornamental. Em Marrocos utilizam-se infusões de ramos floridos como antitússicos e na Líbia é usada no tratamento de várias doenças que afetam as crianças (Upson & Andrews, 2004).

O número de cromossomas tem vindo a ser utilizado como caracter taxonómico por diversos autores (Garcia, 1942 *cit* em Upson & Andrews, 2004; Buyukli, 1970 *cit* em Upson & Andrews, 2004; Suárez-Cervera, 1986). Na literatura, esta espécie está descrita como tendo $2n=24$ cromossomas (Upson & Andrews, 2004).

Estudos em SEM demonstraram que *L. multifida* tem um indumento foliar muito heterogéneo, relativamente aos tricomas ramificados não-glandulares e aos tricomas glandulares. Nesta espécie existem tricomas do tipo peltado, capitado tipo I, capitado tipo II e tricomas glandulares bifurcados. Um tipo misto de tricomas com características de tricomas glandulares e tricomas não glandulares (ramificados mistos) foi também reportado nesta espécie (Zuzarte, 2012).

Relativamente à composição química do óleo essencial de *L. multifida*, este caracteriza-se por apresentar elevados teores de monoterpenos, sendo carvacrol e *cis*- β -ocimeno os constituintes maioritários (Zuzarte *et al.*, 2011b).

1.2.6- *Lavandula viridis* L'Hér L.

A primeira referência a *Lavandula viridis* data de 1651 (Bauhin & Cherler, 1651 *cit* em Upson & Andrews, 2004). Muitos autores pré-Lineanos reconheciam esta espécie, porém, o próprio Lineu (1753), não a conhecia e também não foi referida na primeira monografia *Lavandula* (Ludmark, 1780 *cit* em Upson & Andrews, 2004). No período pós-Lineu, um botânico amador francês - Charles-Louis L'Héritier de Brutelle (1746-1800) - descreveu pela

primeira vez esta espécie baseando-se em material colhido na Ilha da Madeira por Francis Masson (Upson & Andrews, 2004).

É indiscutível que *L. viridis* é nativa do sudoeste de Espanha e de alguns locais do sudeste português, em altitudes bastante baixas (Fig. 6). Contudo, continua por esclarecer se *L. viridis* é nativa ou foi introduzida na Madeira (Upson & Andrews, 2004).

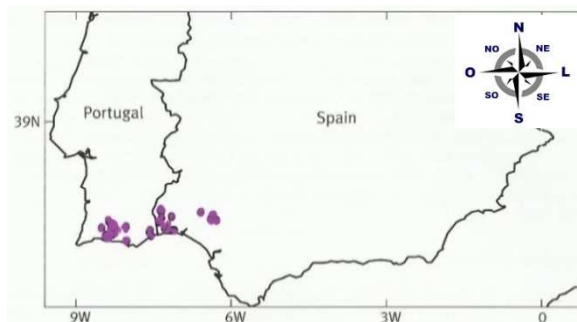


Figura 6. Distribuição de *Lavandula viridis* (adaptado de Upson & Andrews, 2004).

L. viridis é um arbusto lenhoso de 30-50 cm (Fig. 7A). As folhas amplamente linear-lanceoladas, de coloração verde (Figs. 7B-C), apresentam um distintivo e denso indumento glandular (Fig. 7D), que lhes confere uma sensação pegajosa, com um cheiro forte semelhante a limão. A inflorescência é uma espiga- tipo de cacho com flores sem pedúnculo, até 8 cm (Fig. 7E). Brácteas obovadas ou amplamente ovadas, ápice acuminado, margens frequentemente crenuladas, 1-1,2 x 0.9-1,2 cm, brancas-esverdeadas (Fig. 7F) (Upson, 2002).

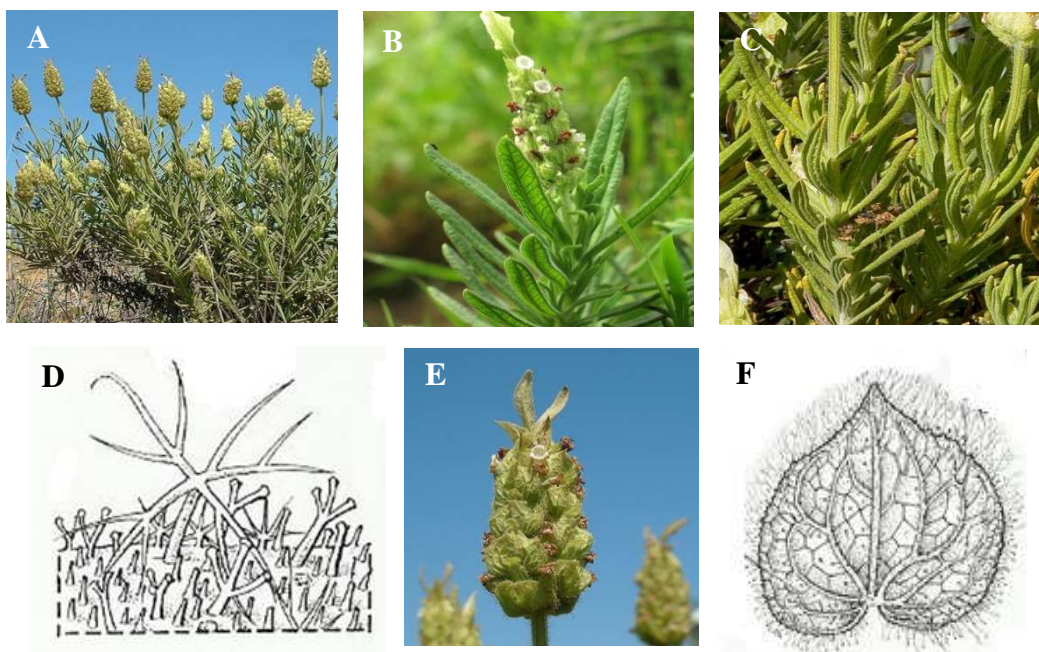


Figura 7: Morfologia de *L. viridis*- A: planta no seu habitat natural (Fonte: <http://www.flora-on.pt/#/lavandula+viridis>); B: pormenor das folhas e da inflorescência (Fonte: <http://www.flora-on.pt/#/lavandula+viridis>); C: pormenor das folhas (Fonte: <http://www.flora-on.pt/#/lavandula+viridis>); D: pormenor da localização dos tricomas no caule (adaptado de Upson & Andrews, 2004); E: flor (Fonte: <http://www.flora-on.pt/#/lavandula+viridis>); F: pormenor das brácteas (adaptado de Upson & Andrews, 2004).

Em termos de habitat, *L. viridis* encontra-se em matos (estevais, urzais) na orla ou sob coberto de sobreirais, carvalhais, azinhais, medronhais ou pinhais; geralmente em vertentes ou barrancos sombrios, em substratos ácidos pedregosos (xistos, sienitos, raramente arenitos) (<http://www.flora-on.pt/#/lavandula+viridis>).

O período de floração desta espécie na natureza é entre março e junho e o seu estado de conservação é de pouco preocupante em Espanha e Portugal. (Upson & Andrews, 2004).

No que toca à etnobotânica, *L. viridis* é cultivada como ornamental. Na Ilha da Madeira utilizam-se as folhas secas como planta medicinal e também pode ser utilizada como aromatizante dos alimentos (Upson & Andrews, 2004).

A guarnição cromossómica desta espécie está indicada na literatura como $2n=30$ cromossomas (Upson & Andrews, 2004).

Recentemente têm sido efetuados estudos em *L. viridis*, particularmente nos seus óleos essenciais, que demonstram o seu enorme potencial como agente antifúngico. O óleo essencial desta espécie é caracterizado por um elevado teor de monoterpenos oxigenados, sendo o principal constituinte 1,8-cineol (Zuzarte *et al.*, 2011a).

Adicionalmente, estudos realizados em SEM demonstraram que *L. viridis* tem um indumento foliar muito heterogéneo, relativamente aos tricomas glandulares. Nesta espécie existem tricomas do tipo peltado, capitado tipo I, capitado tipo II e tricomas glandulares bifurcados (Zuzarte, 2012).

1.3- Óleos essenciais

1.3.1- Considerações gerais

Os óleos essenciais, também conhecidos como essências ou óleos voláteis, são produtos naturais formados por vários compostos voláteis, principalmente compostos

terpênicos. Segundo a International Standard Organization on Essential Oils (ISO TC - ISO 9235, 1997 *cit* em Zuzarte, 2012) e a Farmacopeia Europeia (Conselho da Europa, 2007 *cit* em Zuzarte, 2012), um óleo essencial é definido como o produto obtido a partir de matéria-prima vegetal por hidrodestilação, destilação a vapor ou destilação seca ou por um processo mecânico apropriado sem aquecimento (para frutos cítricos). Esta definição exclui outros produtos aromáticos/ voláteis obtidos por diferentes técnicas extrativas, como a extração com solventes, extração com fluido supercrítico e com corpos gordos (Zuzarte, 2012).

Os óleos essenciais estão presentes em todo o reino vegetal, criptogâmicas e fanerogâmicas, podendo ser encontrados na maioria dos órgãos vegetais, nomeadamente, raízes, rizomas, caules, cascas, folhas, flores (mais frequentemente nas inflorescências), frutos, sementes, sendo produzidos em estruturas secretoras especializadas (externas e internas) ou resultando da hidrólise de heterósidos (Bruneton, 1991).

Durante muito tempo, estes compostos foram considerados meros catabolitos do metabolismo vegetal. Atualmente sabe-se que desempenham funções ecofisiológicas de extrema importância, que foram determinantes ao longo da evolução das espécies aromáticas. Por outro lado, os óleos essenciais são também responsáveis por várias características da própria planta, que, desde muito cedo, despertaram o interesse do Homem, constituindo, por isso, a matéria-prima de numerosas indústrias. Destaca-se, por exemplo, o seu uso na indústria farmacêutica devido às diversas propriedades biológicas que lhes são atribuídas (Edris, 2007).

Sendo considerada uma resposta ecológica comum a todas as espécies aromáticas vegetais, a libertação de compostos voláteis pelos órgãos vegetativos e reprodutores da planta tem por objetivo a dissuasão a ataques de fitófagos ou a atração de predadores naturais desses fitófagos, a defesa contra agentes patogénicos como fungos e bactérias, a atração de insetos auxiliares quer na polinização quer na dispersão de sementes e efeitos alelopáticos inibindo a germinação de plantas próximas. Desempenham também um importante papel na economia hídrica das plantas, contribuindo para a regulação da evapotranspiração ao saturarem o ambiente envolvente dos estomas, regulando igualmente a temperatura interna da planta por reflexão das radiações, proporcionada pelas propriedades das secreções de aumentarem o brilho da superfície foliar (Lima, 2009).

1.3.2- Estruturas secretoras

A síntese e acumulação dos óleos essenciais estão geralmente associadas à presença de estruturas secretoras especializadas que se podem localizar à superfície da planta, como os tricomas secretores e osmóforos ou no interior de tecidos vegetais, como os idioblastos, canais e bolsas (Bruneton, 1991).

O tipo e a localização das estruturas secretoras são normalmente característicos da família a que pertencem, o que poderá ser muito útil na identificação da autenticidade do material vegetal (Craker, 1990; *cit* em Salgueiro, 1994).

A estrutura secretora mais simples consiste numa célula isolada, que se distingue das células parenquimatosas que a rodeiam, por ser maior, apresentar gotas de essência no citoplasma e possuir uma cutícula mais espessa. Os osmóforos são áreas do tecido floral com células secretoras, estruturalmente diferentes das células adjacentes. Existem também cavidades secretoras, mais ou menos esféricas, resultantes do afastamento das células do parênquima ao longo da lamela média (processo esquizogénico) ou da desintegração dessas células (processo lisogénico). Estas cavidades são delineadas por uma camada secretora, sendo por vezes preenchidas com células de parede fina que também armazenam óleos essenciais produzidos nos seus plastídeos. Várias cavidades alongadas constituem os canais secretores que podem ramificar e formar uma rede desde o caule da planta até às folhas, flores e frutos. As cavidades secretoras são formadas por uma camada epitelial que rodeia uma cavidade central. Os óleos essenciais são biossintetizados nos leucoplastos das células secretoras da camada epitelial e movem-se para a cavidade central via retículo endoplasmático (Svoboda *et al.*, 2000 *cit* em Zuzarte, 2007).

Muito frequentemente, os óleos essenciais localizam-se em tecidos secretores epidérmicos denominados tricomas glandulares. Estes têm origem numa célula da protoderme, que se distingue das células vizinhas por ser mais volumosa, apresentar um núcleo hiperatrofiado e um citoplasma muito denso (Werker *et al.*, 1985 *cit* em Zuzarte, 2007).

Os tricomas podem ser peltados ou capitados e encontram-se nos caules, folhas e em algumas partes florais, como por exemplo, no cálice das Lamiaceae. Os tricomas peltados são formados por uma célula basal, um pedículo curto e uma cabeça com células secretoras organizadas numa ou mais camadas. Os tricomas capitados são constituídos por uma célula basal, um pedículo comprido, uni ou pluricelular e uma cabeça formada por uma ou duas células (Werker *et al.*, 1985 *cit* em Zuzarte, 2007).

Nas Lamiaceae, em particular, têm sido realizados diversos estudos de caracterização das estruturas secretoras (ex. Ascensão *et al.*, 1995, 1999; Antunes *et al.*, 2004; Marin *et al.*, 2006; Zuzarte, 2007; 2010; 2012).

No entanto, atendendo às espécies *L. multifida* e *L. viridis* os estudos são mais escassos, destacando-se os trabalhos de Zuzarte, 2012.

1.3.3- Composição química

Quase todos os óleos essenciais são extremamente complexos na sua composição, sendo constituídos por uma grande variedade de compostos químicos com diferentes grupos funcionais, pertencentes a diferentes classes químicas. Os terpenóides são os constituintes predominantes dos óleos essenciais, contudo muitos óleos são também compostos por fenilpropanóides (Sangwan *et al.*, 2001).

Os terpenos resultam da condensação de uma unidade pentacarbonada (isopreno) e por isso são designados muitas vezes de isoprenóides. Estes compostos formados por unidades isoprénicas (C_5H_8), são classificados de acordo com o número de unidades que os constituem em: hemiterpenos (uma unidade), monoterpenos (duas unidades), sesquiterpenos (três unidades), diterpenos (quatro unidades) e outros. Os monoterpenos ($C_{10}H_{16}$) e os sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$) são os terpenos mais frequentes nos óleos essenciais, podendo ocorrer na forma acíclica, monocíclica, bicíclica ou tricíclica, quer como hidrocarbonetos quer na forma de derivados funcionais oxigenados, como álcoois, éteres, aldeídos, cetonas, ésteres e fenóis (Proença da Cunha *et al.*, 2005).

Como se pode observar na figura 8, nas plantas vasculares os terpenos são biossintetizados através de duas vias: a via dependente do mevalonato (MVA) e a via independente do mevalonato, também chamada via do 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato/1- deoxi-D-xilulose-5-fosfato (MEP/DOXP) (Bouwmeester, 2006). A primeira tem lugar no citosol, enquanto a segunda ocorre nos cloroplastos (Sangwan *et al.*, 2001).

Os fenilpropanóides são sintetizados pela via do ácido chiquímico, sendo os seus principais precursores o ácido cinâmico e o ácido *p*-hidroxicinâmico, originados a partir dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, respetivamente (Sangwan *et al.*, 2001).

