Xavier da Costa Albano

Melhoramento vegetal em *Lavandula multifida* e *Lavandula pedunculata* indução de poliploidia e análise morfológica e fisiológica

Dissertação de Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, orientada pelo Professsor Doutor Jorge Manuel Leal Pataca Canhoto, apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Julho 2016

· U C ·

Universidade de Coimbra

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Melhoramento vegetal em *Lavandula multifida* e *Lavandula pedunculata*: indução de poliploidia e análise morfológica e fisiológica

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 de Professsor Doutor Jorge Manuel Leal Pataca Canhoto (Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra)

Xavier da Costa Albano

2016

"…it is impossible to live without failing at something, unless you live so cautiously, that you might as well not have lived at all, in which case you fail by default."

J. K. Rowling

Agradecimentos

A todas as pessoas que sempre me apoiaram durante o meu período académico, em especial durante a fase de realização da tese de mestrado.

Ao Dr. Jorge Canhoto, pela sua orientação, disponibilidade, pela transmissão de conhecimentos e pela cuidadosa revisão da dissertação.

Ao João Martins, porque sem ele o trabalho laboratorial seria uma tarefa ainda mais complicada, um agradecimento sincero por toda a paciência que tiveste e por todo o tempo que te ocupei.

Ao Dr. João Loureiro, à Mariana Castro, à Lucie Mota e à Daniela Tavares, por toda a ajuda e aconselhamento no que diz respeito à citometria de fluxo.

À Dona Isabel por toda a boa disposição e ajuda no que diz respeito ao material de laboratório.

Ao laboratório TAIL-UC fundado pelo programa QREN - Mais Centro, projeto ICT_2009_02_012_1890, e em particular ao doutor Pedro Sidónio pela sua preciosa ajuda na Microscopia Eletrónica de Varrimento.

A todos os meus colegas de laboratório por toda a ajuda, boa disposição e permanentes bons conselhos.

Aos "amigos de Coimbra" Filipe, Stefan, Bruno, Joana por todo o apoio, paciência e ajuda na realização deste trabalho.

À Carolina, à Cristiana, à Isa, à Bea, à Margarida, à Rita, ao Ricardo, ao Paulo, ao Alexandre, ao Xico por todos os momentos que partilhámos nestes últimos anos. Ao Zé Miguel e ao Diogo, os meus mais antigos amigos.

À Maria, por todo o apoio, companheirismo e por todos os anos à nossa frente.

À minha família.

Ao Luís e à Cecília por tudo o que me ajudaram nestes últimos 5 anos.

Um especial agradecimento aos meus pais que sempre apostaram em mim, sem pedir nada em retorno e com um apoio incondicional.

A todos os que passaram positivamente no meu trajeto.

Muito Obrigado.

Índice

Resumo……ix

Abstract……...xi

1. Introdução 1

1.1. Contextualização histórica…… 3

1.2. Importância atual das plantas aromáticas e medicinais…… 4

1.3. Importância económica…….. 5

1.4. Desafios para tornar os cultivares mais produtivos……5

1.5. Biotecnologia vegetal……6

1.5.1. História da biotecnologia vegetal……6

1.5.2. Indução artificial de poliploidia……...7

1.5.3. Agentes c-mitóticos……9

1.6. Citometria de fluxo……...10

1.7. Género *Lavandula*…… 11

1.7.1. *Lavandula multifida* L. ……12

1.7.2. *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. …… 14

1.8. Óleos essenciais……15

1.8.1. Visão geral……15

1.8.2. Estruturas secretoras……..16

1.8.2.1. Estruturas secretoras internas……16

1.8.2.2. Estruturas secretoras externas……17

1.8.3. Tipos de tricomas glandulares presentes em *Lavandula multifida* e *Lavandula pedunculata*……... 17

1.9. Contextualização e objetivos……18

2. Materiais e Métodos 21

2.1. Material vegetal……23
2.2. Estabelecimento de plântulas……... 23
2.3. Multiplicação através da cultura de segmentos nodais…….24
2.4. Indução de poliploidia……..25
2.4.1. Indução com colquicina…….25
2.4.2. Indução com orizalina……... 26
2.5. Parâmetros das culturas analisados…….. 28
2.5.1. Observação dos níveis de sobrevivência e desenvolvimento…… 28
2.5.2. Análise da ploidia por citometria de fluxo…… 28
2.6. Enraizamento……30
2.7. Aclimatação……..30
2.8. Microscopia eletrónica de varrimento……..30

3. Resultados 33

3.1. Ensaios de germinação com sementes de *Lavandula pedunculata* e *Lavandula multifida*…….35
3.2. Multiplicação de segmentos nodais……..36
3.3. Efeito do meio líquido na cultura dos explantes…….. 37
3.4. Citometria de fluxo……...40
3.5. Taxa de indução de poliploidia…….43
3.6. Enraizamento……45
3.7. Aclimatação……..46
3.8. Microscopia eletrónica de varrimento……..54

4. Discussão 57

4.1. Germinação de sementes……..59
4.2. Cultura *in vitro* de segmentos nodais……... 60
4.3. Cultura em meio líquido……...60

4.4. Determinação do nível de ploidia……62
4.5. Enraizamento……63
4.6. Aclimatação……..64
4.7. Tricomas……...65

5. Conclusão e perspetivas futuras **67**

6. Referências **71**

Resumo

O género *Lavandula*, pertencente à família Lamiaceae, compreende 39 espécies com características aromático-medicinais, muitas delas de grande interesse económico devido à produção de óleos essenciais. Os desafios atuais no que diz respeito à procura de produtos naturais exigem a criação de métodos eficazes que previnam a contínua colheita de material selvagem. A otimização de técnicas de propagação *in vitro* e de melhoramento vegetal são essenciais para a exploração do potencial deste género.

Neste estudo foi procurado realizar o melhoramento dos protocolos existentes para a indução de tetraploidia e adaptá-los para as duas espécies em estudo, *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. e *Lavandula multifida* L.

Sementes das duas espécies foram esterilizadas num protocolo desenvolvido para o efeito e colocadas a germinar *in vitro*, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), tendo sido testado o efeito de diferentes concentrações de sacarose no meio (1,5% e 3%), na percentagem total de sementes germinadas. A partir das plântulas resultantes da germinação das sementes, segmentos nodais foram cultivados em meio MS, de modo a criar um número suficiente de plantas para os ensaios posteriores.

Para a indução de tetraploidia segmentos nodais das duas espécies foram expostos a diferentes concentrações de Colquicina (50 μM, 250 μM, 500 μM) e de Orizalina (10 μM, 25 μM, 50 μM), como suplemento a meio MS na forma líquida.

O nível de ploidia das plantas foi avaliado por Citometria de Fluxo e confirmado através da medição das características bidimensionais de complexos estomáticos, fotografados por microscopia eletrónica de varrimento (SEM). As plantas com ploidia de interesse (tetraplóides e mixoplóides), bem como plantas controlo (diplóides), foram enraizadas em meio MS suplementado com 0,2 mg/L de NAA, de modo a passarem para a fase de aclimatação.