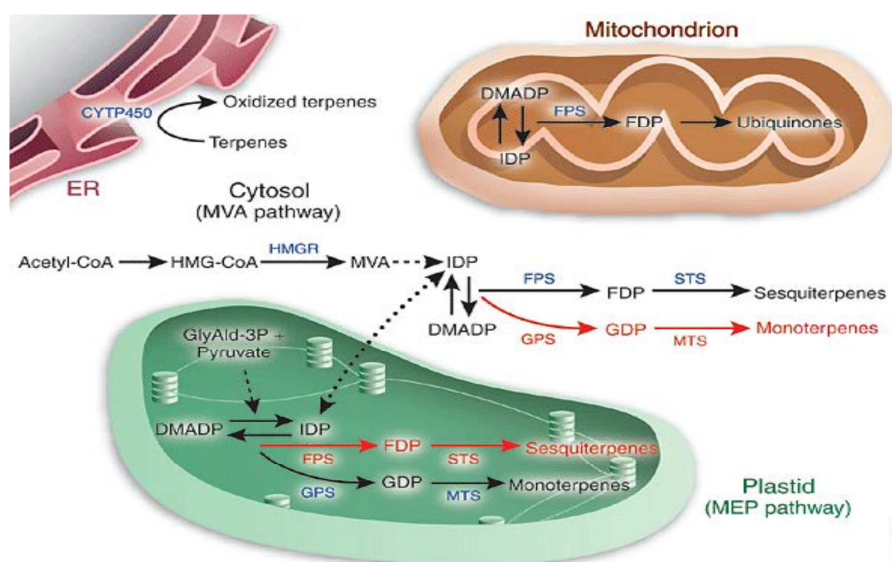


Figura 8. Biossíntese dos terpenos nas plantas. As setas contínuas e tracejadas representam passos enzimáticos simples e múltiplos, respetivamente. DMADP- dimetilalil difosfato; FDP- farnesilo difosfato; GDP- geranyl difosfato; GlyAld-3P- gliceraldeído-3-fosfato; HMG-CoA- hidroximetilglutaril-CoA; IDP- isopentenil difosfato; MVA- ácido mevalônico; MEP- metilo eritritol fosfato; CYTP450- hidroxilase do citocromo P450; FPS- FDP sintase; GPS- GDP sintase PIB; HMGR- HMG-CoA redutase; MTS- monoterpene sintase; STS- sesquiterpene sintase (Bouwmeester, 2006).

1.4- Biotecnologia Vegetal

1.4.1- Breve resenha histórica

A Biotecnologia Vegetal é um conjunto de metodologias de base biológica que permitem manipular as plantas com objetivos específicos. Ao longo do tempo, nesta área, podem assinalar-se marcos importantes, que de formar inequívoca contribuíram para este avanço. Assim, pode dividir-se esta retrospectiva histórica em três períodos: período observacional, período da cultura *in vitro* e período da biologia molecular (Canhoto, 2010).

O período observacional inicia-se com o estabelecimento da teoria celular por Schwann e Schleiden (1838-1939) cit em Canhoto (2010) até à obtenção das primeiras culturas *in vitro* de forma indefinida por White, Gautheret e Nobécourt em 1939 cit em Canhoto (2010). Neste período foram feitas descobertas que são fundamentais para o que hoje é a Biotecnologia Vegetal, tais como os contributos de Darwin com a sua teoria da evolução e

os seus estudos da floração, seleção artificial e dos movimentos das plantas através dos seus ensaios sobre o fototropismo, o estabelecimento das leis da hereditariedade de Mendel (1865) *cit* em Canhoto (2010), os ensaios do estabelecimento de culturas *in vitro* de Haberlandt (séc.XX) *cit* em Canhoto (2010) e a descoberta de Went (1926) *cit* em Canhoto (2010) que a auxina (mais tarde identificada como IAA) promovia divisões celulares em tecidos vegetais. O período da cultura *in vitro* é caracterizado por enormes progressos em aspetos da cultura *in vitro* de plantas. Foi nesta fase que se comprovou a importância de vários elementos minerais para as plantas, tendo surgido formulações nutritivas que ainda hoje são bastante utilizadas na cultura de células vegetais, sendo a mais conhecida elaborada por Murashige e Skoog (meio de cultura MS, 1962). Este período também ficou marcado pela propagação de plantas através da cultura de meristemas (Morel, década de 50), a obtenção de embriões a partir da cultura de células somáticas, o que demonstrou de forma evidente a totipotência das células vegetais (Steward *et al.*, 1958 *cit* em Canhoto, 2010; Reinert, 1958 *cit* em Canhoto, 2010). Por fim, o terceiro período- o da biologia molecular- inicia-se em meados dos anos 80 e vai até à atualidade. É caracterizado pela obtenção de plantas geneticamente modificadas utilizando um veículo natural- *Agrobacterium tumefaciens* (Canhoto, 2010).

1.4.2- Cultura *in vitro* - considerações gerais

Como já foi referido, a cultura *in vitro* de plantas teve início com os trabalhos de Haberlandt e sofreu um forte impulso com a descoberta das auxinas, a que se seguiu a descoberta de outros grupos de hormonas vegetais. Pode definir-se cultura *in vitro* como o estabelecimento e manutenção, em condições laboratoriais, de células, tecidos, órgãos vegetais, plantas ou massas de células, vulgarmente designadas por calos (*callus*). Estas culturas são mantidas em condições assépticas, para evitar a contaminação por microrganismos e são utilizadas com diversas finalidades, por exemplo a produção de metabolitos secundários (Chawla, 2010).

A cultura *in vitro* engloba um conjunto de procedimentos experimentais que podem ser utilizados, entre outros objetivos, para a micropropagação de plantas.

No processo de micropropagação o explante é removido da planta e colocado num meio de cultura artificial, sólido ou líquido, formado por água, uma fonte de carbono, nomeadamente sacarose ou glucose, macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, inositol e reguladores de crescimento (Chawla, 2010).

A micropropagação engloba um conjunto de três técnicas diferentes que variam entre si no tipo de explante utilizado e na resposta obtida. Essas técnicas são a proliferação de meristemas existentes no explante original, a formação de embriões somáticos e a indução de organogênese (Canhoto, 2010).

O primeiro método baseia-se na utilização de meristemas que em cultura proliferam e originam rebentos caulinares. Muitos autores atribuem a designação de micropropagação a este procedimento. As fases que compõem este procedimento estão esquematizadas na figura 9.

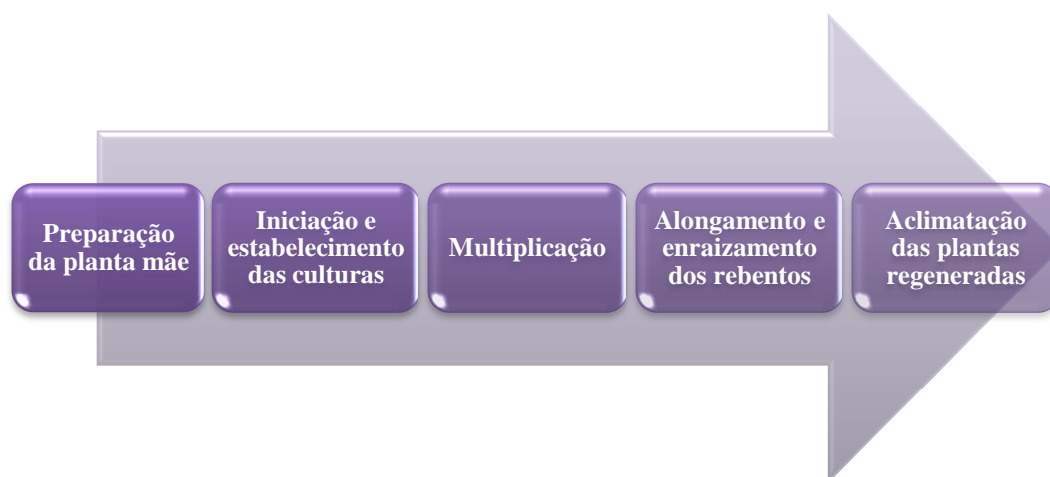


Figura 9. Fases de um ciclo completo do método de micropropagação por proliferação de meristemas.

A embriogênese somática e a organogênese são, também, técnicas de micropropagação usadas na clonagem de plantas, mas em que as estruturas formadas são induzidas *de novo*. No caso da embriogênese somática são formadas estruturas bipolares semelhantes aos embriões zigóticos e designados embriões somáticos, enquanto no caso da organogênese se formam estruturas unipolares resultantes da diferenciação de um novo meristema (Chawla, 2010).

1.4.3- Poliploidia e sua indução *in vitro*

A poliploidia é comum e tem desempenhado um papel importante na evolução das plantas com flor, sendo que a poliploidia natural está presente na família Lamiaceae, como por exemplo em *Glechoma*, *Lavandula* e *Thymus* (Urwin *et al.*, 2007).

Esta poliploidia natural pode ocorrer por duplicação somática dos cromossomas ou por produção funcional de gâmetas diplóides, devido a aberrações no processo meiótico-poliploidização sexual (Camadro & Peloquin, 1980).

Para além deste aspeto, o aparecimento de poliplóides pode ocorrer via autoploidia (vários conjuntos de cromossomas provenientes da mesma espécie) (Lyrene *et al.*, 2003), ou via aloploidia, a partir da formação de híbridos intraespecíficos ou inter-genéricos resultantes da duplicação dos dois genomas presentes no híbrido (Olsen *et al.*, 2006).

Apesar da grande relevância em termos do nível evolutivo, a frequência com que surgem poliplóides na natureza é baixa, comparando com a rapidez associada às técnicas de melhoramento vegetal. Assim, é de suma importância o desenvolvimento de metodologias e protocolos eficientes para a indução da duplicação cromossómica em condições artificiais e controladas (Petersen *et al.*, 2003).

Estas metodologias baseiam-se maioritariamente na exposição de tecidos cultivados *in vitro* a agentes c-mitóticos e têm sido usados com sucesso na indução de plantas tetraplóides (Antunes, 2010).

No que diz respeito às poliploidizações, as plantas tetraplóides são aquelas que, em termos agronómicos, são as mais importantes, pois em horticultura, os tetraplóides geram muitas vezes variantes que podem possuir características hortícolas e/ou ornamentais melhoradas (Vainola, 2000; Shao *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2006). Na produção de metabolitos secundários, a variação da ploidia tem impacto no rendimento da produção destes metabolitos, em culturas *in vitro* (Faizal *et al.*, 2013).

Os fatores que influenciam a taxa de produção de tetraplóides *in vitro* são o genótipo (Petersen *et al.*, 2003), o tipo e nível de desenvolvimento do explante e o tipo, modo de aplicação, concentração e tempo de exposição ao agente c-mitótico (Chauvin *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2006; Dhooghe *et al.*, 2009).

Em termos de tipo de material vegetal, podem ser usados segmentos nodais (Escandón *et al.*, 2005), rebentos (Zhang *et al.*, 2008), sementes (Urwin *et al.*, 2007), tecido caloso (Petersen *et al.*, 2002) e embriões somáticos desenvolvidos a partir de um embrião zigótico imaturo (e.g., Yang *et al.*, 2006).

Os agentes c-mitóticos ligam-se geralmente à tubulina, inibindo deste modo a sua polimerização e conseqüente formação de microtúbulos e a migração polar dos cromossomas durante a divisão celular (Petersen *et al.*, 2002). No entanto, este efeito é reversível e, se as concentrações dos agentes mitóticos forem adequadas, não causa a morte celular, o que permite às células sofrerem mitoses normais quando o composto utilizado é removido.

Ao impedirem a formação do fuso acromático durante a divisão celular, os agentes c-mitóticos permitem a replicação do DNA, contudo a separação dos cromossomas em dois núcleos filhos não ocorre (Olsen *et al.*, 2006), fazendo com as células fiquem com o dobro da guarnição cromossômica.

Por outro lado, a concentração dos agentes c-mitóticos pode, para além de afetar a taxa de duplicação cromossômica, resultar em efeitos tóxicos que, conseqüentemente, reduzam o número de explantes sobreviventes. Portanto, no tratamento, é requerido um compromisso entre os eventuais efeitos tóxicos e os de duplicação cromossômica (Yang *et al.*, 2006).

A colquicina é um dos agentes c-mitóticos mais utilizados devido às elevadas taxas de sucesso obtidas num número elevado de espécies vegetais, sendo um alcalóide extraído de *Colchicum autumnale* (Petersen *et al.*, 2002).

A duplicação cromossômica usando colquicina tem vindo a ser utilizada nos programas de melhoramento de plantas. O resultado são plantas poliplóides que muitas vezes têm folhas, flores, frutos e sementes mais desenvolvidas do que os exemplares diplóides. Além disso, o cruzamento de plantas tetraplóides com diplóides permite obter triplóides que por vezes formam frutos partenocárpicos (Shao *et al.*, 2003; Escandón *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008).

Entre os fatores fundamentais a testar e otimizar aquando da aplicação de agentes c-mitóticos a uma nova espécie vegetal, encontram-se a concentração e o tempo ótimos de exposição ao agente c-mitótico para que haja um compromisso ideal entre a taxa de indução de poliplóides e a sobrevivência dos explantes. A colquicina tem uma baixa afinidade para as tubulinas das plantas, o que torna necessária a sua aplicação em concentrações mais elevadas, na ordem do milimolares. Este facto leva a níveis mais elevados de toxicidade quer no imediato (senescência do material) quer *à posteriori* na regeneração de rebentos *in vitro* (Caperta *et al.*, 2006).

O tipo de cultura e o modo de contacto com o agente c-mitótico também têm de ser tidos em conta.

A indução de poliploidia *in vitro* através destes agentes pode gerar, para além de tetraplóides puros, um dado número de mixoplóides (ou seja, tecidos quiméricos constituídos quer por células diplóides quer por células tetraplóides). A eventual ocorrência de um grande número de mixoplóides deve-se, principalmente, ao tipo de tecido usado (Vainola, 2000).

O próprio agente utilizado também influencia o número de quimeras, existindo algumas evidências de que possam ser em número maior para a colquicina do que para os

outros agentes c-mitóticos (Shao *et al.*, 2003). Outros efeitos colaterais indesejados incluem mutações genómicas, aneuploidia, seleção intrassómica, entre outros (Petersen *et al.*, 2002).

Uma vez que a indução da poliploidia *in vitro* não é completamente eficiente, ou seja, nas culturas existirá um certo número de plântulas diplóides, outro de tetraplóides e de mixoplóides, é necessário uma monitorização eficaz do nível de ploidia das plântulas que foram sujeitas a tratamento (Chauvin *et al.*, 2003). Desta forma, podemos selecionar as plântulas com o nível de ploidia desejado.

O nível de ploidia pode ser determinado por vários processos. Um deles é através da observação e contagem do número de cloroplastos, presentes nas células estomáticas, a sua densidade e o seu tamanho. Outro é através da contagem do número de cromossomas em células em metafase. Também se pode determinar o nível de ploidia por análise do teor em DNA através da citometria de fluxo (Yang *et al.*, 2006; Urwin *et al.*, 2007).

Apesar de conceptualmente simples e pouco dispendiosa (Kadota & Niimi, 2002 *cit* em Antunes, 2010), a análise dos estomas é atualmente considerada uma metodologia pouco fiável uma vez que as condições ambientais e a idade da plântula podem condicionar os resultados (Roy *et al.*, 2001 *cit* em Antunes, 2010). No que diz respeito à contagem do número de cromossomas, a fiabilidade do método está inteiramente dependente do tamanho (menos fiável quanto mais pequenos) e número de cromossomas (menos fiável quanto maior o número de cromossomas) por célula em metafase. É uma metodologia igualmente dependente da presença de células em divisão (habitualmente são usadas células do ápice de raízes jovens; Yang *et al.*, 2006) e bastante morosa (Dhooghe *et al.*, 2009).

Por sua vez, a citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades óticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem numa suspensão líquida e que foram previamente tratadas com um fluorocromo que se liga estequiometricamente ao DNA. Comparativamente aos métodos enunciados acima, a citometria de fluxo apresenta as seguintes vantagens: é mais conveniente (a preparação da amostra é fácil), rápida (processamento de dezenas de amostras num único dia de trabalho), não necessita de células em divisão, é uma metodologia não destrutiva (uma amostra pode ser preparada a partir de apenas 50 mg de tecido foliar) e é capaz de detetar mixoploidias (Loureiro, 2007).

De qualquer das formas, é boa prática confirmar os resultados obtidos por contagem dos cromossomas e de cloroplastos num número mínimo de plântulas (Antunes, 2010).

1.4.4- Melhoramento vegetal em *Lavandula* spp.

Os metabolitos resultantes das espécies de *Lavandula* podem ser obtidos a partir de plantas selvagens ou a partir de plantas cultivadas. No entanto, por razões ambientais, a colheita de grandes quantidades de plantas a crescer espontaneamente deve ser evitada, uma vez que pode ameaçar a continuidade das espécies e reduzir a sua biodiversidade. Nesse sentido, a atenção deve ser deslocada para o desenvolvimento de protocolos eficazes para a propagação de plantas, a fim de produzir elevadas quantidades de planta a partir das quais os produtos de interesse, como por exemplo os óleos essenciais, possam ser extraídos, impedindo assim a exploração das populações selvagens (Zuzarte *et al.*, 2010).

Os métodos utilizados na cultura *in vitro* são, portanto, uma excelente solução. Estas metodologias permitem, com grande êxito, obter plantas com uma melhor qualidade fitossanitária, a criação de variabilidade genética, útil na seleção de variedades melhoradas e o armazenamento de germoplasma (Brown & Thorpe, 1995).

Entre estes procedimentos alternativos destacam-se a micropropagação, a transformação, a criopreservação e a indução de haploidia ou poliploidia, técnicas/metodologias inseridas na área da Biotecnologia Vegetal.

No que toca ao género *Lavandula*, têm sido realizados estudos nesta área, nomeadamente na micropropagação (mais especificamente na regeneração *in vitro* de algumas espécies a partir da cultura de segmentos nodais ou através da regeneração a partir de calos). Foram realizados ensaios em *L. angustifolia* (Al-Bakhit *et al.*, 2007; Machado, 2011; Bona *et al.*, 2012), em *L. latifolia* (Calvo & Segura, 1989; Al-Bakhit *et al.*, 2007), em *L. vera* (Tsuru *et al.*, 1999), em *L. viridis* (Dias *et al.*, 2002; Nogueira & Romano, 2002) e em *L. pedunculata* (Zuzarte, 2007; 2010). Os resultados obtidos têm mostrado que a micropropagação das diferentes espécies do género *Lavandula* requer condições específicas para cada *taxon* em estudo.

Relativamente à composição química dos óleos essenciais de plantas regeneradas *in vitro* existem trabalhos em *L. viridis* (Nogueira & Romano, 2002) e em *L. pedunculata* (Zuzarte, 2007; 2010).

Estudos anteriores da indução de poliploidia nas espécies alvo deste trabalho não são conhecidos. No entanto, a indução de poliploidia no género *Lavandula* foi referida em *L. angustifolia* (Urwin *et al.*, 2007) e em *L. vera* (Raev *et al.*, 1996).

1.5 – Contextualização do trabalho e objetivos

O laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, juntamente com o laboratório Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, nos últimos anos, têm dedicado parte da sua atividade à valorização das lavândulas portuguesas, incluindo *L. multifida* e *L. viridis*, espécies alvo deste trabalho.

Apesar do reconhecido valor económico das lavândulas, até ao momento, foram desenvolvidos poucos esforços para o melhoramento vegetal nas duas espécies acima mencionadas, com as plantas cultivadas a diferirem muito pouco das que se encontram no estado selvagem, apresentando por isso produções limitadas qualitativa e quantitativamente em óleos essenciais.

Com este propósito o principal objetivo deste trabalho foi a propagação *in vitro* e poliploidização das espécies *L. multifida* e *L. viridis*, com vista a uma melhor produção de óleos essenciais, quer quantitativamente quer qualitativamente. Para tal foram utilizadas técnicas de micropropagação, bem como protocolos de alteração do número de ploidia.

Para a concretização deste objetivo geral foram delineadas as seguintes tarefas:

1- Multiplicação de culturas *in vitro* de forma a manter uma coleção de laboratório, minimizando as colheitas nas populações selvagens.

2- Indução de poliploidia nas duas espécies alvo de forma a aumentar o rendimento na produção de óleos essenciais. Para a concretização deste objetivo, os explantes de *L. multifida* e *L. viridis* foram expostos à ação da colquicina, a fim de induzir poliploidia.

3- Obtenção de plantas selecionadas enraizadas e aclimatadas para posterior transferência para condições *ex vitro* e análise dos respetivos óleos essenciais.

4- Indução de embriogénese somática em *Lavandula multifida*. A embriogénese somática tem um grande potencial, contudo não é muito recorrente no género *Lavandula*. Assim, pretendeu-se implementar esta técnica, através da otimização de procedimentos que levem à indução de embriões somáticos neste género. Para isso, foram utilizados explantes foliares de *L. multifida* e testados vários meios de cultura com diferentes concentrações de auxinas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS



2.1- Material Vegetal

Nos ensaios efetuados foram utilizados como explantes material vegetal proveniente de plântulas de *L. multifida* e *L. viridis*, já estabelecidas em culturas *in vitro*. Por sua vez, as plântulas de *L. multifida* foram obtidas a partir de exemplares colhidos em Sesimbra, junto ao Castelo e *L. viridis* colhida na Serra do Caldeirão, na zona de Barranco do Velho, em trabalhos anteriores.

2.2- Proliferação de meristemas axilares

Segmentos nodais de *L. multifida* e *L. viridis* obtidos de plântulas estabelecidas *in vitro*, foram sub-cultivados em tubos de ensaio contendo meio MS, suplementado com 30 g/L de sacarose (Tabela I), sob condições assépticas, com o objetivo de manter as culturas já existentes e obter material suficiente para os ensaios que se realizaram neste trabalho. O procedimento adotado está resumido no esquema da figura 10. O pH foi ajustado a 5,6-5,8 e, após a adição de 6 g/L de agar, procedeu-se à esterilização por autoclavagem a 120°C, 1,1 atm, durante aproximadamente 20 minutos.

Tabela I. Composição do meio de cultura MS

Macronutrientes	(mg/L)
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
H ₃ BO ₃	6.20
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025
Fonte de ferro (FeEDTA)	
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8

Compostos orgânicos	
Glicina	2.0
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina H-Cl (vit. B ₆)	0.5
Tiamina H-Cl (vit. B ₁)	0.1
Mioinositol	100

A cultura foi mantida (com repicagens de 2 em 2 meses) numa câmara de crescimento com temperatura de 24°C ± 1°C e com fotoperíodo de 16h luz/8h escuro. Os rebentos obtidos constituíram o material vegetal utilizado nos ensaios posteriores.

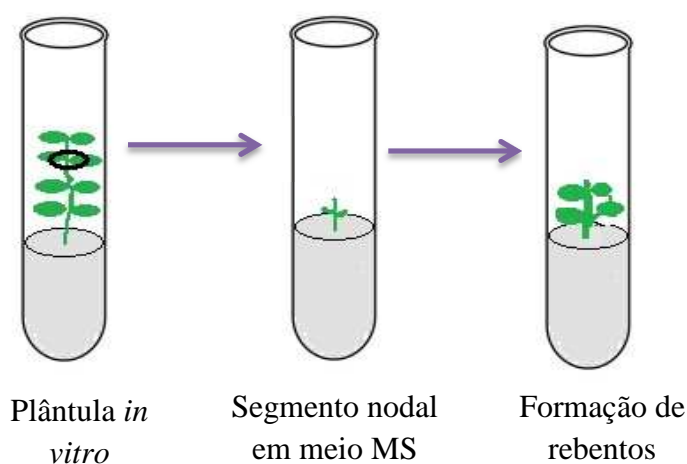


Figura 10. Representação esquemática da proliferação de meristemas axilares.

2.3- Indução da poliploidia

Segmentos nodais de *L. multifida* e *L. viridis* foram isolados de plântulas *in vitro* e colocados em Erlenmeyers de 100 mL contendo 50 mL de meio MS, com os macronutrientes reduzidos a metade e com 125mg/L de colquicina (Sigma) e 1% de DMSO (Panreac). A colquicina foi previamente dissolvida em água destilada antes da sua adição ao meio de cultura. Para cada espécie foram inoculados um total de 60 nós, 30 em meio de cultura com colquicina (grupo T- tratamento) e os restantes 30 nós em meio sem colquicina (grupo C- controlo). Os Erlenmeyers foram colocados numa estufa a 24°C com agitação, no escuro. O procedimento adotado está resumido no esquema da figura 11.

Após 6 dias, os explantes das duas espécies de *Lavandula* foram retirados da estufa e lavados com água destilada esterilizada. Seguidamente foram inoculados em tubos de ensaio com meio MS suplementado com 0,2mg/L de BAP e colocados em câmaras de crescimento a $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com um fotoperíodo de 16h luz/8h escuro.

O nível de ploidia das plântulas obtidas foi posteriormente monitorizado por citometria de fluxo (secção 2.4.2), por observações em SEM (secção 2.4.4), por contagem do número de cloroplastos nas células guarda dos estomas (secção 2.7) e por observação do cariótipo de plântulas (secção 2.4.3).

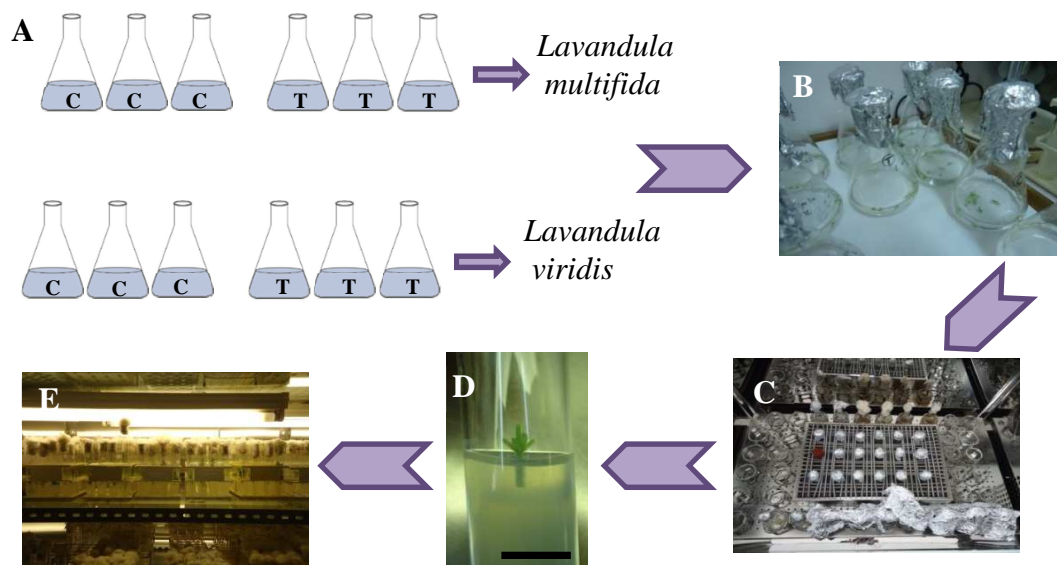


Figura 11. Representação esquemática da metodologia utilizada na indução de poliploidia. A: meio de cultura com colquicina (T- tratamento) e meio de cultura sem colquicina (C- controlo); B: nós de *L. multifida* e *L. viridis* em meio tratamento e meio controlo; C: estufa de agitação; D: tubo de ensaio com explante em meio MS suplementado com BAP; E: câmara de crescimento. Barra=1 cm.

2.4- Monitorização das culturas

2.4.1 – Observação dos níveis de desenvolvimento e sobrevivência

Após a exposição ao agente c-mitótico (colquicina), os explantes foram mantidos em cultura durante 2-3 meses. Nesse período, procedeu-se à observação do grau de desenvolvimento das plântulas e de eventuais alterações morfológicas. O número de explantes

que não se desenvolveram no decorrer da cultura ou que acabaram por não sobreviver à colquicina foi registrado.

2.4.2 – Análise do nível de ploidia por citometria de fluxo

As plântulas que apresentavam um bom desenvolvimento, ou seja, número e tamanho de folhas adequado, que lhes permitissem sobreviver após a colheita de tecido foliar, foram selecionadas e sujeitas a análise do nível de ploidia por citometria de fluxo. A metodologia efetuada encontra-se descrita em detalhe em Loureiro (2007). Em resumo, tecido foliar colhido de cada plântula e uma proporção equivalente da planta padrão [*Pisum sativum* 2C= 9,09 pg DNA no caso de *L. multifida* e *L. viridis* (Doležel *et al.*, 1992)] foram colocados numa caixa de Petri contendo 1 mL de tampão de isolamento nuclear “General purpose buffer (GPB)”. De seguida, ambos os materiais vegetais foram cortados com uma lâmina- *chopping*- com o objetivo de promover a lise celular, seguindo a metodologia definida por Galbraith *et al.* (1983). Os núcleos libertados foram filtrados para um tubo de citometria através de uma rede de *nylon* com 50 µm de diâmetro, a fim de se eliminar a maioria dos resíduos obtidos. De seguida, adicionou-se um fluorocromo que se liga especificamente ao DNA- neste caso 50 µL/mL de iodeto de propídio (Sigma) - para marcação do DNA existente nos núcleos e 50 µL/mL de uma RNase, para eliminar a marcação de RNA. As amostras foram de seguida incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após este período, cada amostra foi analisada num citómetro de fluxo Cyflow Space (Partec, Germany) equipado com um laser de árgon arrefecido e a operar nos 488 nm. As definições do aparelho foram definidas no início dos ensaios para cada espécie e foram mantidas constantes a partir daí. No início de cada dia em que se realizaram os ensaios, foi preparada e analisada uma amostra apenas com o padrão de referência para avaliação da qualidade de funcionamento do citómetro de fluxo. A fluorescência relativa de 7.000-10.000 partículas de núcleos por amostra foi analisada no programa informático Partec FloMax.

Tendo em conta que os primeiros ensaios com o citómetro de fluxo foram insuficientes, realizaram-se posteriormente novos ensaios. A metodologia empregue foi semelhante à descrita acima, com a exceção do padrão em que foi utilizada *Glycine max* (2C= 2,50 pg DNA) e do tampão em que se utilizou “Woody Plant Buffer” (WPB): 0,2 M Tris-HCl, 4 mM MgCl₂·6H₂O, 2 mM EDTA Na₂·2H₂O, 86 mM NaCl, 10 mM metabissulfito de sódio, 1 % (m/v) PVP-10, 1 % (v/v) Triton X-100, pH 7.5 (Loureiro, 2007).

Para cada uma das amostras foi calculado o índice de DNA (rácio entre a fluorescência média do pico G₀/G₁ da amostra e do padrão de referência interno) e o número de núcleos que se encontrava em cada um dos picos visíveis. O tamanho do genoma também foi calculado, através da seguinte fórmula:

$$\text{Amostra 2C} \\ \text{conteúdo} \\ \text{DNA nuclear (pg)} = \frac{\text{Média do pico} \\ \text{G}_0/\text{G}_1 \text{ da amostra}}{\text{Média do pico G}_0/\text{G}_1 \\ \text{do padrão de} \\ \text{referência}} \times \text{2C conteúdo DNA} \\ \text{nuclear do padrão} \\ \text{de referência}$$

A conversão em números de base de pares foi realizada utilizando o fator: 1 pg = 978 Mbp (Doležel *et al.*, 2003 *cit* em Loureiro, 2007).

Desta forma, e de acordo com estes parâmetros, as amostras foram classificadas como diplóides, mixoplóides e tetraplóides.

As plântulas foram consideradas mixoplóides quando o pico que supostamente corresponde em exclusivo aos núcleos na fase G₂ do ciclo celular de uma plântula diplóide apresentou mais do que 25 % dos núcleos totais da amostra de estudo. A partir desta percentagem considerou-se que, para além dos núcleos na fase G₂, existem núcleos com o dobro da ploidia e que se encontravam na fase G₀/G₁, apresentando o tecido em estudo células com dois níveis de ploidia distintos, ou seja mixoploidia (Antunes, 2010).

As plântulas mixoplóides foram selecionadas para multiplicação e posterior aclimação.

De forma a verificar se ocorreu uma evolução no número de células diplóides e tetraplóides ao longo do tempo, as plantas mixoplóides foram reanalisadas novamente cerca de 2,5 meses após as primeiras análises.

2.4.3- Observação do cariótipo das plântulas

Para confirmação da ploidia das plântulas sujeitas à colquicina procedeu-se à contagem dos cromossomas em células de raízes em crescimento ativo, com pelo menos 1 cm de comprimento. Os vértices vegetativos das raízes, com cerca de 1,5 cm, foram tratados com colquicina durante 2h no escuro a 25°C, seguindo-se a sua fixação em álcool acético 3:1 (v/v) durante 4h, à temperatura ambiente, e a aplicação da técnica de Feulgen (Darlington & La Cour, 1976). Resumidamente, as raízes foram hidrolisadas em HCl 1N em banho-maria a

60°C, durante 6 min e transferidas para água destilada, para depois serem coradas com o reagente de Schiff durante 1-3 h, no escuro. Fez-se o *squash* do material em ácido acético a 45% (v/v) e a observação foi feita num microscópio ótico (Nikon Eclipse E400). Durante a observação ao microscópio fez-se a contagem do número de cromossomas das células. Como controlo, aplicou-se a mesma técnica a raízes de cebola (*Allium cepa*).

2.4.4 – Microscopia eletrónica de varrimento

Amostras foliares de *L. multifida* e *L. viridis* que foram sujeitas ao tratamento com colquicina e que não sofreram qualquer tipo de tratamento (controlo) foram fixadas em glutaraldeído a 2.5% em tampão cacodilato 0.1 M, pH 7.2, durante 3 horas. Após lavagem com o mesmo tampão, as amostras foram desidratadas numa série ascendente de acetona (70 a 100 % v/v) e secas pelo método do ponto crítico, num aparelho CPD 020 (Balzers), ocorrendo a substituição progressiva da acetona por CO₂, a 40°C. As amostras foram de seguida colocadas em porta objetos e revestidas com uma película de 20 nm de ouro-paládio, num metalizador JEOL JFC-1100 (1200 V, 6 mA, 10 min). As observações foram efetuadas num microscópio eletrónico de varrimento JEOL JSM-5400 a 15 kV, sendo o registo fotográfico realizado através de captação digital, com o programa MATLAB.