A única espécie onde foram obtidos tetraplóides foi *Lavandula pedunculata*, onde foram obtidas 3 plantas tetraplóides bem como 3 plantas mixoplóides, enquanto que em *Lavandula multifida* foi obtido apenas uma planta mixoplóide.

Este trabalho fornece avanços no estudo do estabelecimento destas espécies, desde a fase de germinação, multiplicação *in vitro*, até à fase de aclimatação, porém as condições de indução de tetraploidia necessitam de ser melhoradas de modo a aumentar o número de

indivíduos tetraplóides em *Lavandula pedunculata* e tentar obter tetraplóides em *Lavandula multifida*.

Em trabalhos posteriores será interessante o estudo de uma maior amplitude de concentrações e tempos de exposição aos agentes c-mitóticos, e porventura utilizar agentes diferentes, e na comparação do rendimento e composição química dos óleos produzidos por plantas tetraplóides comparado com as plantas diplóides.

Palavras-chave: Citometria de Fluxo, Colquicina, Microscopia Eletrónica de Varrimento, Orizalina, Tetraplóide.

Abstract

The genus *Lavandula*, belonging to the Lamiaceae family, includes 39 species, with aromatic-medicinal characteristics and great economical interest, mainly due to the production of essential oils. The current challenges concerning the search of natural products demand the creation of effective methods that prevent the harvest of wild plants. The optimization of *in vitro* propagation techniques and of plant improvement are essential to achieve the true potential of this genus.

In this study the aim was to improve some pre-existent protocols of tetraploidy induction, and to optimize them to the species in study, *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. and *Lavandula multifida* L.

Seeds of the 2 species were sterilized and germinated *in vitro* on MS medium (Murashige & Skoog, 1962) containing sucrose (1.5% and 3%), and the percentage of germinated seeds evaluated. The nodal segments of the seedlings resultant of the seeds were cultivated in MS medium, to enhance the number of total plants to be used in the ensuing assays.

To induce tetraploidy, nodal segments of these 2 species were exposed to different Colchicine (50 μM, 250 μM, 500 μM) and Oryzalin concentrations (10 μM, 25 μM, 50 μM), as a supplement to liquid MS medium.

The ploidy level of plants was assessed by flow cytometry and confirmed by analyzing the two-dimensional characteristics of stomatal complexes, photographed by Scanning Electron Microscopy (SEM). The plants with interesting ploidy levels (tetraploids and mixoploids), as well as control plants (diploids), were rooted in MS medium supplemented with 0.2 mg/L of NAA, to become ready to the acclimation phase.

Tetraploidy was only achieved in *Lavandula pedunculata*, a total of 3 tetraploid plants and 3 mixoploid plants, whereas in *Lavandula multifida* only 1 mixoploid plant was obtained.

This work provides numerous advances in the study of the establishment of these 2 species, starting from the germination phase, to the *in vitro* propagation, as well to the acclimation phase. However the conditions in which the tetraploidy was induced need to be improved so that a greater number of tetraploids can be achieved in *Lavandula pedunculata* and to achieve the tetraploid state in *Lavandula multifida*.

In future studies it would be interesting to use a wider range of concentrations and exposing times to the c-mitotic agents, and to try different agents, and to compare the yield and chemical composition of the oils produced by tetraploid and diploid plants.

Key-Words: Colchicine, Flow Cytometry, Oryzalin, Scanning Electron Microscopy, Tetraploid.

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Contextualização histórica

O género *Lavandula* é cultivado desde a antiguidade e desde cedo que os mais diversos povos descobriram as várias valências destas plantas, em termos de saúde, higiene ou apenas pelos apetecíveis aromas.

O termo *Lavandula* descende do latim "lavando", que significa lavar-se, ou o ato de tomar banho. Foi pela primeira vez mencionado na literatura por Dioscorides (40-90 aC), como uma planta com propriedades curativas, laxante, revigorante e propunha a sua utilização na forma de infusão para a cura de problemas de peito. Dioscorides mencionou também Galen (129-99 aC), que antes dos seus estudos já possuía *Lavandula* na sua lista de antídotos contra venenos e Andromachus, 'médico' do imperador Nero, que utilizou plantas deste género para produzir comprimidos anti-veneno e também para distúrbios uterinos (Lis-Balchin, 2002).

Hildegard von Bingen (1098-1179), madre numa abadia durante a idade média, descobriu várias utilizações para as plantas, nomeadamente para duas espécies, *Lavandula vera* e *Lavandula spica*, entre as quais a cura dos piolhos, a descongestão dos olhos e pulmões (num preparado com vinho) e também a utilização dos aromas para dormir descansadamente (Lis-Balchin, 2002). John Gerard (1545-1612) indicou a utilização de *Lavandula vera* para enxaquecas, epilepsia, desmaios e problemas de coração e *Lavandula stoechas* para dores de cabeça ocasionais, como tratamento anti-veneno e para constipações. Segundo o mesmo autor também tinha utilidade em casos de epilespsia, apoplexia e outros problemas similares. John Parkinson (1567-1650), boticário do rei James I de Inglaterra, foi o primeiro a mencionar o efeito benéfico das sementes de *Lavandula*, neste caso para o tratamento de parasitas intestinais (Lis-Balchin, 2002).

Em 1737 Lineu criou o género *Lavendula*, com o objetivo de criar uma divisão para as plantas até então conhecidas como *Stoechas*, *Stoechas vulgaris* (*L. stoechas*), *Stoechas follis dentatis* (*L. dentata*), *Stoechas pedunculata* (*L. pedunculata*), entre outras. Mais tarde substituiu o termo *Lavendula* pelo atualmente aceite *Lavandula* (*Upson & Andrews, 2004).*

Maud Grieve (1858-1941), autora do livro "A Modern Herbal", foi muito importante no decorrer da primeira Guerra Mundial, ensinando a população a cultivar, colher, secar e utilizar várias plantas medicinais, de entre as quais *Lavandula*, à qual atribuiu várias funções úteis em tempos de guerra (Lis-Balchin, 2002). Quando aplicado o óleo massajando membros lesionados ou paralisados, este ajudava à sua recuperação e quando aplicado quente, ajudava à recuperação de situações de dor localizada (Lis-Balchin, 2002). Os óleos eram também úteis em situações de perda de voz. Para lesões expostas, compressas embebidas no óleo eram colocadas

diretamente no local em questão devido aos seus efeitos antibióticos. Em termos veterinários, identificou o óleo como útil para as situações de infestação por pulgas e outros parasitas da pele e do pelo.

Desde os primeiros registos que a *Lavandula* é associada à higiene e à pureza. Os perfumes à base do óleo de *Lavandula* foram produzidos principalmente a partir do século XVI (os anteriores a esta data consistiam principalmente de uma mistura de ervas), quando as técnicas de destilação sofreram relevantes progressos em termos práticos e qualidade (Lis-Balchin, 2002).

1.2. Importância atual das plantas aromáticas e medicinais

A generalidade das plantas aromáticas e medicinais assumem um papel muito importante nos países em desenvolvimento, sendo que cerca de 80% da população destes países depende diretamente destas plantas no dia-a-dia (Zuzarte *et al*., 2010).