2.5- Enraizamento em *Lavandula multifida* e *Lavandula viridis*

Foram selecionadas 12 plântulas de *L. multifida* e 17 plântulas de *L. viridis* (29 plântulas no total) para posterior estabelecimento em condições *ex vitro*.

Ensaio preliminares mostraram que a indução e desenvolvimento de raízes nos rebentos obtidos *in vitro* não necessita de reguladores de crescimento. Deste modo, para a indução do enraizamento, os rebentos caulinares foram transferidos diretamente para meio MS, suplementado por 30 g/L de sacarose (Zuzarte, 2007). O pH foi ajustado a 5,6-5,8 e o meio gelificado com 6g/L de agar. De seguida o meio foi autoclavado, conforme as condições referidas na secção 2.2.

2.6- Aclimação de plântulas de *Lavandula multifida* e *Lavandula viridis*

Após a formação de raízes com um desenvolvimento apropriado (3 cm de comprimento, aproximadamente) as plântulas foram cuidadosamente removidas dos recipientes de vidro, e as suas raízes lavadas com água corrente de forma a remover os restos de agar. Este procedimento evita que o agar seja transferido dos recipientes de vidro para o substrato, diminuindo assim o risco de contaminações. De seguida as plântulas foram colocadas em recipientes de plástico contendo terra esterilizada por autoclavagem, passando a manutenção a efetuar-se em condições semi-estéreis. A humidade relativa a que as plântulas estavam sujeitas foi gradualmente reduzida, encontrando-se inicialmente cobertas com um plástico para reduzir ao máximo as perdas de água por transpiração e sendo pulverizadas com vapor de água numa frequência sucessivamente menor. Desde esta etapa, as plantas aguardam níveis de desenvolvimento apropriados para a sua transferência para o meio exterior.

2.7- Análise das plantas aclimatadas

Para a confirmação da ploidia das lavândulas estudadas, analisaram-se plantas mantidas em terra, na estufa a $19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Foram analisados os seguintes parâmetros: comprimento do caule, comprimento e largura da maior folha e número de flores por espiga. Foi também quantificado o número de cloroplastos em 15 células estomáticas de *L. multifida* e *L. viridis* (controlo e tratamento). Para tal foi removida uma porção da epiderme (cerca de 5x5 mm) da página inferior de 3 folhas das plantas aclimatizadas, que foi colocada sobre uma gota de nitrato de prata (AgNO_3) a 1% (w/v). As lâminas foram observadas ao microscópio ótico (Nikon Eclipse E400) e o registo fotográfico realizado com a câmara Nikon Digital Sight DS-U1 e com o software Act-2U.

2.8- Embriogénese somática em *Lavandula multifida*

Foi escolhida a espécie *L. multifida* para os ensaios de embriogénese somática, visto ser uma planta cujo rendimento em óleos essenciais é baixo (inferior a 0,5%).

Como meio de indução testou-se o meio MS suplementado com diferentes concentrações de hormonas. A Tabela II mostra as hormonas utilizadas, bem como as

diferentes concentrações testadas. O pH do meio foi ajustado a 5,6-5,8, adicionou-se 6g/L de agar e o meio foi autoclavado. As culturas foram mantidas no escuro a uma temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Foram removidas folhas jovens de várias plântulas já estabelecidas *in vitro*; estas foram seccionadas em duas partes e colocadas com a página abaxial em contacto com o meio de cultura.

Após aproximadamente 3 meses, foram analisados à lupa os explantes e foram registadas as suas características principais: presença de raízes, coloração e textura.

Tabela II. Diferentes concentrações de hormonas testadas para indução da embriogénese somática em *L. multifida*

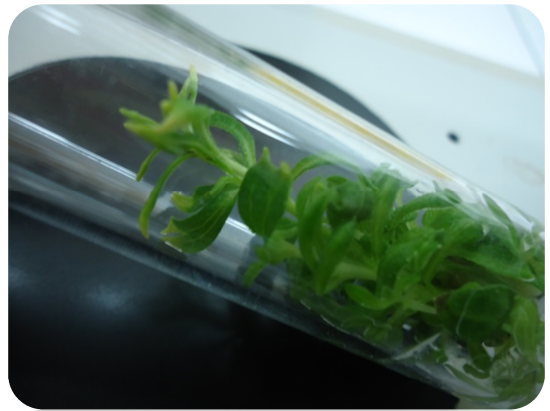
Hormona	Concentrações (mg/L)
NAA	0,5
2,4-D + Cinetina	1 + 0,25; 2 + 0,25; 4 + 0,25; 2 + 0,2; 2 + 0,5
Picloram	0,5; 1; 2; 4
Picloran + Cinetina	2 + 0,2

2.8- Análise estatística

Para o tratamento estatístico dos dados obtidos, foi utilizado o programa Statistica 8.0. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e para os parâmetros avaliados com diferenças significativas, realizou-se também o teste de Tukey para um nível de significância de $p < 0,05$.

Todos os resultados expressos em percentagens foram primeiro convertidos em valores de arcoseno (Zar, 1984) e só depois realizados os tratamentos estatísticos.

3. RESULTADOS



3.1- Proliferação de meristemas axilares

Com a finalidade de manter uma coleção de laboratório e evitar colheitas nas populações selvagens, foram multiplicadas *in vitro* as espécies em estudo - *L. multifida* (Fig. 12) e *L. viridis* (Fig.13).

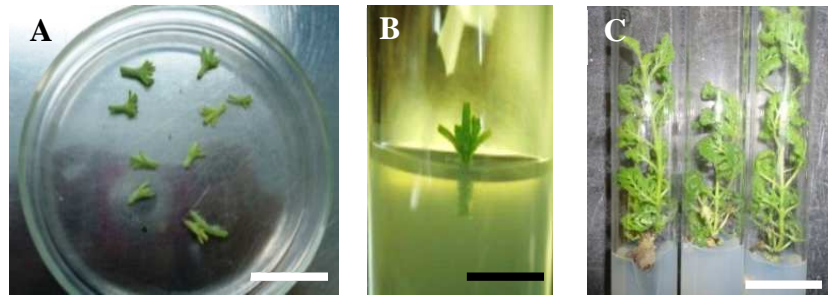


Figura 12. Processo da proliferação de meristemas axilares em *L. multifida*- A: segmentos nodais; B: segmento nodal em meio MS; C: rebentos caulinares após 1,5 meses em meio MS. Barra=1 cm

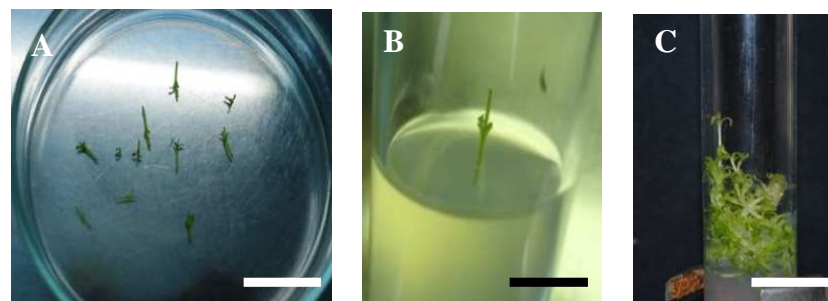


Figura 13. Processo da proliferação de meristemas axilares em *L. viridis*- A: segmentos nodais; B: segmento nodal em meio MS; C: rebentos caulinares após 1,5 meses em meio MS. Barra=1 cm

O material vegetal resultante deste processo (Figs. 12C e 13C) foi utilizado nos ensaios ulteriores.

3.2- Taxas de sobrevivência e desenvolvimento

As taxas de sobrevivência e desenvolvimento das plantas sujeitas ao tratamento com colquicina e das plantas controlo, foram analisadas após 1,5 meses de cultura. Na figura 14 estão representadas as percentagens de explantes desenvolvidos, não desenvolvidos e senescentes (incluindo-se neste último parâmetro não só os explantes efetivamente senescentes, mas também os infetados) das duas espécies de lavândulas estudadas.

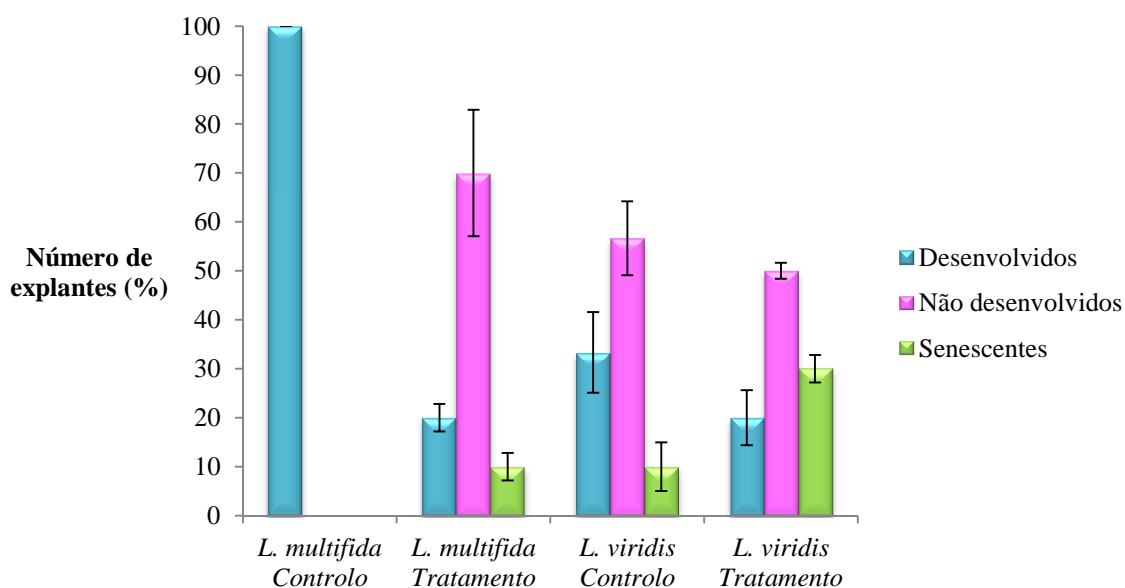


Figura 14. Níveis de desenvolvimento e sobrevivência (média \pm SD) dos explantes de *Lavandula multifida* e *Lavandula viridis* após exposição à colquicina (125 mg/L).

De uma forma geral, obtiveram-se explantes desenvolvidos de *L. multifida* e *L. viridis* para ambos os grupos (controlo e tratamento) (Fig. 14). A totalidade dos rebentos desenvolveram no grupo controlo em *L. multifida*, mas apenas 20% dos explantes sobreviveram ao tratamento com colquicina. Em *L. viridis*, as taxas de sobrevivência e desenvolvimento no grupo controlo foram mais baixas, comparativamente com *L. multifida*, sendo que 43,3% dos explantes sobreviveram e apenas 33,3% desenvolveram. No tratamento com colquicina, somente 20% dos explantes iniciais desenvolveram nesta espécie.

3.3 – Análise do nível de ploidia por citometria de fluxo

O nível de ploidia em *L. multifida* e *L. viridis* foi analisado recorrendo a citometria de fluxo. Tanto em *L. multifida* como em *L. viridis* obtiveram-se coeficientes de variação (CV) inferiores a 2,5%.

Em ambas as espécies foi possível identificar tecidos puramente diplóides ou mixoplóides.

Os tecidos diplóides apresentam um pico bem notório correspondente aos núcleos na fase G_0/G_1 do ciclo celular. Tal como se pode observar nos histogramas das figuras. 15B e 16B, as plântulas que não foram expostas à colquicina apresentam este pico, sendo, por isso, caracterizadas como diplóides. O índice de DNA e o tamanho do genoma foram calculados para ambas as espécies, tendo-se obtido os valores de 0,13 e 1140,89 Mbp, respetivamente para *L. multifida* e 0,15 e 1371,66 Mbp, respetivamente para *L. viridis*.

Por sua vez, os tecidos mixoplóides, apresentam um pico de dimensão variável correspondente a núcleos diplóides na fase G_0/G_1 , um pico com 25 % ou mais do total de núcleos correspondentes a núcleos diplóides na fase G_2 e a núcleos tetraplóides na fase G_0/G_1 , e um pico na posição correspondente a núcleos tetraplóides na fase G_2 . Tal como se pode observar nos histogramas das figuras 15A e 16A, as plântulas que foram expostas à colquicina apresentavam picos com estas características. Desta forma, pode também inferir-se que se obtiveram plântulas mixoplóides após a exposição à colquicina. O índice de ADN e o tamanho do genoma foram também calculados para estes casos, obtendo-se os valores de 0,13 e 1144,59 Mbp, respetivamente para *L. multifida* e 0,14 e 1260,90 Mbp, respetivamente para *L. viridis*. Foi ainda calculada a percentagem de núcleos diplóides em comparação com os núcleos tetraplóides, presentes nas plantas mixoplóides, sendo em *L. multifida* 61% e em *L. viridis* 49%.

Em resumo, todas as plantas, de ambas as espécies, expostas à colquicina foram caracterizadas como mixoplóides enquanto a totalidade das plantas controlo (não expostas ao agente c-mitótico) foram caracterizadas como diplóides.

RESULTADOS

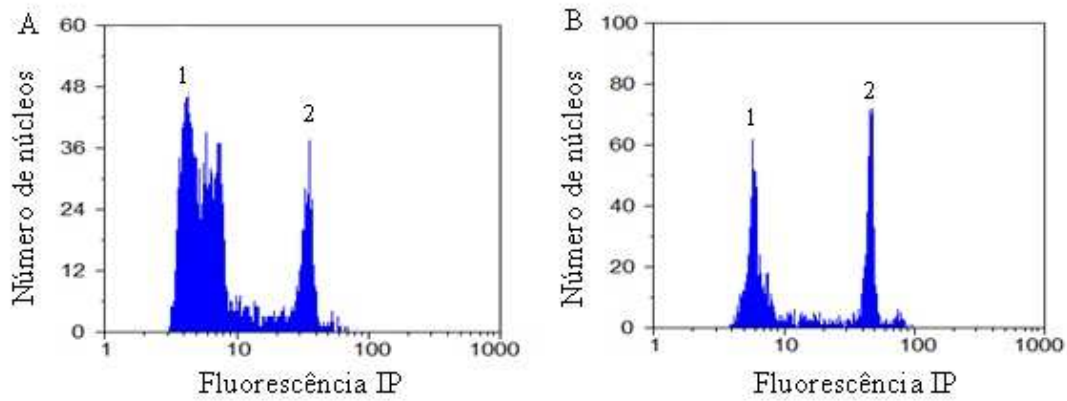


Figura 15. Histogramas de fluorescência relativa obtidos após análise simultânea de núcleos isolados do padrão de referência interna (pico 2, *Pisum sativum* 2C= 9,09 pg DNA) e de *L. multifida* (pico 1): A - plântula mixoplóide; B- plântula diplóide.

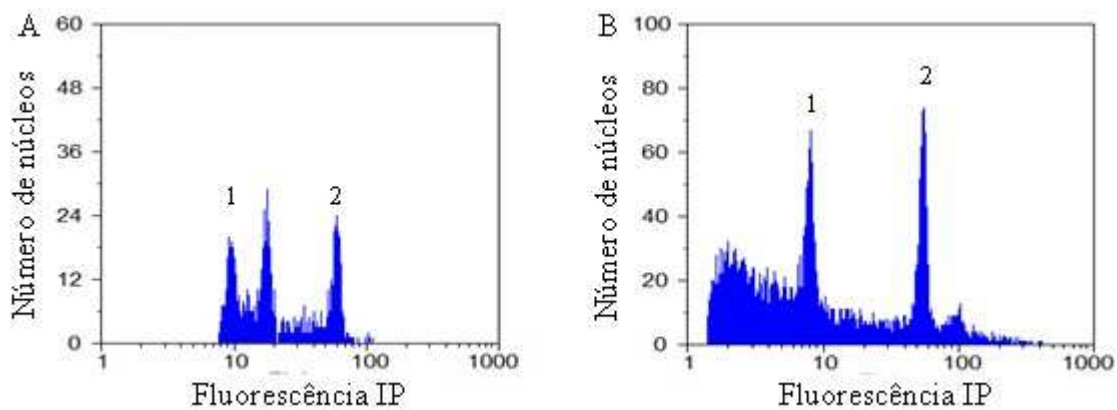


Figura 16. Histogramas de fluorescência relativa, obtidos após análise simultânea de núcleos isolados do padrão de referência interna (pico 2, *Pisum sativum* 2C= 9,09 pg DNA) e de *L. viridis* (pico 1): A - plântula mixoplóide; B- plântula diplóide.

De seguida, foram selecionadas para aclimação as plantas mixoplóides e após 2-3 meses de cultura, as plantas foram reanalisadas por citometria de fluxo. Os CV obtidos nestes histogramas foram inferiores a 2,5%.

A reanálise das plantas de *L. multifida* e *L. viridis* demonstrou que a maioria reverteu para o estado inicial de diploidia (Figs. 17A e 17B). Em *L. multifida* somente uma planta permaneceu mixoplóide, contudo, duas plantas de *L. viridis* evoluíram para o estado de tetraploidia e uma permaneceu mixoplóide (Figs. 17A, 17B, 18B e 19B).

Os tecidos unicamente tetraplóides apresentavam um pico de maiores dimensões correspondente à fase G₀/G₁ e um pico menor relativo à fase G₂ (Fig. 19B). O índice de DNA

médio calculado para as plântulas tetraplóides foi de 0,871, enquanto o tamanho do genoma foi calculado em 2129,59 Mbp.

Para as plantas diplóides foi novamente calculado o índice de DNA bem como o tamanho do genoma. Em *L. viridis*, o índice de DNA foi de 0,427 e o tamanho do genoma 1044,688 Mbp enquanto em *L. multifida* o índice de DNA foi de 0,362 e o tamanho do genoma 886,0337 Mbp.

Para as planta mixoplóides também foi novamente calculado o índice de DNA e o tamanho do genoma (0,374 e 913,6667 Mbp para *L. multifida*, 0,418 e 1022,01 Mbp para *L. viridis*). Foi ainda calculada a percentagem de núcleos diplóides em comparação com os núcleos tetraplóides presentes nas plantas mixoplóides, sendo em *L. multifida* 67% e em *L. viridis* 43,6%.

Assim, tendo por base todas as plântulas e plantas analisadas por citometria de fluxo, obtiveram-se no total duas plantas tetraplóides numa das espécies alvo- *L. viridis*. E obtiveram-se quer em *L. multifida* quer em *L. viridis* uma planta mixoplóide, podendo estas, eventualmente, vir a contribuir para a obtenção de plantas tetraplóides.

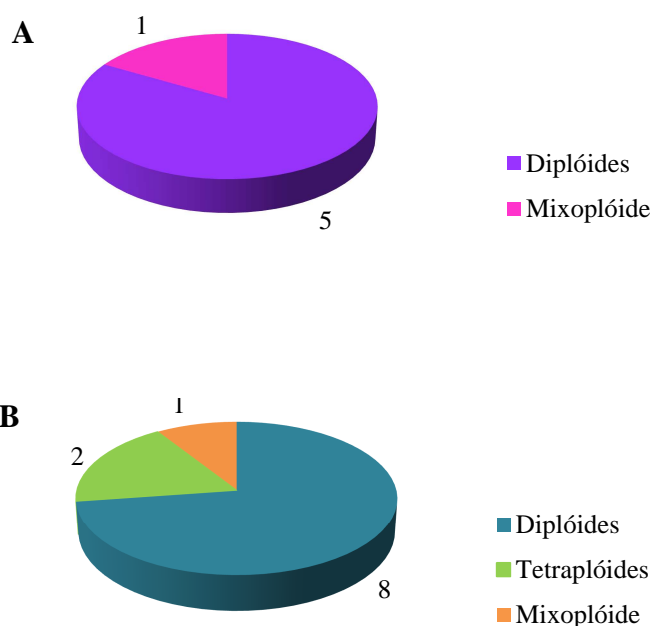


Figura 17. Níveis de ploidia das plântulas mixoplóides (n.º de ocorrências) após reanálise por citometria de fluxo, 2-3 meses após aclimação das plantas mixoplóides selecionadas. A: *L. multifida*; B: *L. viridis*.

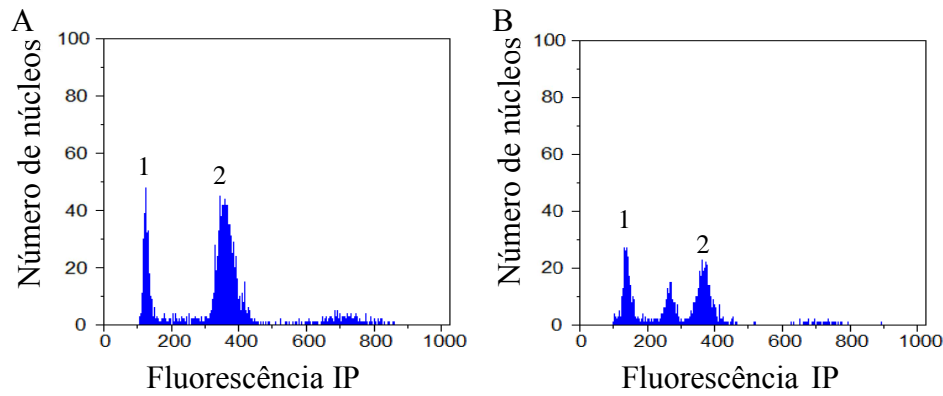


Figura 18. Histogramas de fluorescência relativa, obtidos após análise simultânea de núcleos isolados do padrão de referência interna (pico 2, *Glycine max* 2C= 2,50 pg DNA) e de *L. multifida* (pico 1): A - planta diplóide; B- planta mixoplóide.

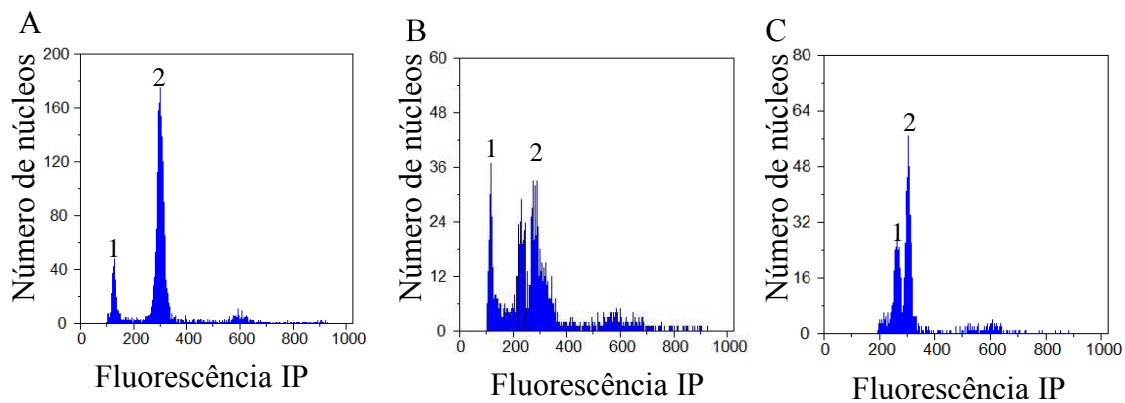


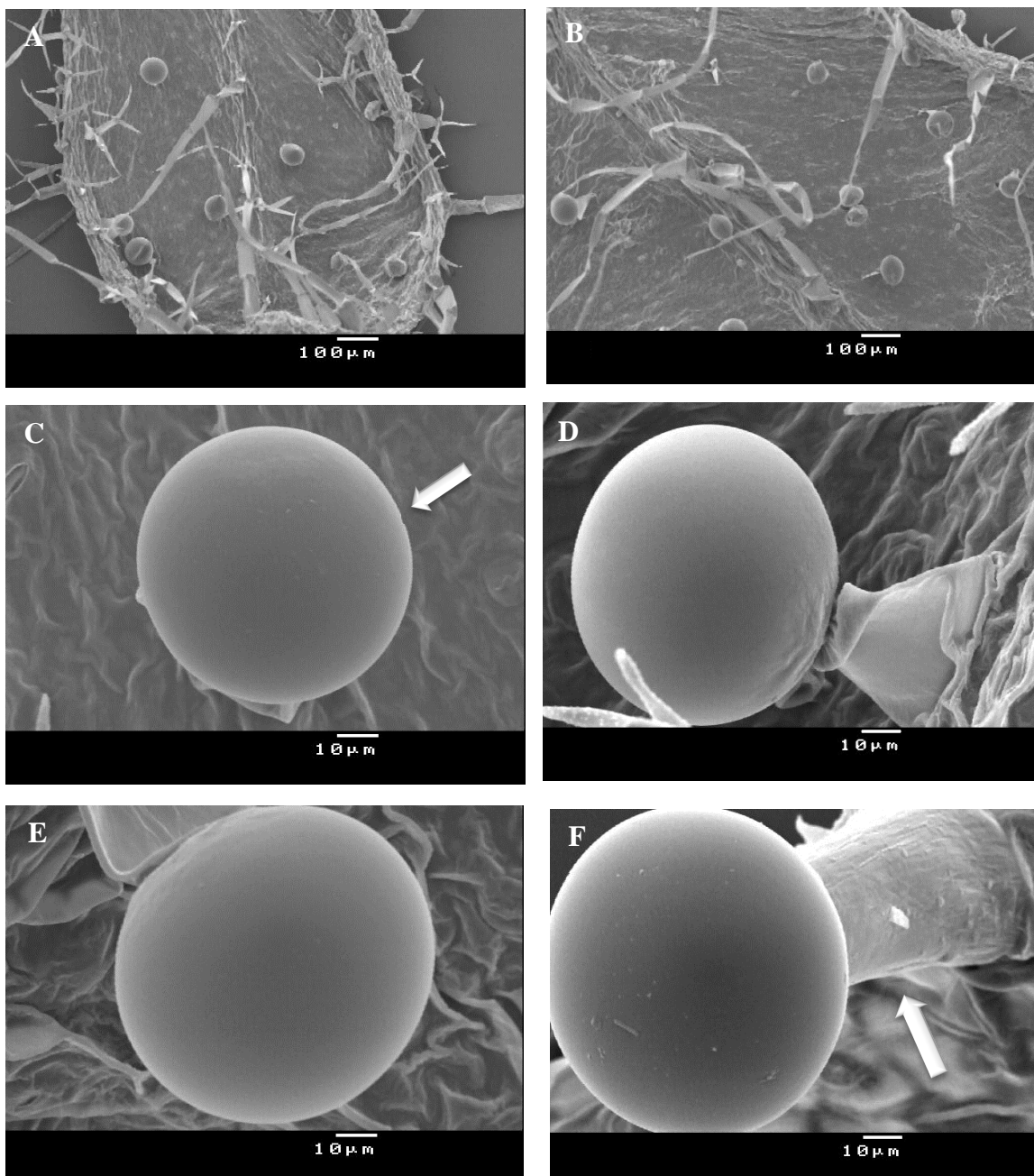
Figura 19. Histogramas de fluorescência relativa, obtidos após análise simultânea de núcleos isolados do padrão de referência interna (pico 2, *Glycine max* 2C= 2,50 pg DNA) e de *L. viridis* (pico 1): A- planta diplóide; B- planta mixoplóide; C- planta tetraplóide.

3.4 – Observação do cariótipo das plântulas

O cariótipo das plântulas de *L. multifida* e *L. viridis* que foram expostas à colquicina foi observado pontualmente, tendo sido analisadas 5 plântulas mixoplóides e 5 plântulas diplóides. Contudo, não se obtiveram quaisquer tipos de resultados, uma vez que a técnica testada não foi funcional nestas espécies. Como controlo da técnica foi observado o cariótipo de uma planta de *Allium cepa*, conseguindo-se obter excelentes resultados e sendo possível a contagem de cromossomas nesta espécie.

3.5 – Microscopia eletrónica de varrimento

A análise em SEM mostrou que as folhas de *L. multifida* e *L. viridis* apresentavam um indumento bastante heterogéneo, com diferentes tipos de tricomas glandulares e de revestimento. Relativamente aos tricomas de revestimento não foram detetadas diferenças entre as lavândulas sujeitas a tratamento e as plantas do controlo. Contudo, relativamente aos tricomas glandulares foram observadas diferenças, particularmente no diâmetro da cabeça dos tricomas peltados e capitados do tipo II. Em *L. multifida*, observaram-se diferenças significativas no diâmetro da cabeça dos tricomas peltados, entre as plantas tratamento e controlo (Fig. 19).



RESULTADOS

Figura 19. Observações em SEM dos tricomas foliares em *L. multifida*. A: superfície da página abaxial, mostrando tricomas não glandulares e tricomas glandulares de plântulas que não foram expostas à colquicina (controlo); B: superfície da página abaxial, mostrando tricomas não glandulares e tricomas glandulares de plântulas que foram expostas à colquicina (tratamento); C e E: tricomas glandulares peltados de plântulas que não foram expostas à colquicina (controlo), com destaque para a cabeça da glândula em C (seta); D: tricomas glandulares de plântulas que foram expostas à colquicina (tratamento); F: tricomas glandulares de plântulas que foram expostas à colquicina, com destaque para o pé do tricoma (seta).

Os dados relativos aos diâmetros de 15 tricomas das folhas de *L. multifida* sujeitas ao agente c-mitótico e de plantas controlo estão representados tabela III.

Tabela III. Diâmetro dos tricomas glandulares de *L. multifida* (T-tratamento e C-controlo).

Diâmetro dos tricomas (μm)		
	<i>L. multifida</i> T	<i>L. multifida</i> C
Tricomas glandulares peltados	$74,7 \pm 3,7^a$	$64,8 \pm 5,1^b$

Os valores representam a média (\pm erro padrão) do diâmetro da cabeça de 15 tricomas peltados. Valores com letra diferente são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$).

A análise dos resultados mostra que existem diferenças significativas no diâmetro da cabeça dos tricomas peltados das plantas que não foram expostas à colquicina (Figs. 19C, 19E) - $64,8 \mu\text{m}$ - e das plantas que foram expostas à colquicina (Figs. 19D, 19F)- $74,7 \mu\text{m}$.

Em *L. viridis* os tricomas glandulares analisados apresentavam um diâmetro superior nas plantas expostas à colquicina, comparativamente às plantas controlo (Fig. 20).

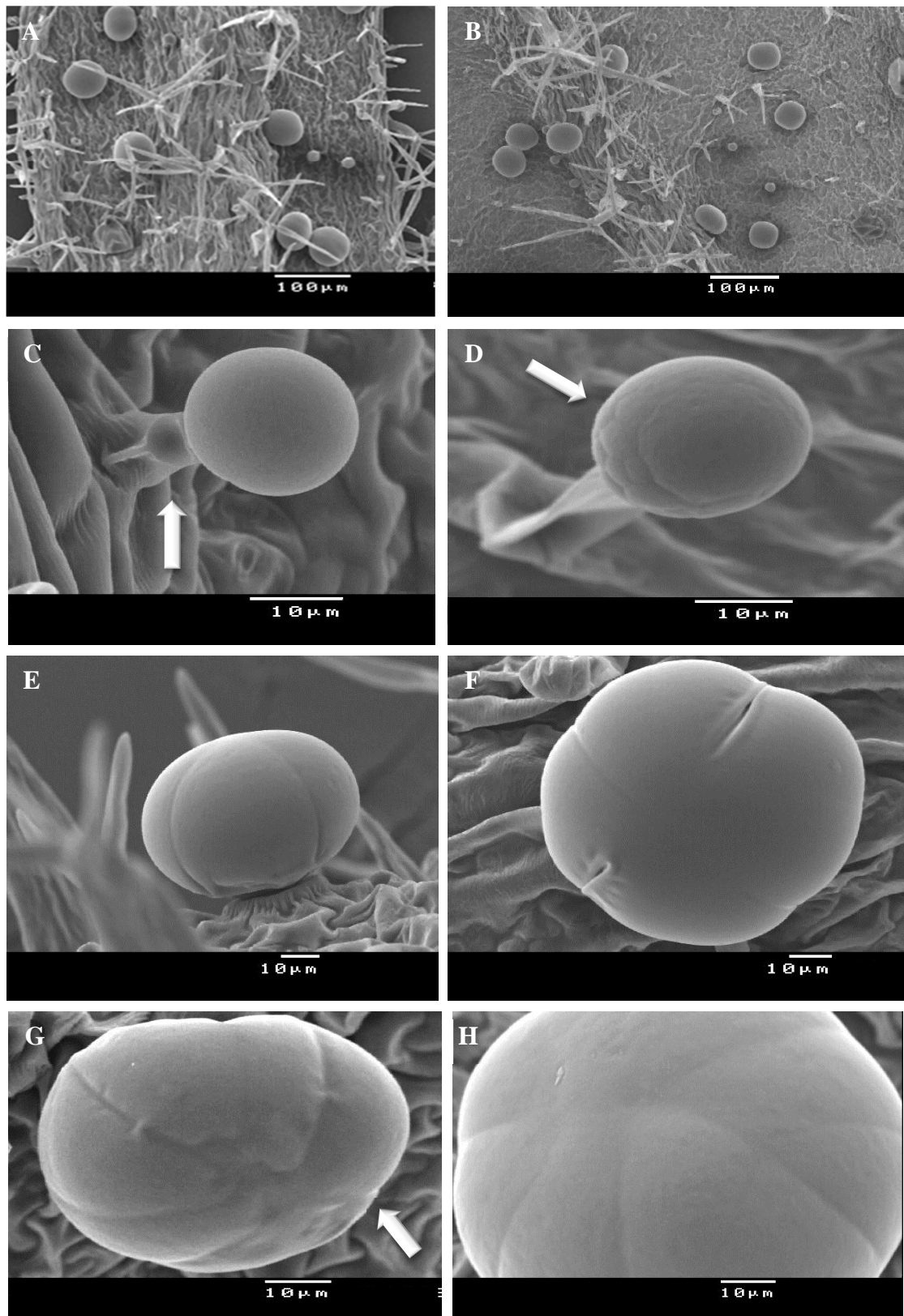


Figura 20. Observações em SEM dos tricomas foliares em *L. viridis*. A: superfície da página abaxial, mostrando tricomas não glandulares e tricomas glandulares de plântulas que não foram expostas à colquicina (controle); B: superfície da página abaxial, mostrando tricomas

RESULTADOS

não glandulares e tricomas glandulares de plântulas que foram expostas à colquicina (tratamento); C: tricoma glandular capitado tipo II de plântulas que não foram expostas à colquicina (controle), com destaque para o pé do tricoma (seta); D: tricoma glandular capitado tipo II de plântulas que foram expostas à colquicina (tratamento), com destaque para a cabeça unicelular do tricoma (seta); E: tricoma glandular peltado de plântulas que não foram expostas à colquicina (controle); F: tricoma glandular peltado de plântulas que foram expostas à colquicina (tratamento); G: tricoma glandular peltado de plântulas que não foram expostas à colquicina (controle) com destaque para as células secretoras (seta); H: tricoma glandular peltado de plântulas que foram expostas à colquicina (tratamento) com destaque para as dimensões superiores deste tricoma, comparativamente com os do controle.