A necessidade de melhorar a produtividade destas plantas levou à criação de programas de melhoramento vegetal, de entre os quais programas relacionados com a indução de poliploidia, visto que mesmo com os avanços dos últimos anos na indústria dos químicos sintéticos, cerca de 25% dos medicamentos prescritos ainda derivam destas plantas. A crescente procura por produtos naturais, vistos como alternativas viáveis às drogas e inseticidas mais comuns, também acentuou o interesse na investigação destas plantas, com a indústria das plantas aromáticas e medicinais a ganhar novamente relevo tanto no sector da saúde como no sector agrícola. (Kong *et al*., 2003; Zuzarte *et al*., 2010). Os últimos avanços nesta área dizem respeito à criação/descoberta de compostos biodegradáveis e que não apresentam toxicidade para humanos e animais.

Um dos aspetos que mais necessita de refinamento no caso das plantas aromáticas é a grande variabilidade na composição química dos seus óleos, muito variável devido a fatores ambientais e genéticos (Figueiredo *et al*., 2008; Zuzarte *et al*., 2010), sendo necessária a criação de metodologias que uniformizem o quimótipo, com o objetivo de obter uma otimização qualitativa que produza um bom produto final.

O desenvolvimento de técnicas *in vitro* de multiplicação também se torna útil se virmos que como resultado da crescente procura por estas plantas, várias espécies se encontram atualmente em perigo de extinção devido ao sobre uso das mesmas e que outras estão a caminhar nessa direção, a utilização práticas agrícolas incorretas e a constante destruição dos seus ecossistemas naturais são fatores que também contribuem para este fenómeno.

1.3. Importância económica

A principal importância ao nível económico do género *Lavandula* reside na produção de óleos essenciais, a partir da destilação dos seus ramos floridos, e cujo se valor se estima ser entre 200 e 1000 toneladas de óleo por ano. Os principais produtores são Europeus, nomeadamente França, Bulgária e Rússia (Ministério da Agricultura, Floresta e Pescas da África do Sul, "Lavender production").

Em termos de produção de óleos, os poliplóides podem ser úteis, dado que os tricomas glandulares naturalmente já exibem regularmente episódios de endopoliploidia, que resultam numa superior atividade genética, bem como em taxas de transpiração mais baixas, superiores taxas fotossintéticas, um período de floração mais alargado, um crescimento menos acentuado mas maior resistência a stresses abióticos (stress hídrico, nutrientes, frio) e a fitopatologias (Levin, 1983; Dhawan & Lavania, 1996). Em espécies cuja reprodução seja feita de modo vegetativo e em que os metabolitos secundários de interesse sejam produzidos por tecidos específicos, é muito interessante o aumento da ploidia de modo a aumentar a rentabilidade de uma dada planta.

A qualidade dos óleos e o seu respetivo valor comercial são primariamente determinados pela sua composição química. Os óleos podem possuir mais de 100 componentes, sendo que em *Lavandula* esses compostos são maioritariamente terpenóides (Zuzarte *et al*., 2012). De entre as várias técnicas para a extração dos óleos, a principal e mais utilizada é a destilação, outras técnicas utilizadas são a utilização de solventes e a extração com CO_2 líquido.

1.4. Desafios para tornar os cultivares mais produtivos

A mecanização e o constante desenvolvimento de técnicas agrícolas levam atualmente a uma enorme redução da área necessária para uma produção agrícola ser rentável, bem como da mão-de-obra necessária para o seu estabelecimento e funcionamento. Porém com o constante aumento da população mundial e consequente aumento das necessidades alimentares, de condições de saúde, de necessidades cosméticas, são constantemente criados novos desafios para aumentar a produtividade dos vários cultivares (Miflin, 2000).

Além do problema do aumento da população mundial, outros problemas como a degradação dos solos e diminuição da área arável, a diminuição de água para rega disponível e o aumento de certos problemas ambientais, aumentam também a pressão para o desenvolvimento/melhoramento dos cultivares (Borlaug & Dowswell, 2005). Estes fatores

conduzem à premente necessidade da produção de novas variedades vegetais mais competitivas/rentáveis, ou de melhorar as variedades já existentes (Haussman *et al*., 2004; Khush, 2005)

As melhorias necessárias são muitas e podem ser introduzidas de várias maneiras, dependendo da cultura e do local em questão. O aumento do valor nutritivo, do tamanho de determinado órgão de uma planta, da resistência a determinada praga ou a um alargamento da gama de condições ambientais em que uma planta se consegue desenvolver são todas melhorias de interesse para vários cultivares e que a biotecnologia vegetal tem de conseguir resolver (Allard, 1999).

1.5. Biotecnologia vegetal

1.5.1. História da biotecnologia vegetal

Os primeiros trabalhos de biotecnologia podem ser atribuídos a Schleiden (1838) e Schwann (1839), quando, em trabalhos separados, propuseram a célula como unidade primária de todos os organismos vivos. Ao serem unificados, estes trabalhos foram essenciais ao desenvolvimento da teoria celular. Vöchting (1878) foi o primeiro a realizar estudos concretos para provar a totipotência das células vegetais, cultivando fragmentos de tecidos cada vez menores e acabando por concluir que "em qualquer fragmento (…) existem os elementos, em que quando se isola o fragmento, dentro das condições externas próprias, o corpo total da planta pode ser construído.".

A partir destes ensaios, a cultura *in vitro* foi sendo desenvolvida, ainda que o início não tenha sido bem-sucedido. Eram múltiplas as razões para o insucesso, a falta de tecnologias apropriadas, a extensa falta de conhecimento acerca das necessidades nutricionais dos tecidos em cultura, bem como as inúmeras infeções fúngicas e bacterianas.

As décadas de 1940, 1950 e 1960 trouxeram muitas inovações e melhoramentos na cultura *in vitro*. A utilização de água de coco permitiu a cultura de embriões e outros tecidos recalcitrantes (Nickell & Tulecke, 1960), e começaram a ser lançadas as bases para a cultura de *callus* de várias espécies.

O desenvolvimento de meios de cultura foi um passo muito importante para a cultura de tecidos vegetais, White (1943) considerou que o meio desenvolvido por Knop (1865) não era estável o suficiente nem proporcionava um crescimento ótimo para os tecidos, o que o levou a desenvolver o seu próprio meio de cultura. Em simultâneo à criação do meio de White, no

decorrer da década de 1960, vários estudos foram conduzidos para lhe introduzir melhorias e perceber as carências que este possuía. Num estudo cujo objetivo era melhorar o crescimento de plantas de tabaco, em que ao meio de White se adicionou extrato aquoso de folhas de tabaco, percebeu-se que o aumento do crescimento das plantas se deveu à presença de nutrientes inorgânicos presentes nas folhas, o que levou ao desenvolvimento do meio de cultura mais utilizado para crescimento de tecidos vegetais, o meio de Murashige e Skoog (Murashige & Skoog, 1962).