Os diâmetros de 15 tricomas peltados e 15 tricomas capitados do tipo II das folhas de *L. viridis* sujeitas ao agente c-mitótico de plantas controle encontram-se sistematizados na tabela IV.

Tabela IV. Diâmetro dos tricomas glandulares de *L. viridis* (T- tratamento e C-controle).

Diâmetro dos tricomas (μm)		
	<i>L. viridis</i> T	<i>L. viridis</i> C
Tricomas glandulares capitados tipo II	$21,77 \pm 0,7^a$	$18,2 \pm 0,6^b$
Tricomas glandulares peltados	$78,8 \pm 5,5^a$	$62,46 \pm 4,6^b$

Os valores representam a média (\pm erro padrão) do diâmetro da cabeça de 15 tricomas. Na mesma linha, valores com a mesma letra não são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$).

A análise mostra que os tricomas glandulares peltados das plantas controle (Figs. 19E, 19G) apresentam um diâmetro inferior - $62,46 \mu\text{m}$ - do que os tricomas glandulares peltados das plantas sujeitas à colquicina (Figs. 19F, 19H) - $78,8 \mu\text{m}$.

Os tricomas glandulares capitados tipo II também apresentam diferenças significativas entre as plantas controle - $18,2 \mu\text{m}$ - e as plantas tratamento - $21,77 \mu\text{m}$ (Figs. 19C, 19D respectivamente).

3.6 – Aclimação de *L. multifida* e *L. viridis*

Após o desenvolvimento e enraizamento das plântulas de *L. multifida* e *L. viridis*, foram selecionadas para aclimação 29 plântulas (6 de *L. multifida* e 11 de *L. viridis* tratadas com colquicina, 6 de *L. multifida* e 6 de *L. viridis* que não foram expostas ao agente c-mitótico). As plantas foram retiradas do meio de cultura e colocadas em terra, em estufas de aclimação (Fig. 21).

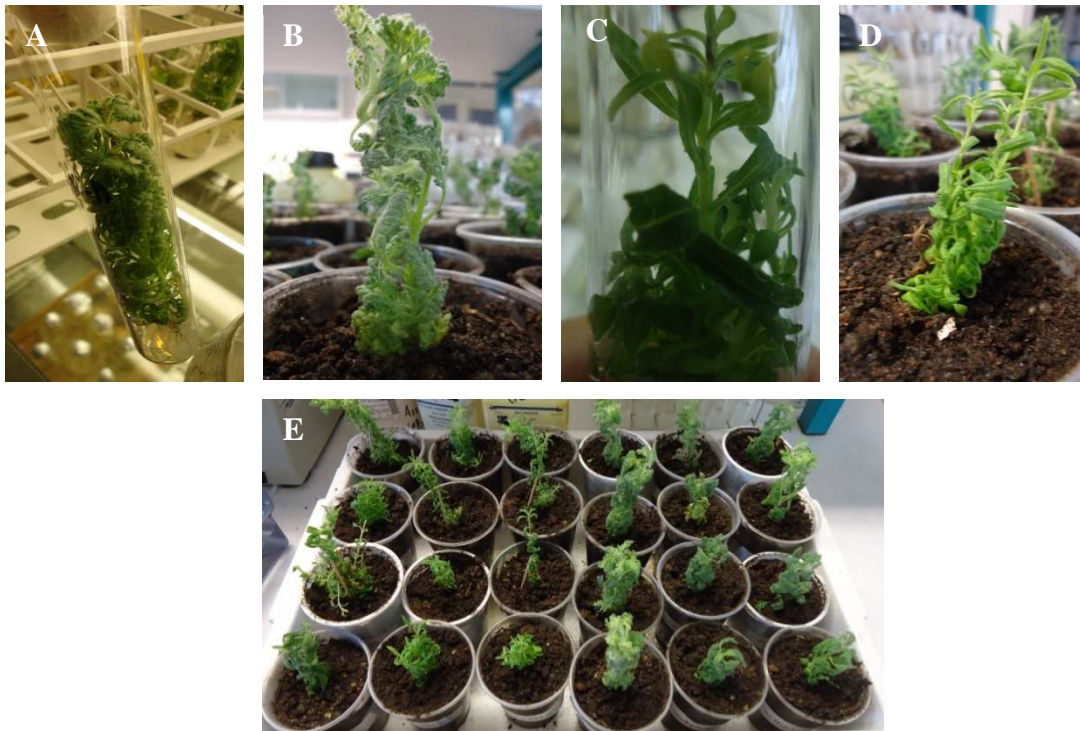


Figura 21. Processo de aclimação das plantas. A: plântula *L. multifida in vitro*; B: transição da plântula *L. multifida in vitro* para vaso com terra; C: plântula *L. viridis in vitro*; D: transição da plântula *L. viridis in vitro* para vaso com terra; E: plântulas em vasos para aclimação.

As plântulas desenvolveram-se bem e de forma rápida, apresentando um fenótipo aparentemente normal (Fig. 22) apesar da sucessiva redução da umidade relativa efetuada durante esta fase.

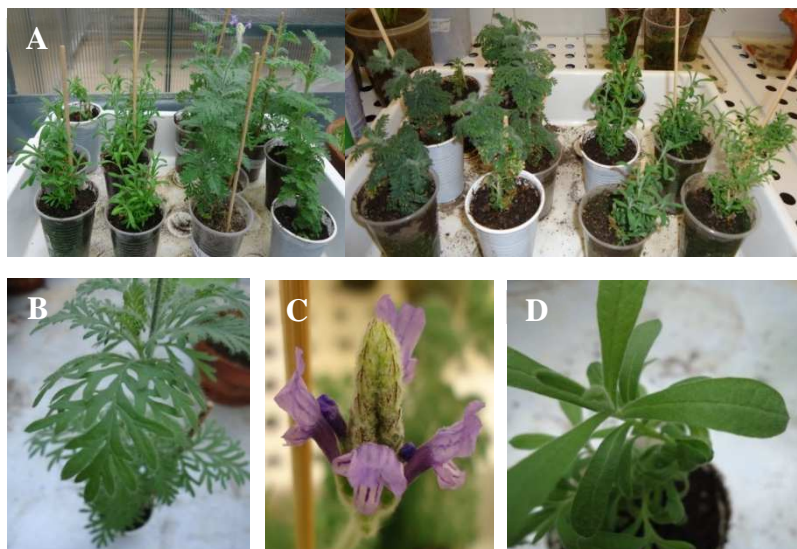


Figura 22. Plantas aclimatadas, após 2 meses da transferência para terra. A: aspeto geral total das plantas aclimatadas; B: pormenor das folhas de *L. multifida*; C: pormenor da flor de *L. multifida*; D: pormenor das folhas de *L. viridis*.

3.6 – Análise das plantas aclimatadas

Após 2 meses, foram analisados vários parâmetros nas lavândulas que foram sujeitas ao processo de aclimação. Os parâmetros observados foram registados na tabela V.

Tabela V. Características morfológicas das plantas aclimatadas.

	Comprimento do caule (cm)	Comprimento da maior folha (cm)	Largura da maior folha (cm)	Número de espigas por planta
<i>Lavandula multifida</i> (controlo)	33,08 ± 12,99 ^a	1,83 ± 0,63 ^a	0,60 ± 0,16 ^a	2,83 ± 1,95 ^a
<i>Lavandula multifida</i> (tratamento)	38,92 ± 8,16 ^a	1,30 ± 0,25 ^a	0,71 ± 0,20 ^a	4,00 ± 2,52 ^a
<i>Lavandula viridis</i> (controlo)	18,00 ± 2,52 ^b	3,83 ± 0,41 ^b	0,42 ± 0,04 ^b	0 ± 0 ^b
<i>Lavandula viridis</i> (tratamento)	15,50 ± 2,05 ^b	3,70 ± 0,48 ^b	0,70 ± 0,19 ^c	0 ± 0 ^b

Os valores representam a média (± erro padrão) dos parâmetros medidos. Na mesma coluna, valores com letra diferente, são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Os resultados obtidos (Tabela V) mostram que não existem diferenças significativas entre plantas da mesma espécie que foram expostas à colquicina e as que não foram sujeitas a este agente c-mitótico (grupo controle).

O número de cloroplastos presentes em 15 células estomáticas de *L. multifida* (diplóide e mixoplóide) e *L. viridis* (diplóide e tetraplóide) foram quantificados (Fig. 23).

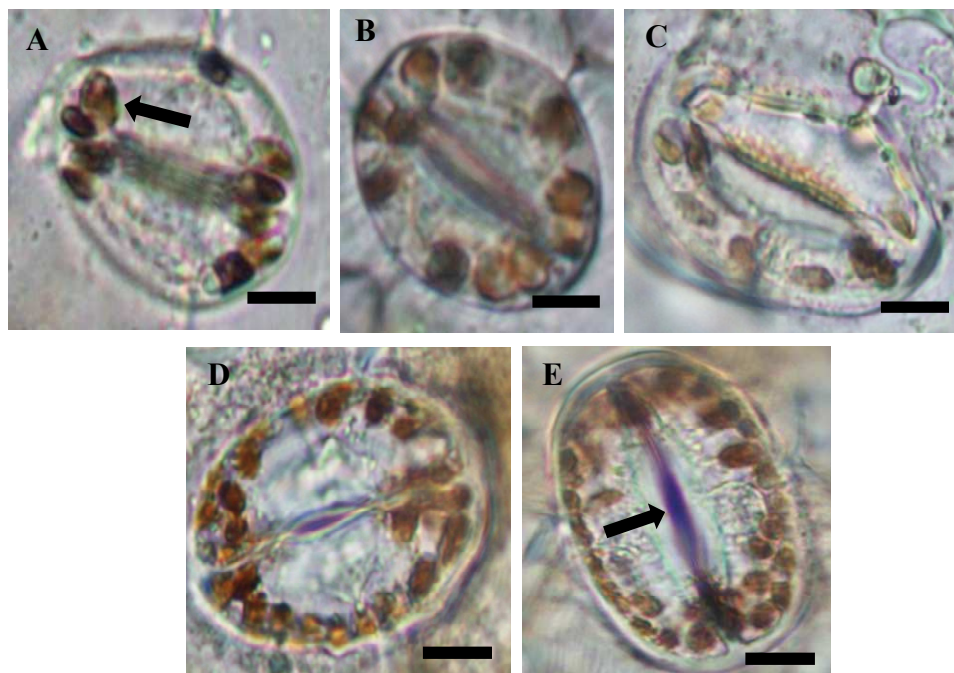


Figura 23. Observação, ao microscópio ótico, de células estomáticas da epiderme foliar com os cloroplastos marcados com nitrato de prata. A: Célula estomática diplóide de *L. multifida*, com destaque para os cloroplastos; B: Célula estomática mixoplóide de *L. multifida*; C: Célula estomática diplóide de *L. viridis*; D: Célula estomática tetraplóide de *L. viridis*; E: Célula estomática mixoplóide de *L. viridis*, com destaque para o ostíolo. As barras correspondem a 10 µm.

Os resultados obtidos (Tabela VI) mostram que não existem diferenças significativas entre o número de cloroplastos dos estomas das plantas diplóides e o das plantas mixoplóides em *L. multifida*. Já em *L. viridis* foram identificadas diferenças significativas no número de cloroplastos entre plantas diplóides e tetraplóides e mixoplóides (Tabela VII).

RESULTADOS

Tabela VI. Número de cloroplastos nas células guarda dos estomas em *L. multifida* (controle e tratamento). Os valores indicados referem-se ao número de cloroplastos observados em 3 lâminas diferentes.

Número de cloroplastos		
Réplicas	<i>L. multifida</i> T	<i>L. multifida</i> C
1	11 ± 0,4	11 ± 0,4
2	11 ± 0,5	11 ± 0
3	11 ± 0	11 ± 0,4
Média das réplicas	11 ± 0,3^a	11 ± 0,3^a

Os valores representam a média (\pm erro padrão). Valores com letra diferente, são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tabela VII. Número de cloroplastos nas células guarda dos estomas em *L. viridis* (controle e tratamento). Os valores indicados referem-se ao número de cloroplastos observados em 3 lâminas diferentes.

Número de cloroplastos			
Réplicas	<i>L. viridis</i> (tetraplóide)	<i>L. viridis</i> (diplóide)	<i>L. viridis</i> (mixoplóide)
1	24 ± 0,5	15 ± 0,4	23 ± 0,4
2	25 ± 0	15 ± 0,6	24 ± 0,5
3	25 ± 0,5	15 ± 0,5	24 ± 0,4
Média das réplicas	25 ± 0,3^a	15 ± 0,5^b	24 ± 0,4^a

Os valores representam a média (\pm erro padrão). Valores com letra diferente, são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$).

3.7 – Embriogênese somática

A inoculação de explantes foliares de *L. multifida* em meio MS com diferentes concentrações de auxinas, conduziu ao aparecimento de tecidos distintos nomeadamente tecido com aparência mais escura e compacta, tecido caloso não embriogénico e tecido caloso supostamente embriogénico.

Na Tabela VIII e na Fig. 24 estão representados os meios testados com as diferentes concentrações de auxinas, bem como as morfologias dos calos obtidos.

Tabela VIII. Efeito de diferentes concentrações de auxinas na embriogênese somática de *L. multifida*, bem como as morfologias dos calos obtidos.

Hormona	Concentrações (mg/L)	Morfologia dos calos
NAA	0,5	Maioritariamente acastanhados, friáveis; raízes presentes e desenvolvidas.
2,4-D + Cinetina	1 + 0,25	Maioritariamente esbranquiçados; de textura granulada; sem raiz.
	2 + 0,25	Maioritariamente esverdeados; textura pouco consistente; sem raiz
	4 + 0,25	Maioritariamente acastanhados, de textura granulada; sem raiz.
	2 + 0,2	Maioritariamente esbranquiçados; de textura granulada; sem raiz.
	2 + 0,5	Maioritariamente acastanhados, com estruturas globulares esbranquiçadas; sem raiz
Picloram	0,5	Maioritariamente acastanhados, de textura granulada; sem raiz.
	1	Maioritariamente esbranquiçados; de textura granulada; sem raiz.
	2	Maioritariamente esbranquiçados; de textura granulada; sem raiz.
	4	Maioritariamente acastanhados, de textura pouco consistente; sem raiz.
Picloram + Cinetina	2 + 0,2	Maioritariamente esbranquiçados; de textura granulada; sem raiz.

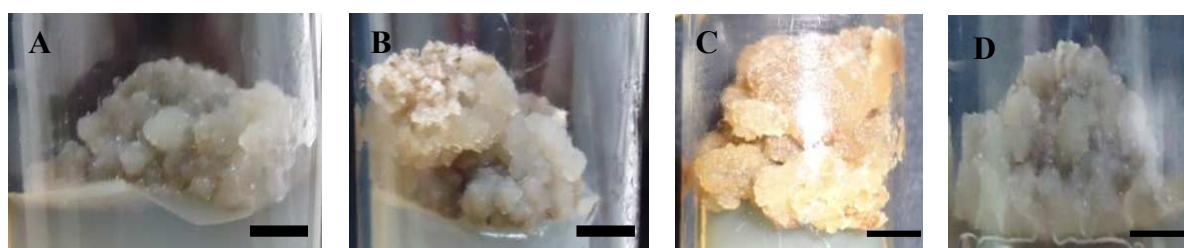


Figura 24. Indução de embriogênese somática em *L. multifida*, usando diferentes concentrações de auxinas no meio de cultura. A: Indução em meio MS suplementado com 1 mg/L de 2,4-D + 0,25 mg/L de cinetina; B: Indução em meio MS suplementado com 2 mg/L de 2,4-D + 0,5mg/L de cinetina; C: Indução em meio MS suplementado com 4 mg/L de Picloram; D: Indução em meio MS suplementado com 2 mg/L + 0,2 mg/L de Picloram. As barras correspondem a 2 mm.

4. DISCUSSÃO



4.1- Proliferação de meristemas axilares

O uso de explantes provenientes de plântulas previamente estabelecidas *in vitro* permite uma resposta mais rápida visto que os meristemas axilares desenvolvem mais rapidamente do que nos explantes colhidos diretamente no campo (Zuzarte *et al.*, 2010). Desta forma, manter uma coleção de laboratório e evitar as colheitas nas populações selvagens é muito vantajoso não só em termos de preservação das espécies e da sua biodiversidade, mas também na rapidez com que se desenvolvem os meristemas axilares e consequentemente se obtêm novas plântulas.

Na micropropagação do género *Lavandula*, apesar de vários autores referirem o uso de meios de cultura menos concentrados do que o meio MS (Nobre, 1996) ou meio MS com os macronutrientes reduzidos a metade (Dias *et al.*, 2002), ou ainda o meio base MS suplementado com citocininas (Calvo & Segura, 1989; Zuzarte, 2010), neste trabalho optou-se por se utilizar o meio base MS para manutenção das culturas, uma vez que ensaios preliminares mostraram taxas elevadas de indução, proliferação, alongamento e enraizamento dos rebentos.

4.2- Indução da poliploidia e taxas de sobrevivência e desenvolvimento

A indução da poliploidia *in vitro* utilizando a colquicina tem sido reportada com sucesso em várias espécies, nomeadamente *Arbutus unedo* (Antunes, 2010), *Cyphomandra betacea* (Antunes, 2010), *Helleborus niger*, *H. orientalis* e *H. x nigercors* (Dhooghe *et al.*, 2009), *Lavandula angustifolia* (Urwin *et al.*, 2007), *L. vera* (Raev *et al.*, 1996), *Miscanthus sinensis* (Petersen *et al.*, 2002; 2003), *Phlox subulata* (Zhang *et al.*, 2008), *Punica granatum* (Shao *et al.*, 2003), híbridos de *Rhododendron* sp. (Vainola, 2000), *Secale cereale* (Caperta *et al.*, 2006), *Scoparia montevidiensis* (Escandón *et al.*, 2005) e *Vitis vinifera* (Yang *et al.*, 2006).

Apesar da colquicina ter uma afinidade mais reduzida para as tubulinas e consequentemente ter uma menor capacidade de impedir o fuso acromático de se formar comparativamente a outros agentes c-mitóticos (por exemplo a orizalina), tem a vantagem do seu uso ser mais conhecido e utilizado nas plantas, comparativamente a outros agentes c-mitóticos (Caperta *et al.*, 2006). Inclusivamente, em algumas espécies, a orizalina demonstra ser mais tóxica do que a colquicina (Vainola, 2000; Petersen *et al.*, 2002).

Em *Lavandula angustifolia* a poliploidia foi induzida através da utilização da colquicina e obtiveram-se resultados positivos, ou seja, conseguiram-se obter plantas tetraplóides (Urwin *et al.*, 2007). Como *L. angustifolia*, *L. multifida* e *L. viridis* pertencem todas ao mesmo género, optou-se por também se utilizar a colquicina na indução da poliploidia.

De acordo com a literatura, existe uma correlação negativa entre o desenvolvimento dos explantes e a concentração e tempo de exposição ao agente c-mitótico (Antunes, 2010; Vainola, 2000). Assim, neste trabalho, foi utilizado uma concentração de colquicina intermédia, 125 mg/L, e definiram-se 6 dias como tempo de exposição. Contudo, mesmo com estes valores, após a indução da poliploidia surgiram explantes que inicialmente não se desenvolveram e alguns dias depois da exposição tornam-se ligeiramente necróticos no caule, por vezes apenas na parte basal. Só mais tarde, começaram a aparecer manchas necróticas nas folhas e pouco tempo depois ocorreu a senescência. Esta situação foi particularmente notória em *L. viridis*.

Ao analisarem-se as taxas de sobrevivência e desenvolvimento dos explantes pôde constatar-se que estas foram relativamente baixas. Dos 60 explantes iniciais que foram expostos à colquicina (30 pertencendo a *L. multifida* e 30 pertencendo a *L. viridis*), apenas 20% dos explantes de cada espécie se desenvolveram e foram analisados por citometria de fluxo. Contudo, nos explantes que não foram expostos ao agente c-mitótico (controlo), em *L. viridis* também se verificaram taxas de desenvolvimento baixas- apenas 33,3%. Nesta espécie, a reduzida taxa de desenvolvimento no grupo controlo pode ser explicada devido ao meio utilizado na inoculação dos explantes: MS suplementado com 0,2 mg/L de BAP. As citocininas promovem o desenvolvimento dos meristemas, porém, em fases mais adiantadas do crescimento da plântula, a presença destas hormonas não favorece o desenvolvimento dos rebentos (Canhoto, 2010). Contrariamente aos estudos de Dias *et al.* (2002) e Nogueira & Romano (2002), em que a citocinina favoreceu o desenvolvimento dos rebentos, neste trabalho, em *L. viridis*, obtiveram-se taxas de desenvolvimento baixas, podendo estes dados levar a supor que, de alguma forma, esta citocinina influenciou negativamente o desenvolvimento dos rebentos. Assim, novos ensaios para testar a influência de outras hormonas e otimizar esta etapa são necessários.

Apesar das taxas de sobrevivência e desenvolvimento terem sido baixas para ambas as espécies, foi possível obter um número aceitável de plântulas passíveis de serem analisadas por citometria de fluxo, verificando-se através desta técnica que todas as plântulas originadas do tratamento com colquicina eram mixoplóides.

Se por um lado os mixoplóides são indicadores de condições de indução insuficientes, por outro lado são importantes como indicadores de um efeito positivo no tecido exposto, podendo vir a constituir uma vantagem, caso o tecido venha a evoluir para a tetraploidia. Estes resultados foram já conseguidos por Vainola (2000), onde em híbridos de *Rhododendron*, muitos dos mixoplóides obtidos permaneceram iguais, um terço reverteu para a diploidia e apenas uma pequena parte evoluiu para a tetraploidia.

De facto, em *L. viridis*; obtiveram-se 2 plantas tetraplóides após 2 meses de terem sido colocadas em terra e reanalisadas por citometria de fluxo. No entanto, a maioria das plantas reverteu para o estado inicial de diploidia, permanecendo apenas uma planta mixoplóide em *L. multifida* e uma em *L. viridis*.

Na reanálise das plantas quer de *L. multifida* quer de *L. viridis* foi utilizado um padrão diferente (*Glycine max*) do que o utilizado nos primeiros ensaios (*Pisum sativum*). Optou-se por se fazer esta alteração uma vez que o pico correspondente à fase G₀/G₁ de *Pisum sativum* encontra-se muito afastado dos picos pertencentes a *L. multifida* e a *L. viridis*, conseguindo-se visualizar no mesmo histograma as duas espécies somente em escala logarítmica. Assim, utilizou-se o padrão *Glycine max*, cujo conteúdo em DNA é muito mais próximo das espécies em estudo neste trabalho.

Como era esperado, nas duas espécies, todas as plântulas dos grupos controlo são diplóides, o que confirma que os mixoplóides e tetraplóides obtidos se devem exclusivamente aos tratamentos que foram efetuados.

Os resultados obtidos por citometria de fluxo indicam que ainda terão que ser desenvolvidos mais esforços na otimização do processo de indução de tetraplóides nas duas espécies estudadas.

4.3 – Observação do cariótipo das plântulas

O número de cromossomas tem vindo a ser utilizado como um carácter taxonómico por muitos autores. Por exemplo, a secção Pterostoechas é caracterizada por $2n= 20, 22, 24, 36$, incluindo-se nesta secção *L. multifida*, com um número de cromossomas $2n=24$ (Scheel, 1931; Garcia, 1942; Upson, 1997, todos cit em Upson & Andrews, 2004). Por sua vez, a secção Stoechas (onde se inclui *L. viridis*) é caracterizada por um número de cromossomas de $2n=30$ (Garcia, 1942; Upson, 1997 cit em Upson & Andrews, 2004).

Porém, a possibilidade da ocorrência de erros na contagem dos cromossomas não pode ser colocada de parte, pois na família Lamiaceae esta é difícil de realizar (Upson & Andrews, 2004). Isto acontece devido ao tamanho reduzido dos cromossomas (Upson & Andrews, 2004; Urwin, 2009) e à presença de óleos essenciais no citoplasma, o que pode levar a uma subestimação na contagem do número de cromossomas (Upson & Andrews, 2004). Talvez por estas razões a técnica com a coloração de Feulgen não tivesse resultado em *L. multifida* e *L. viridis*. Assim, é necessário otimizar a técnica para que em ensaios futuros se consiga visualizar o cariótipo das lavândulas.

4.4 – Microscopia eletrónica de varrimento

Como acontece na maioria das espécies das Lamiaceae, as folhas de *L. multifida* e *L. viridis* possuem um indumento rico em tricomas de revestimento e tricomas glandulares. Os tricomas de revestimento são predominantemente multicelulares e muito ramificados, como referido para outras espécies da família (ex. Marin *et al.* 2006 cit em Zuzarte, 2007).

Quanto aos tricomas glandulares, Zuzarte (2012) descreveu 5 tipos de tricomas glandulares em *L. multifida*: tipo “misto” ramificado, bifurcado, peltado e capitados tipo I e tipo II. Já em *L. viridis* foram descritos 4 tipos: bifurcados, peltados, capitados tipo I e tipo II.

No presente trabalho, foram analisados os tipos de tricomas mais frequentes e com maior densidade: tricomas peltados em *L. multifida* e tricomas peltados e capitados tipo II em *L. viridis*.

Relativamente aos diâmetros dos tricomas glandulares foram encontradas diferenças significativas entre as amostras foliares de *L. multifida* e *L. viridis* que foram expostas à colquicina, comparativamente com os controlos. Em *L. multifida* os diâmetros dos tricomas glandulares peltados das plântulas expostas à colquicina tinham 74,7 µm, enquanto os das plântulas controlo tinham 64,8 µm. Em *L. viridis*, as diferenças foram mais notórias, tendo os tricomas glandulares peltados das plântulas que foram tratadas com colquicina 78,8 µm de diâmetro e as do controlo 62,46 µm. Nos tricomas glandulares capitados tipo II também foram detetadas diferenças, tendo os das plântulas sujeitas à colquicina 21,77 µm e os das plântulas que não foram expostas ao agente c-mitótico 18,2 µm. Segundo Urwin *et al.* (2007), em *L. angustifolia* diferenças no diâmetro dos tricomas estão relacionadas com a alteração do nível de ploidia da espécie, sendo portanto um dado indicativo de um aumento de ploidia nas plântulas tratadas. Assim, pode perspetivar-se que o rendimento em óleos essenciais

(principalmente em *L. viridis* onde as diferenças no tamanho dos tricomas são mais evidentes) será maior nas plântulas que foram expostas à colquicina do que as do controlo.

4.5 – Aclimação de *L. multifida* e *L. viridis* e análise das plantas aclimatadas

A aclimação de plantas produzidas *in vitro* do género *Lavandula* é geralmente simples, raramente tendo sido observadas alterações morfológicas e as taxas de sobrevivência são altas (Gonçalves & Romano, 2013). Nas plântulas de *L. multifida* e *L. viridis* selecionadas para aclimação verificou-se mais uma vez que este processo é eficaz, tendo-se verificado que 93,1% das plântulas desenvolveram bem e de forma rápida, apresentando um fenótipo aparentemente normal.

Após os ensaios de citometria de fluxo para análise da ploidia das plantas aclimatadas, procedeu-se à observação e registo de algumas características morfológicas. Não se observaram diferenças significativas na maioria das características registadas, exceto na largura da maior folha, em *L. viridis*. Neste caso, através do teste ANOVA, foi possível detetar que entre as plantas diplóides e as plantas tetraplóides, existem diferenças significativas na largura das folhas nesta espécie. Estes dados estão em concordância com os obtidos em SEM, onde se verificou que as plântulas sujeitas ao tratamento possuíam diâmetros dos tricomas maiores do que as do controlo.

Também foi efetuada a contagem do número de cloroplastos presentes nas células estomáticas de *L. multifida* e *L. viridis*. Estudos anteriores em plantas tetraplóides, espontâneas ou induzidas, têm mostrado que o número de estomas e o número de cloroplastos nas células guarda varia significativamente consoante a ploidia da planta (Tandon & Bali, 1957; Speckmann *et al.*, 1965; Tan & Dunn, 1973; Cohen & Yao, 1996; Beck *et al.*, 2003; Urwin *et al.*, 2007).

Em algumas espécies a contagem dos cloroplastos tem uma precisão confiável na avaliação dos níveis de ploidia das plantas, enquanto noutras tal não acontece (Alves, 2012). No caso de *L. viridis*, verificou-se que há diferenças significativas entre o número de cloroplastos nas células de guarda das plantas tetraplóides (≈ 25) quando comparados com os das plantas diplóides (≈ 15). O número de cloroplastos da planta mixoplóide não variou do número de cloroplastos das plantas tetraplóides. No caso de *L. multifida*, não se verificaram diferenças significativas entre as plantas diplóides (≈ 11) e a planta mixoplóide (≈ 14). Tal

pode ser justificado pelo facto dos cloroplastos observados pertencerem a células diplóides e a não se ter visualizado células tetraplóides.

4.6 – Embriogénese somática

Apenas um estudo preliminar de embriogénese somática em *L. vera* foi realizado por Kintzios *et al.* (2002) cit em Bona (2012), justificando o desenvolvimento de novos protocolos para as restantes espécies do género.

Neste trabalho foram utilizados explantes foliares de plântulas mantidas em cultura de *L. multifida* e procedeu-se à indução de tecido caloso embriogénico. Esta espécie foi seleccionada, visto que os seus óleos essenciais mostraram atividade antifúngica relevante (Zuzarte *et al.*, 2011b) mas a sua exploração industrial está limitada pelo baixo rendimento da planta em óleo essencial.

Os resultados obtidos no que diz respeito aos tecidos embriogénicos não foram conclusivos, apesar de terem sido identificadas umas estruturas globulares, de coloração esbranquiçada, que podem ter algum potencial na formação de embriões somáticos.

5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS



5.1- Conclusões

As coleções de laboratório constituem uma base relevante para a propagação de plântulas em larga escala num curto espaço de tempo, pois evitam a colheita de plantas no habitat natural bem como as etapas de desinfecção e estabelecimento dos explantes. De uma forma geral, o meio MS mostrou ser adequado para a indução de poliploidia, proliferação, alongamento e enraizamento dos rebentos em *L. multifida* e *L. viridis*.

O tratamento dos explantes com colquicina permitiu a obtenção de uma planta mixoplóide em *L. multifida* e duas plantas tetraplóides e uma mixoplóide em *L. viridis*, apesar das taxas de indução de poliploidia terem sido baixas. Tendo em conta o número de explantes cultivados e analisados nas duas espécies, não foi possível estabelecer um protocolo eficaz nem definir com exatidão quais as condições e parâmetros mais importantes a considerar para a obtenção de taxas elevadas de indução de poliplóides. Neste sentido, são necessários realizar mais ensaios de forma a otimizar o processo em diversos parâmetros incluindo meio de cultura, reguladores de crescimento, tipo de explante, concentração e tempo de exposição ao agente c-mitótico, entre outros.