A descoberta das citocininas bem como do seu papel na morfogénese (processo que promove a diferenciação dos diferentes tecidos numa planta), foi essencial para acabar com a dependência do cultivo de zonas meristemáticas na multiplicação *in vitro*. As citocininas naturais foram descobertas e posteriormente isoladas em estudos conduzidos por Folke Skoog (Thorpe, 2006; Vasil, 2008), cujo objetivo era estudar os efeitos benéficos de extratos de plantas na cultura *in vitro*. Estas hormonas são utilizadas extensivamente na industria de micropropagação, devido à sua capacidade de quebrar a dominância apical, criando vários rebentos axilares (Vasil, 2008)

Uma nova era na biotecnologia vegetal, a era da biologia molecular (Canhoto, 2010), iniciou-se em meados da década de 1980 e prossegue até à atualidade. É caracterizado principalmente pela obtenção de plantas geneticamente modificadas através de um vetor natural, a bactéria *Agrobaterium tumefaciens* (Marton *et al*., 1979). As técnicas atuais de melhoramento genético são muito mais precisas do que as antigamente utilizadas, podendo ser introduzidos um ou mais genes, bem caracterizados, em células e estes são eficazmente integrados no genoma nuclear e transmitidos à progenia (Vasil, 2008).

1.5.2. Indução artificial de poliploidia

Uma das principais técnicas de melhoramento de plantas é a indução artificial de poliploidia, processo que também ocorre naturalmente, embora seja muito lento em comparação com as técnicas de melhoramento vegetal, e que é um dos principais promotores de variabilidade genética, tendo desempenhado um papel fundamental na evolução das plantas com flor (Masterson, 1994; Otto & Whitton, 2000). Na família Lamiaceae, particularmente no género *Lavandula*, a poliploidia natural é um processo muito frequente.

Existem dois tipos principais de poliplóides, tendo em conta a forma como o tamanho do genoma é aumentado. A autopoliploidia resulta da duplicação de apenas um genoma (Lyrene *et al*., 2003), a alopoliploidia é a combinação de dois ou mais genomas diferentes (Olsen *et al*.,

2006). Os dois processos são comuns na Natureza, com um provável domínio da alopoliploidia (Ramsey & Schemske, 1998; Adams & Wendel, 2005).

Quando um genoma é duplicado, existem efeitos resultantes da nova dosagem com repercussões a nível fenotípico (Guo *et al*., 1996), bem como instabilidades genómicas, incompatibilidades cromossómicas e problemas na fase de reprodução (Chen, 2007). Estes problemas são atenuados nos autopoliploides, visto possuírem um único genoma e um citoplasma comum, enquanto que os alopoliploides necessitam de ter uma relação de compatibilidade entre o citoplasma estranho e os dois genomas divergentes, o que leva a mudanças na estrutura do genoma, na expressão genética, entre outros. (Chen, 2007) O emparelhamento meiótico pode ser ou não inteiramente restaurado nos alopoliploides (Olsen *et al*., 2006).

Em termos agronómicos, as plantas poliploides regra geral são mais robustas e compactas, produzem mais frutos e flores que as plantas originais, tradicionalmente diploides (Hancock. 1997). Ao nível anatómico, o aumento de ploidia resulta num aumento da largura das folhas e flores, alargamento ou atraso do período de floração (Shao *et al*., 2003), caules e raízes mais espessos, aumento do comprimento dos estomas e diminuição da densidade na folha (Beck *et al*., 2003), aumento do número de células, do número de cloroplastos por célula e do teor de clorofila nas células mais exteriores das folhas. Estas plantas possuem geralmente maior resistência a pragas e doenças e também a stresses ambientais. (Antunes, 2010)

Estas modificações têm vários efeitos nas atividades fisiológicas e bioquímicas das plantas, na fotossíntese (Molin *et al*., 1982; Warner & Edwards, 1989), na transpiração (Setter *et al*., 1978; Byrne *et al*., 1981) e na atividade enzimática (Randall *et al*., 1977; Guern & Hervé, 1980) o que resulta num aumento da produção de metabolitos secundários.

O tamanho do genoma das várias espécies de *Lavandula* é muito variável na literatura, porém o valor 2n situa-se entre 24 e 54 (Upson & Andrews, 2004). Como o número de cromossomas é elevado, muito provavelmente as espécies do género *Lavandula* são antigos poliplóides (Upson & Andrews, 2004). Embora em número elevado, os cromossomas são pequenos, como tal o tamanho do genoma tendencialmente será também pequeno, o que indica que estas espécies podem tolerar a indução de poliploidia, pelo menos até ao estado de tetraplóide (Upson & Andrews, 2004).

A indução de poliploidia através de agentes c-mitóticos (explicar) pode ter alguns inconvenientes, baixa taxa de sucesso e elevada taxa da mortalidade nos tratamentos (Hancock, 1997; Vainola, 2000), porém as vantagens possíveis suplantam os inconvenientes. O contínuo

desenvolvimento de técnicas e metodologias para a indução de poliploidia, é essencial para a redução dos problemas associados à mesma (Petersen *et al*., 2003).

1.5.3. Agentes c-mitóticos

As metodologias atuais no que diz respeito a processos de indução artificial de poliploidia, baseiam-se largamente na exposição de tecidos cultivados *in vitro* a agentes c-mitóticos. Estas metodologias vêm sendo bem sucedidas em várias árvores de fruto e na floricultura (Hancock, 1997).

Os fatores mais influentes no sucesso da indução de poliploidia são o genótipo (Petersen *et al*., 2003), o estado de desenvolvimento do explante, o agente c-mitótico utilizado, a concentração em que é utilizado, o modo de aplicação e o tempo de exposição ao agente (Chauvin et al., 2003; Yang et al., 2006).

Vários ensaios vêm sendo realizados com os mais diversos tipos de material vegetal, segmentos nodais (Escandón *et al*., 2005), rebentos caulinares (Zhang *et al*., 2008), sementes (Rubuluza *et al.*, 2007), anteras (Teparkum & Veilleux, 1998), *callus* (Petersen *et al*., 2002), entre outros.

O agente mais utilizado e estudado atualmente é a colquicina, um alcaloide extraído de *Colchicum autumnale*, planta utilizada desde os tempos do antigo Egito e Grécia como medicinal e também para produção de venenos. O modo de ação da colquicina e dos restantes agentes é semelhante e encontra-se constantemente em estudo, sendo que os seus métodos de atuação são semelhantes. Estes agentes ligam-se à tubulina, formando um complexo tubulina-colquicina, que impede a formação dos microtúbulos, levando à não formação do fuso acromático (Caperta *et al*., 2006). Sem o fuso, não ocorre separação dos cromatídeos, nem a sua migração polar (Walczak & Heald, 2008).

Com o impedimento da migração polar dos cromossomas, forma-se uma nova membrana em redor do DNA, que resulta na formação de um núcleo de restituição que envolve o DNA duplicado. Um dos pontos chave para estas técnicas serem bem sucedidas é encontrar o ponto certo de multiplicação para aumentar a taxa de sucesso (Zhang *et al*., 2007), sendo por isso muitas vezes utilizados tecidos jovens com taxas de multiplicação celular tradicionalmente muito elevadas.

É essencial encontrar um compromisso entre a concentração do agente c-mitótico e o tempo de exposição ao agente, de modo a minimizar ao máximo os efeitos tóxicos do agente, e

assim diminuir a taxa de mortalidade (Vainola, 2000), e aumentar a taxa de sucesso (*Yang et al*., 2006).

Estudos revelam que a colquicina possui baixa afinidade para a tubulina (Redondo *et al*., 2007), o que leva à sua utilização em concentrações mais elevadas, com os consequentes efeitos tóxicos desse modo aumentados. Outros agentes c-mitóticos com melhor afinidade para a tubulina têm sido testados, a trifluralina, o APM, e a orizalina, que dos três é a que apresenta melhores taxas de sucesso na duplicação de material genético (Pintos *et al*., 2007). Como estes agentes possuem maior afinidade para a tubulina, podem ser utilizados em concentrações inferiores, levando a taxas de mortalidade inferiores à colquicina (Pintos *et al*., 2007).

Da indução *in vitro* de poliplóides resultam normalmente tetraplóides puros, mixoplóides e plantas que permanecem diplóides, sendo que tanto o tipo de tecido utilizado (Vainola, 2000) como o agente utilizado têm maior probabilidade de originar um dado tipo de planta.

1.6. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um método muito eficaz para analisar propriedades óticas de partículas microscópicas, como por exemplo a fluorescência ou a difusão da luz, sendo atualmente o método de eleição para análise do conteúdo de DNA de uma célula. É um método rápido, confiável, de fácil aplicação e que não utiliza reagentes muito dispendiosos.

O DNA pode ser estimado em unidades absolutas (picogramas de DNA ou em número de pares base) ou em unidades relativas, que permitem relacionar o conteúdo de DNA de um determinado indivíduo com o seu nível de ploidia (Doležel *et al*., 2007), possibilitando a identificação de um individuo como diplóide, tetraplóide ou mixoplóide. É um método que necessita de muito pouco material vegetal para apresentar um número representativo de resultados (a partir dos 50 miligramas de tecido vegetal), o que o torna apetecível para a análise de plantas pequenas, com pouco material disponível. Os coeficientes de variação (CV), de modo a serem aceitáveis devem variar entre 1% e 5% (Doležel *et al*., 2007).

Os núcleos circulam num fluido laminar, sendo que cada um é analisado individualmente, devido a um processo denominado focagem hidrodinâmica. As partículas ao circularem no fluido são aleatoriamente medidas (Doležel, 1997).

1.7. Género *Lavandula*

O género *Lavandula* inclui-se na família Lamiaceae, que compreende 236 géneros e entre 6900 a 7100 espécies, sendo que destas, 39 espécies são *Lavandula*. A distribuição geográfica deste género vai desde a região mediterrânica até à Macaronésia, onde são muito comuns. Embora menos comum, o género existe também na Península Arábica e no Sul da Ásia (Upson & Andrews, 2004).

Os indivíduos deste género incluem-se na categoria dos arbustos ou subarbustos, de caule ereto, mais ou menos ramificado, prismático ou cilíndrico. As folhas são simples, inteiras, dentadas ou bipinadas. O indumento pode ser composto ou simples, com tricomas ramificados e/ou glandulares. A inflorescência terminal possui pedúnculo simples ou ramificado. As brácteas são membranosas, em tons de púrpura, verde-acinzentado ou amarelo-esverdeado. O cálice é simpétalo, podendo apresentar um pedicelo curto ou mais alongado, cilíndrico ou urceolado. É persistente na maturação com entre 5 a 8 dentes e 8, 13 ou 15 nervos. A corola apresenta coloração púrpura, azul ou amarelo-esverdeado, de tubo largo e estreito, podendo exceder pouco ou muito o cálice. Possuem 4 estames, que estão inclusos no tubo da corola, o par anterior é mais largo que o posterior, as anteras são reniformes. O estilete tem 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 (Coutinho, 1913).

As espécies existentes neste grupo toleram uma grande gama de ambientes, tendo preferência por solos arenosos e bem drenados, porém toleram solos pobres e rochosos. Ocorrem normalmente em solos neutros ou alcalinos, sendo que *Lavandula stoechas* ocorre também em solos ácidos. São plantas heliófitas, necessitando de luz solar direta para se desenvolver e reproduzir. São resistentes a geadas e a uma gama alargada de temperaturas, desde alguns graus negativos até períodos esporádicos de temperaturas acima dos 40ºC (retirado de http://flora-on.pt/index.php?q=Lavandula+pedunculata+subsp+pedunculata, em 14/05/2016).

Em Portugal podem ser encontradas 5 espécies pertencentes a este género, *L. pedunculata, L. viridis, L. latifolia, L. multifida, L. luisieri*, sendo encontradas em locais secos, em que pelo menos uma parte do solo é arenoso

1.7.1. *Lavandula multifida* L.

Descrita pela primeira vez por Carolus Clusius (1526-1609) como *Stoechas multifido folio*, na publicação *Hispanias Observaturum Historia* (1576). A designação atual *Lavandula multifida* foi dada por Lineu em 1753 (*Upson and Andrews, 2004*).

Trata-se de uma planta típica da região mediterrânica (Península Ibérica, Sul de Itália e Sicília, Norte de África), ocorrendo também em locais mais interiores do continente africano.

É um arbusto lenhoso de pequena/média dimensão (30-50 cm). A inflorescência (Fig. 1a) tem um pedúnculo geralmente ramificado na base, e as flores têm dimensões de 5-8 cm. As suas folhas (Fig. 1c) são ovadas, profundamente pinatissectas a bipinatissectas, entre 3-8 cm de comprimento. O caule (Fig. 1d) possui tricomas brancos, simples e longos, que cobrem os mais curtos, ramificados. As brácteas são elípticas com ápice fortemente agudo. A corola é bicolor, com os lóbulos inferiores violeta a desvanecer para azul violeta nos lóbulos superiores, com diretrizes mais escuras (Upson, 2002).

Relativamente ao habitat, *L. multifida* habita matos subnitrófilos, em prados xerófilos ou arribas litorais. Ocorre geralmente em substratos rochosos ou pedregosos, alcalinos, preferencialmente calcários, mas também em siliciosos, xistos, em vertentes termófilas expostas a Sul, numa gama de altitudes que varia entre os 0 – 1500 metros (retirado de http://flora-on.pt/index.php#/1lavandula+multifida, em 14/05/2016).

O período normal de floração para esta espécie é entre Fevereiro e Abril e Outubro e Novembro (Upson & Andrews, 2004), o seu estado de conservação é pouco preocupante.

Figura 1. Morfologia de *Lavandula multifida*; a) inflorescência; b) atração de insetos polinizadores; c) folha; d) caule.

Esta planta tem variados usos na etnobotânica, nomeadamente no Norte de África onde em Marrocos se utilizam infusões dos ramos floridos da planta para curar a tosse, na Líbia é utilizada no tratamento de doenças que afetam crianças (Upson & Andrews, 2004).

Em estudos de Microscopia eletrónica de varrimento onde se analisou o indumento foliar, notou-se a sua heterogeneidade, nomeadamente em relação aos tricomas ramificados não glandulares e glandulares (Zuzarte, 2012).

O número de cromossomas varia entre publicações, sendo o número atualmente mais aceite 2n=24 (Upson & Andrews, 2004). A variação do número cromossómico é utilizada taxonomicamente para dividir algumas subespécies, *Lavandula multifida* L. subsp. *Canariensis* (Mill.) Pit. & Pr. em que 2n=26 (Dalgaard, 1986), o que pode levar às diferenças do valor 2n entre as publicações.