Os níveis de ploidia foram confirmados por análises de citometria de fluxo, SEM e quantificação do número de cloroplastos. O aumento do diâmetro dos tricomas glandulares (peltados e capitados do tipo II) bem como o aumento do número de cloroplastos pode conduzir a um aumento da produção de óleos essenciais. O rendimento em óleo essencial é um fator limitativo para a exploração industrial de muitas plantas aromáticas. A obtenção de plantas com um rendimento elevado constitui, por isso, uma mais-valia económica justificando a futura exploração destas espécies.

O processo de enraizamento e aclimação das plântulas foi conseguido com sucesso, sendo possível a transferência para terra de um número considerável de plântulas. Estas desenvolveram-se bem e estão, neste momento, aptas para transferência para o meio exterior.

Em relação aos ensaios em embriogénese somática, não foi possível obter um protocolo eficaz para a indução de embriões somáticos. Porém, das hormonas e concentrações utilizadas, obtiveram-se resultados mais promissores com 2,4-D (2 mg/L) + cinetina (0,5 mg/L), uma vez que se formaram estruturas globulares que poderão ter potencial embriogénico.

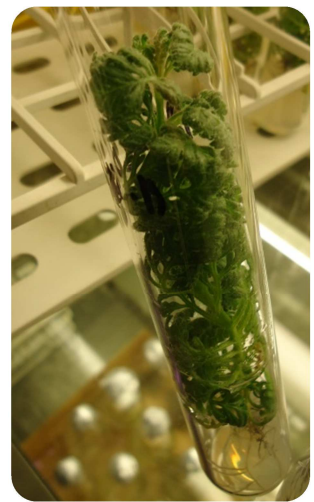
5.2- Perspetivas futuras

Apesar do principal objetivo do trabalho ter sido cumprido pois foi possível obter plantas tetraplóides em *L. viridis*, trabalhos futuros estão a ser considerados de forma a comprovar as vantagens da produção de tetraplóides nesta espécie. Em primeiro lugar, as plantas aclimatadas serão transferidas para o exterior com uma monitorização regular para deteção de possíveis alterações que possam ocorrer no desenvolvimento das plantas tetraplóides. Numa etapa seguinte, plantas adultas, perfeitamente desenvolvidas e em floração, serão utilizadas para a extração e análise química dos óleos essenciais. Nesta fase serão comparados o rendimento e a composição química dos óleos essenciais produzidos por plantas diplóides, mixoplóides e tetraplóides.

Finalmente, trabalhos futuros incluem a realização de novos ensaios de indução de poliploidia, com vista à obtenção de taxas mais elevadas de poliplóides. Os ensaios incluem a avaliação do efeito de diferentes concentrações de colquicina e a utilização de outros agentes c-mitóticos como a orizalina. Adicionalmente, o cruzamento de plantas tetraplóides com diplóides será considerado de forma a obter variedades triplóides, que poderão apresentar características interessantes.

Por fim, novos ensaios de embriogénese somática são justificados, a fim de se conseguir estabelecer um protocolo eficaz para a indução de embriões somáticos e avaliar o potencial embriogénico de plantas mixoplóides e tetraplóides.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Al-Bakhit A., Sawwan J. & Al-Mahmoud M., 2007. ***In vitro* Propagation of Two *Lavandula* Species: *Lavandula angustifolia* and *Lavandula latifolia* L. *Medica***. Jordan Journal of Agricultural Sciences, 3: 16-25.
- Alves A., 2012. **Ensaaios de embriogénese somática e transformação genética em tamarilho (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.)**. Tese de Mestrado, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.
- Antunes P., 2010. **Indução de plantas tetraplóides *in vitro* através de tratamento com agentes c-mitóticos no tamarilho (*Cyphomandra betacea*) e no medronheiro (*Arbutus unedo*)**. Tese de Mestrado, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.
- Antunes T., Sevinate-Pinto I., Barroso J. & Cavaleiro C., 2004. **Micromorphology of trichomes and composition of essential oil of *Teucrium capitatum***. Flavour and Fragrance Journal 19: 336-340.
- Ascensão L., Marques N. & Pais M., 1995. **Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae)**. Annals of Botany 75: 619-626.
- Ascensão L., Mota L. & De M. Castro M., 1999. **Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry**. Flora 185: 65-70.
- Beck S., Dunlop R. & Fossey A., 2003. **Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild)**. Botanical Journal of the Linnean Society 41: 177-181.
- Boeckelmann A., 2008. **Monoterpene production and regulation in Lavenders (*Lavandula angustifolia* and *Lavandula x intermedia*)**. Master thesis, University of British Columbia, Okanagan.

- Bona C., Santos G. & Biasi L., 2012. **Lavandula calli induction, growth curve and cell suspension formation.** Revista Brasileira de Ciências Agrárias. Recife 7:17-23.
- Bouwmeester H., 2006. **Engineering the essence of plants.** Nature Biotechnology 24:1359-1361.
- Brown D. & Thorpe T., 1995. **Crop improvement through tissue culture.** World Journal of Microbiology & Biotechnology 11: 409-415.
- Brud W., 2010. **Industrial Uses of Essential Oils** In: Baser K. & Buchbauer G. *Handbook of Essential Oils, Science, Technology and Applications.* CRC Press. Disponível em <http://pt.scribd.com/doc/61792728/Handbook-of-Essential-Oils-ScienceTechnologyand-Applications> (acedido a 10.06.12).
- Bruneton J., 1991. **Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales.** 2^a ed. Lavoisier. Paris.
- Calvo M. & Segura J., 1989. **In vitro propagation of Lavander.** Horticultural Science 24:375-376
- Camadro E., & Peloquin S., 1980. **The occurrence and frequency of 2n pollen in three diploid Solanums from northwest Argentina.** Theoretical Journal of Applied Genetics 56: 11-15.
- Canhoto J., 2010. **Biotecnologia Vegetal - da clonagem de plantas à transformação genética** (1^a Ed). Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Caperta A., Delgado M., Ressurreição F., Meister A., Jones R., Viegas W. & Houben A., 2006. **Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells.** Protoplasma 227: 147-153.
- Cela P., Gamarra R. & Viñas J., 2003. **Árboles y Arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares** (4^a Ed). Ediciones Jaguar, S.A. Madrid

- Chauvin J., Souchet C., Dantec J. & Ellissèche F., 2003. **Chromossome doubling of 2x *Solanum* species by oryzalin: method development and comparison with spontaneous chromosome doubling *in vitro*.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 65-73.
- Cohen D. & Yao J., 1996. ***In vitro* chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47: 43-49.
- Copping L. & Duke S., 2007. **Review Natural products that have been used commercially as crop protection agents.** *Pest Management Science* 63:524-554.
- Chawla H., 2010. **Introduction to Plant Biotechnology** (3^a Ed). Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA.
- Darlington C. & La Cour L., 1976. **The Handling of Chromosomes** (6^aEd). George Allen & Unwin Ltd. London pp. 125-6.
- De La Cruz, M., 2006. **O Uso de Óleos Essenciais na Acupuntura.** Universidade de Cuiabá. Programa de pós-graduação em acupuntura. Cuiabá.
- Dhooghe E., Grunewald W., Leus L. & Labeke M., 2009. ***In vitro* polyploidization of *Helleborus* species.** *Euphytica* 165: 89-95.
- Dias M., Almeida R. & Romano A., 2002. **Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L'Hér through *in vitro* axillary shoot proliferation.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 99-102.
- Doležel J., Sgorbati S. & Lucretti, S., 1992. **Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants.** *Physiologia Plantarum* 85: 625-631.
- Edris A., 2007. **Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review.** *Phytotherapy Research* 21: 308-323.

- Escandón A., Miyajima I., Alderete M., Hagiwara J., Facciuto G., Mata D. & Soto S., 2005. **Wild ornamental germplasm exploration and domestication based on biotechnological approaches. *In vitro* colchicine treatment to obtain a new cultivar of *Scoparia montevidensis*.** *Electronic Journal of Biotechnology* 8: 204-211.
- Faizal A., Foubert K., Lambert E., De Storme N., Claeys M., Apers S. & Geelen D., 2013. **Saponin production is not qualitatively changed upon callus regeneration in the medicinal shrub *Maesa perlaris*.** *Plant Growth Regulation* 70: 39–48
- Flora on, 2010. Sociedade Portuguesa de Botânica. Disponível em <http://www.flora-on.pt/index.php>
- Franco J., 1984. **Nova Flora de Portugal (Continente e Açores).** Volume II – Clethraceae – Compositae. Lisboa, pp. 186-189.
- Franco, A., Oliveira, T., Ferri, P., Bara, M., De Paula, J., 2007. **Evaluation of the chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc., *Ocimum gratissimum* L. and *Curcuma longa* L.** *Revista Eletrônica de Farmácia* 4: 208-220.
- Gilly G., 1997. **Les Plantes à Parfum et Huiles Essentielles à Grasse.** Editions L' Harmattan. Paris.
- Gonçalves S. & Romano A., 2013. **Micropropagation of *Lavandula* spp.** *In: Lambardi M., et al. Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants, Methods in Molecular Biology*, Springer Science Business Media. New York. Vol. 994
- González-Coloma A., Martín-Benito O., Mohamed N., García-Vallejo M. & Soria, A., 2006. **Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different populations of *Lavandula luisieri*. L.** *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 609-616

- Hedge I., 1979. **Labiatae, The Mint Family** In: Heywood V. *Flowering Plants of the World*. London: Oxford University Press p. 239.
- Lima A., 2009. **Estratégias para caracterização molecular de espécies aromáticas da flora Portuguesa**. Tese de Mestrado, Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.
- Loureiro J., 2007. **Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal**. Tese de Doutoramento, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro.
- Lyrene P., Vorsa N. & Ballington J., 2003. **Polyploidy and sexual polyploidization in the genus *Vaccinium***. *Euphytica* 133: 27-36.
- Machado M., 2011. **Micropropagação e composição química do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* Miller**. Tese de Doutoramento, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Marin M., Koko V., Duletić-Laušević S., Marin P., Rančić D. & Dajic-Stevanovic Z., 2006. **Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: morphology, stereology and histochemistry**. *South African Journal of Botany* 72: 378-382.
- Morales R., 2010. ***Lavandula* L.** In: Castroviejo S. *et al.*, *Flora Iberica. Plantas Vasculares de la Peninsula Ibérica e Islas Baleares*. Vol XII – Verbenaceae, Lamiaceae, Callitrichaceae. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid.
- Murashige T. & Skoog F., 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nobre J., 1996. ***In vitro* cloning and micropropagation of *Lavandula stoechas* from field grown plants**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46: 151-155.
- Nogueira J. & Romano A., 2002. **Essential Oils from Micropropagated Plants of *Lavandula viridis***. *Phytochemical Analysis* 13: 4-7.

- Olsen R., Ranney T. & Vilorio Z., 2006. **Reproductive behavior of induced allotetraploid x *Chitalpa* and *in vitro* embryo culture of polyploid progeny.** Journal of the American Society of Horticultural Sciences. 131: 716-724.
- Petersen K., Hagberg P. & Kristiansen K., 2002. ***In vitro* chromosome doubling of *Miscanthus sinensis*.** Plant Breeding 121: 445-450.
- Petersen K., Hagberg P. & Kristiansen K., 2003. **Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 137-146.
- Petrovska B., 2012. **Historical review of medicinal plants' usage.** Phcog Rev [serial online]; 6:1-5 Disponível em <http://www.phcogrev.com/tex.asp?2012/6/11/1/95849> (accedido a 14.06.13)
- Proença da Cunha A., Cavaleiro C. & Salgueiro L., 2005- **Fármacos aromáticos (Plantas aromáticas e óleos essenciais).** In: Proença da Cunha, A. (Coord.). 2005. **Farmacognosia e Fitoquímica.** Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. Cap. 16, pp 338-401.
- Raev R., Jordanov R. & Zheljazkov V., 1996. **Induced Polyploidy in Lavander.** ISHS Acta Horticulturae 426: International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. Amherst, USA. Disponível em http://www.actahort.org/books/426/426_61.htm (accedido a 20.06.13).
- Salgueiro L., 1994. **Os tomilhos portugueses e seus óleos essenciais.** Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Sangwan N., Farooqi A., A., Shabih F. & Sangwan R., 2001. **Regulation of essential oil production in plants.** Plant Growth Regulation 34: 3-21.
- Shao J., Chen C. & Deng X., 2003. ***In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*).** Plant Cell, Tissue and Organ Culture 75: 241-246.

- Speckmann G., Post J. & Dijkstra H., 1965. **The length of stomata as an indicator for polyploidy in rye grasses.** *Euphytica* 14: 225–230.
- Suárez-Cervera M., 1986. **Aportación a la Cariología del Género *Lavandula* L.** *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 42: 389-394.
- Suárez-Cervera M. & Seoane-Camba, J., 1986. **Taxonomía numérica de algunas especies de *Lavandula* L., basada em caracteres morfológicos, cariológicos y palinológicos.** *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 42: 395-409.
- Tan G. & Dunn G., 1973. **Relationship of stomatal length and frequency and pollen grain diameter to ploidy level in *Bromus inermis* Leyss.** *Crop Science* 13: 332–334.
- Tandon S. & Bali P., 1957. **Morphological and cytological studies of the diploid and the colchicine-induced tetraploid in *Linaria vulgaris*.** *Genetica* 29: 101–109.
- Tavares A., Salgueiro L. & Canhoto J., 2010. **In vitro propagation of the wild carrot *Daucus carota* L. subsp. *halophilus* (Brot.) A. Pujadas for conservation purposes.** *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 46: 47–56.
- Tsuro M., Koda M. & Inoue M. 1999. **Comparative effect of different types of cytokinin for shoot formation and plant regeneration from leaf-derived callus of lavender (*Lavandula vera* DC).** *Scientia Horticulturae* 81: 331-336.
- Upton T., 2002. **The taxonomy of the genus *Lavandula* L.** In: Lis-Balchin M. *Lavender- The genus *Lavandula**. Taylor & Francis New Fetter Lane, London. 1: 2-35.
- Upton T. & Andrews S., 2004. **The genus *Lavandula***. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Urwin, N., Horsnell J. & Moon T., 2007. **Generation and characterisation of colchicine-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*.** *Euphytica* 156: 257–266.

- Urwin N. & Mailer R., 2008. **Oil Content and Fatty Acid Profiles of Seed Oil from the Genus *Lavandula***. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85: 491–492.
- Urwin N., 2009. **Improvement of Lavender Varieties by Manipulation of Chromosome Number**. Rural Industries Research and Development Corporation. Australia.
- Vainola A., 2000. **Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids**. *Euphytica* 112: 239-244.
- Vianna J., 2009. **Caracterização Anatômica, Morfológica e Química de Quimiotipos de *Ocimum gratissimum* Lineu**. Tese de Mestrado, Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Veterinária, Brasília.
- Yang X., Cao Z., An L., Wang Y. & Fang X., 2006. ***In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.)**. *Euphytica* 152: 217-224.
- Yunes R., Pedrosa R. & Cechinel Filho V., 2001. **Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil**. *Química Nova* 24: 147-152.
- Zhang Z., Dai H., Xiao M. & Liu X., 2008. ***In vitro* introduction of tetraploids in *Phlox subulata* L.** *Euphytica* 159: 59-65.
- Zuzarte M., 2007. ***Lavandula pedunculata* (Miller) Cav.: estruturas secretoras, óleos essenciais e cultura *in vitro***. Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- Zuzarte M., Dinis A., Cavaleiro C., Salgueiro L. & Canhoto J., 2010. **Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae)**. *Industrial Crops and Products* 32: 580-587.

Zuzarte M., Gonçalves M., Cavaleiro C., Canhoto J., Vale-Silva L., Silva M.J., Pinto E. & Salgueiro L., 2011a. **Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér.** Journal of Medical Microbiology 60: 612-618.

Zuzarte M., Vale-Silva L., Gonçalves M., Cavaleiro C., Vaz S., Canhoto J., Pinto E. & Salgueiro L., 2011b. **Antifungal activity of phenolic-rich *Lavandula multifida* L. essential oil.** European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 3: 1359-1366.

Zuzarte M., 2012. **Portuguese lavenders: evaluation of their potential use for health and agricultural purposes.** Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra.

Zar J., 1984. **Biostatistical Analysis.** Prentice-Hall International, Inc. London.