1.7.2. *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav.

Esta espécie é endémica da Península Ibérica, estando a sua distribuição restrita a Portugal e Espanha.

É um arbusto lenhoso com caules eretos (Fig. 2b), com entre 50-100 cm de altura. As folhas da parte superior da planta são elípticas lanceoladas e ligeiramente revolutas (Fig. 2c), enquanto que na base do caule são lineares e fastigiadas. O indumento é mais ou menos denso, de pelos curtos e acinzentados, usualmente glandulares. O pedúnculo tem entre 10-30 cm, e o seu indumento varia entre hirsuto a densamente tomentoso. As brácteas férteis possuem 4-7 x 4-6 mm, são oblongas triangulares, com nervuras pouco proeminentes, longitudinais e paralelas (Prazeres, 2014) (Fig. 2a). As brácteas estéreis têm entre 12-30 mm indo de oblongas a lanceoladas, assemelhando-se a um penacho, normalmente violeta ou púrpura. O cálice (Fig. 2b) é tubular, tem entre 5-6 mm de comprimento, e aquando da formação do fruto aumenta para cerca de 8 mm, tornando-se urceolado. A corola (Fig. 2a) é geralmente mais comprida que o cálice tendo entre 6-8 mm apresentando coloração púrpura escuro e nalguns casos branca. (Prazeres, 2014; Upson & Andrews, 2004)

Figura 2. Morfologia de *Lavandula pedunculata*; a) inflorescência; b) caule; c) folhas e caule.

Estas plantas são muitas vezes a espécie dominante do habitat. Ocorre frequentemente em clareiras de giestais, estevais e pastagens pobres. Estende-se por uma grande amplitude ecológica, desde dunas litorais a zonas mais interiores. Tem preferência por locais secos, muito expostos (a sol e vento), com solos pobres e substratos ácidos (xistos ou granitos) Estas plantas são muitas vezes a espécie dominante do habitat. (retirado de http://flora-on.pt/index.php?q=Lavandula+pedunculata+subsp+pedunculata, em 14/05/2016).

O período de floração para esta espécie é entre Fevereiro e Setembro e o seu estado de conservação é pouco preocupante (Upson & Andrews, 2004)

Em Portugal esta espécie é muito utilizada e é normalmente confundida com *Lavandula luisieri*. Dos usos tradicionais destacam-se o tratamento para a queda de cabelo, a aromatização da casa e o uso como condimento para alimentação (Rodrigues, 2002)

No estudo do indumento foliar através de microscopia eletrónica de varrimento, verificou-se a sua heterogeneidade (Zuzarte, 2013). Os tricomas glandulares presentes nesta espécies são de tipo peltado, capitados de tipo I, capitados de tipo II, glandulares bifurcados e também foram encontrados tricomas com uma morfologia mista que combinava características dos tricomas glandulares e não glandulares, que foram denominados tricomas ramificados mistos (Zuzarte, 2013).

1.8. Óleos essenciais

1.8.1. Visão geral

As plantas aromáticas sintetizam vários compostos com funções ecológicas importantes, nas interações entre a planta e o ambiente circundante (Costa *et al*., 2013), sendo a composição dos óleos essenciais muito variável, "Em plantas aromáticas a composição dos óleos essenciais varia consideravelmente devido a fatores intrínsecos (sexuais, sazonais) e extrínsecos (aspetos ecológicos e ambientais) " (Taís & Zeiger, 2010), a localização da planta pode também influenciar os seus óleos " (…) plantas que crescem muito perto da costa, com forte influência Atlântica, o que pode afetar a composição dos seus óleos essenciais (…) ", em termos químicos (Figueiredo *et al*., 2008).

Os óleos essenciais são um produto natural, com um interesse enorme para variadas áreas. Os metabolitos secundários e os compostos fenólicos presentes nesses óleos estão entre os compostos mais importantes produzidos pelas plantas aromáticas (Osbourn & Lanzotti, 2009). Os monoterpenos e os sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais (Costa *et al*., 2013).

Atualmente a utilização dos compostos derivados de plantas para as várias indústrias, farmacêutica, cosmética, alimentar, aumentou, devido à sua aceitação como seguros para o utilizador. O género *Lavandula* é muito utilizado na indústria e pela população em geral, devido às variadas atividades dos seus óleos essenciais, das quais se destacam a atividade antimicrobiana (de Rapper *et al*., 2013), a atividade antioxidante (Gülçin, 2014), a atividade anti-acetilcolinaesterase (Ferreira *et al*. 2006), a atividade antifúngica (Angioni *et al.*, 2006) e a atividade nematicídica (Barbosa *et al*, 2010).

1.8.2. Estruturas secretoras

Em contraste com os animais, em que os resíduos do metabolismo são excretados para fora do corpo através de vários mecanismos, as plantas armazenam tanto os produtos como os resíduos do seu metabolismo. (Beck, 2010) Estes compostos são armazenados em células, regiões vivas ou mortas de tecidos, e ainda em cavidades ou ductos.

Nas plantas o processo de transferência de metabolitos de um local para outro denomina-se secretar. O processo de secreção nas plantas pode ser definido como a transferência de certos produtos intermediários ou finais do metabolismo de uma região para outra de uma célula ou região do corpo da planta.

Os óleos essenciais são produzidos por várias estruturas nas plantas e são considerados como compostos não metabólicos, sem funcionalidade no interior da planta, mas que possuem valor adaptativo importante para determinadas espécies (Gouyon, 1986; Sáez, 1995). A composição dos óleos é muito variada em termos químicos de espécie para espécie e até dentro da mesma espécie (Sacchetti *et al*., 2005; Hussain, 2008). De entre os vários componentes destacam-se os terpenos, compostos aromáticos com várias funções, a atração de polinizadores (Beck, 2010), ação anti-herbívoria, nomeadamente insetos (Gershenzon & Dudareva, 2007), os alcaloides, que podem ser altamente tóxicos e que também têm como principal função evitar a herbivoria (Beck, 2010), até aos taninos e resinas que podem auxiliar no controlo e até na eliminação de invasões por fungos na madeira (Bailey *et al*., 2005; Beck, 2010).

No interior das plantas, os óleos são transportados para células individuais ou para cavidades e ductos, que podem ser internos ou externos.

1.8.2.1. Estruturas secretoras internas

Idioblastos – células secretoras especializadas, incluídas no parênquima e que contêm diversas substâncias, mucilagens, taninos, óleos, oxalato de cálcio.

Células mucilaginosas – ocorrem no floema secundário de algumas espécies.

Litocistos – diferentes das células normais da epiderme devido às suas superiores dimensões e à presença de um cistólito no seu interior.

Cavidades secretoras (Svoboda, 2000) – cavidades mais ou menos esféricas que podem ser formadas de duas maneiras: ou duas células de parênquima se separam uma da outra criando uma lacuna entre elas ou uma célula desintegra-se e deixa uma cavidade no tecido.

Ductos secretores (Svoboda, 2000) – os ductos secretores são cavidades alongadas, que normalmente se ramificam e formam uma rede desde a raíz, atravessando o caule até às folhas, flores e frutos. São compostos por um epitélio que rodeia a cavidade central.

1.8.2.2. Estruturas secretoras externas

Hidátodos – estomas modificados através dos quais a água em excesso é libertada através de gutação. O processo de gutação pode ser ativo ou passivo.

Tricomas glandulares (Svoboda, 2000) – pelos epidérmicos modificados que podem ser encontrados maioritariamente em folhas e caules. A superfície externa da glândula é altamente cutinizada, sendo bastante rígida e não possuindo quaisquer poros ou perfurações. Os óleos acumulam-se nos espaços subcuticulares. As células glandulares diferem das células vegetais comuns no facto de possuírem um núcleo de dimensão superior, o protoplasma ser mais denso e por não possuírem um vacúolo central de grandes dimensões. Os tricomas glandulares estão presentes nas folhas desde muito cedo no seu desenvolvimento, ao contrário a produção e transformação dos óleos é um processo contínuo e mais demorado, que se inicia com a formação da glândula e que acaba com a sua senescência.

O tamanho, o formato, a localização, a composição química das substâncias por eles secretadas e até a função dos tricomas glandulares varia entre as várias espécies. (Werker, 2000; Rusydi *et al*., 2013).

1.8.3. Tipos de tricomas glandulares presentes em *Lavandula multifida* e *Lavandula pedunculata*

Tricomas peltados – encontrados tanto na página abaxial como adaxial das folhas, são constituídos por uma célula basal, um talo unicelular muito curto e largo, com paredes laterais altamente cutinizadas e uma cabeça multicelular, nas quais o óleo se acumula num espaço abaixo das células. Em condições naturais o óleo permanece nas células, porém vários fatores como altas temperaturas e baixa humidade (Ascensão *et al*., 1995) ou contacto com predadores (Werker, 1993), podem causar rutura da cutícula, libertando o óleo.

Tricomas capitados – presentes em ambas as faces da folha, são mais abundantes que os peltados, e são de dois tipos: de talo longo – constituídos por uma célula basal, um talo uni ou bicelular, uma célula pescoço e uma cabeça unicelular; de talo curto – constituídos por uma célula basal, um talo curto unicelular, e uma cabeça uni ou bicelular Estes tricomas são muito

comuns em Lamiaceae, apresentam grandes variações em estrutura, tamanho e função. Este tipo de tricoma capitado é o mais comum dentro da família Lamiaceae (Zuzarte, 2012).

Tricomas bifurcados – dentro do género *Lavandula* existem em *L. pedunculata, L. multifida* e *L. viridis*. Possuem um talo unicelular que conduz a duas estruturas glandulares individuais.

Tricomas ramificados mistos – semelhantes a tricomas não glandulares, exceto em algumas ramificações onde são aparentados com tricomas capitados. Apenas presentes em *Lavandula multifida* e *Lavandula pedunculata* (Zuzarte, 2012*)*. Faltam estudos sobre a função e importância destes tricomas.

1.9. Contextualização e Objetivos

Este trabalho foi realizado no laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, o qual nos últimos anos desenvolveu alguns trabalhos no estudo e no melhoramento de algumas espécies do género *Lavandula*. Com este propósito foram conduzidos trabalhos no estabelecimento de plantas a partir de material adulto, bem como de propagação *in vitro* e de germinação de sementes, em *Lavandula pedunculata* e *Lavandula multifida*.

O género *Lavandula* tem reconhecida importância económica, todavia existe uma grande lacuna no que diz respeito a ensaios e desenvolvimento de protocolos relativos ao seu melhoramento, sendo as plantas utilizadas economicamente na atualidade bastante semelhantes às suas parentes selvagens, não estando otimizada a produção do seu componente mais valioso, os óleos essenciais. Para tentar melhorar a produção de óleos, foram realizadas tentativas de induzir poliploidia nas espécies estudadas, de forma a estudar a quantidade e qualidade dos óleos produzidos por si produzidos.

O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de protocolos que permitissem, com sucesso, a indução de plantas tetraplóides, a partir de plantas diplóides cultivadas *in vitro*. Para este efeito, plantas das duas espécies em estudo, *L. pedunculata* e *L. multifida* foram expostas a diferentes concentrações de dois agentes c-mitóticos – colquicina e orizalina – em meio líquido. A ploidia das plantas foi analisada originalmente por citometria de fluxo e posteriormente foi testada uma metodologia a partir das dimensões bidimensionais – comprimento e largura – dos complexos estomáticos, que se revelou bem sucedida apenas para *L. pedunculata*.

O objetivo final deste estudo foi o teste das condições de enraizamento, a partir dos trabalhos de Andrade (1999), de modo a permitir uma aclimatação com uma taxa de mortalidade tão reduzida quanto possível.

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

2.1. Material vegetal

Nos ensaios realizados foram utilizados explantes de *Lavandula multifida* L. e *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav., estabelecidos a partir da germinação de sementes das mesmas espécies, originárias da coleção de sementes do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra. As sementes de *L. multifida* foram colhidas em Outubro de 2013, no Portinho da Arrábida (Serra da Arrábida), enquanto que as sementes de *L. pedunculata* foram colhidas em Julho de 2013 em Celorico da Beira.

2.2. Estabelecimento de plântulas

A germinação de sementes foi realizada em condições estéreis, através da inoculação de sementes previamente esterilizadas, num total de 171 sementes por espécie, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com diferentes concentrações de sacarose (1,5% e 3%), sendo o pH acertado para valores entre 5,6 - 5,8, e ao qual foi adicionado 6 g/L de agar. Para testar as diferenças estatísticas entre os 2 tratamentos foi realizado um teste-t de modo a comparar as taxas de germinação.

A esterilização das sementes foi realizada a partir de um protocolo criado para o efeito (Tabela 1), dividido em duas etapas: na primeira etapa, as sementes são lavadas em água destilada com duas gotas do detergente Tween 20 (Sigma-Aldrich) durante 4 minutos; de seguida são colocadas em etanol (70%) durante 1 minuto; no final da primeira etapa, as sementes são colocadas numa solução de hipoclorito de cálcio (6%). Todos estes passos são realizados em constante agitação, utilizando um agitador magnético. A segunda etapa consiste na colocação das sementes numa solução de hipoclorito de cálcio (3%), durante cinco minutos. Após estes passos as sementes são lavadas em água destilada esterilizada, para retirar o excesso de hipoclorito na sua superfície.

Tabela 1 – Protocolo de Esterilização de Sementes

Etapa	Agente Limpeza	Tempo Atuação
1ª Etapa	Água destilada + *Tween* 20 (Sigma-Aldrich)	4 min
	Etanol 70%	1 min
	Hipoclorito de Cálcio (6%)	15 min
Embebição em água destilada 'overnight'		
2ª Etapa	Hipoclorito de Cálcio (3%)	5 min

O meio MS foi distribuído para tubos de ensaio, posteriormente autoclavados a 121ºC durante 20 minutos.

Após a germinação das sementes e o desenvolvimento das respetivas plântulas, explantes retirados das mesmas foram propagados *in vitro* através da inoculação, sob condições estéreis, de segmentos nodais para meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 30 g/L de sacarose. O pH foi ajustado para um valor entre 5,6 - 5,8 e foram adicionados 6 g/L de agar, após o qual se procedeu à autoclavagem dos meios a 121ºC durante 20 minutos.

As culturas foram mantidas ao longo de toda a experiência (repicagens sucessivas com intervalo de 8 - 10 semanas) numa estufa com temperatura controlada de 24 ± 1 ºC, com um fotoperíodo de dezasseis horas de luz para oito horas de escuro. As plantas obtidas foram utilizadas nos ensaios subsequentes.

2.3. Multiplicação através da cultura de segmentos nodais

Para a obtenção de um número de plantas suficiente para os vários ensaios, a micropropagação de *Lavandula* sp. foi realizada através da inoculação, sob condições estéreis, de segmentos nodais, desprovidos de folhas e com um ou dois nós em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g/L de sacarose. O pH foi ajustado para valores entre 5,6 e 5,8, adicionando-se de seguida 6 g/L de agár. Os meios foram autoclavados a 121ºC durante 20 minutos.

2.4. Indução de poliploidia

Os tratamentos de indução de poliploidia foram realizados recorrendo à exposição de material vegetal a dois agente c-mitóticos, colquicina (Sigma) e orizalina (Sigma), em meio líquido (Figs. 3a, 3b).

2.4.1. Indução com colquicina

30 segmentos nodais de *Lavandula pedunculata* e *Lavandula multifida* foram expostos a diferentes concentrações de colquicina, durante 6 dias (Tabela 2; Figs. 3a, 3b). Os grupos controlo foram iguais para os tratamentos com colquicina e orizalina, visto as condições de cultura serem iguais, variando apenas a presença do agente c-mitótico e da espécie em estudo.

A colquicina foi dissolvida em água destilada, sendo preparada uma solução com concentração *stock* de 1000 μM, adicionada diretamente ao meio de cultura, meio MS com o dobro da concentração normal dos seus vários constituintes, como um dos seus componentes. O meio de cultura foi colocado em balões de Erlenmeyer, devidamente selados, sendo que em cada balão foram colocados 6 explantes, num total de 5 balões por tratamento. As concentrações de Colquicina utilizadas foram 0 μM (tratamento controlo), 50 μM, 250 μM e 500 μM.

Os explantes foram sujeitos ao agente c-mitótico durante 6 dias, numa estufa com temperatura controlada de 24 ± 1 ^{o}C, em permanente escuridão (de modo a evitar oxidação do material vegetal) e agitação.

Após os 6 dias de exposição ao agente, os segmentos nodais de ambas as espécies foram lavados com água destilada estéril, para retirar os excessos de colquicina e foram transferidos para novos balões de Erlenmeyer com 20 mL de meio MS sem o agente c-mitótico, nas mesmas condições referidas anteriormente, à exceção da escuridão, sendo que neste caso o fotoperíodo foi de 16 horas de luz para 8 horas de escuro.

Após a proliferação dos segmentos nodais, os explantes foram isolados para tubos de ensaio, cada um com aproximadamente 10 mL de meio MS, e, quando possível (quando a quantidade de material isolado é suficiente para a análise e para o desenvolvimento com sucesso do explante), foi isolado material para análise para citometria de fluxo.

2.4.2. Indução com orizalina

No ensaio com orizalina, a estratégia utilizada foi semelhante ao ensaio com a colquicina, porém desta vez foram expostos ao agente 25 segmentos nodais de *L. multifida* e de *L. pedunculata* às várias concentrações de orizalina em vez dos 30 utilizados anteriormente, durante 6 dias (Tabela 2; Figs. 3a, 3b). Os grupos controlo foram iguais para os tratamentos com colquicina e orizalina, visto as condições de cultura serem iguais, variando apenas a presença do agente c-mitótico e da espécie em estudo.

A orizalina, insolúvel em água, foi dissolvida em etanol 70% (v/v), sendo preparada uma solução com concentração *stock* de 100 μM, adicionada diretamente ao meio de cultura MS, com o dobro da concentração normal dos seus vários componentes. O volume de etanol utilizado (aproximadamente 2 mL) foi de tal modo reduzido que o seu efeito nas culturas foi desprezado, tal como realizado em experiências anteriores. O meio de cultura foi colocado em balões de Erlenmeyer, devidamente selados, sendo que em cada balão foram colocados 5 explantes, num total de 5 balões por tratamento. As concentrações de Orizalina utilizadas foram 0 μM (tratamento controlo), 10 μM, 25 μM e 50 μM.As soluções foram posteriormente autoclavadas a 121ºC durante 20 minutos.

Os explantes foram sujeitos ao agente c-mitótico durante 6 dias, numa estufa com temperatura controlada de 24 ± 1 ºC, em permanente escuridão (de modo a evitar oxidação do material vegetal) e agitação.

Após os 6 dias do tratamento, os explantes foram lavados com água destilada estéril, de modo a retirar os excessos de orizalina da superfície dos tecidos, e colocados em meio MS líquido, nas condições descritas para o tratamento com colquicina, para proliferação, durante 2 a 3 semanas. Ao contrário do tratamento anterior, o material utilizado para medição de ploidia por citometria de fluxo foi isolado nesta fase, antes dos explantes serem colocados no novo meio MS líquido, os explantes que nesta altura ainda não possuíam material suficiente para serem analisados foram analisados posteriormente.

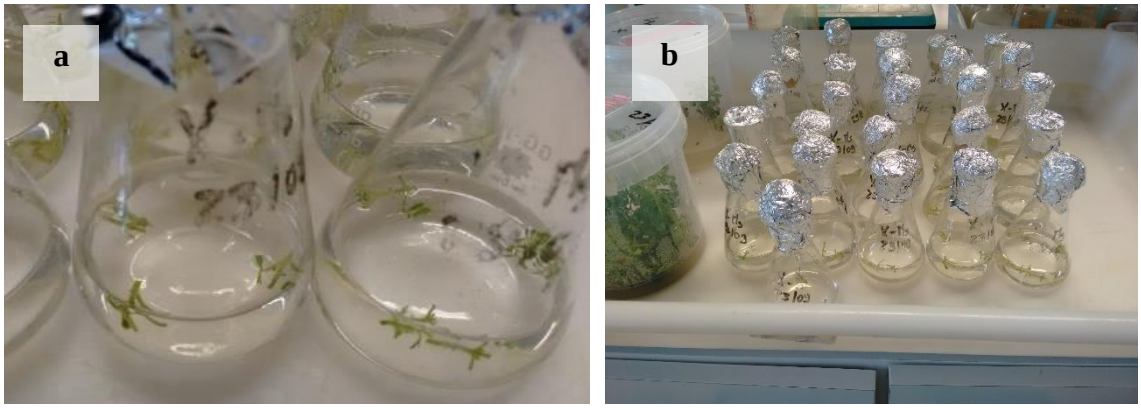


Figura 3. Tratamento de *L. pedunculata* e *L. multifida* com agentes c-mitóticos em meio líquido; a) explantes nos tratamentos em meio líquido; b) visão geral dos tratamentos com agentes c-mitóticos.

Após o período de proliferação, os explantes foram isolados para tubos de ensaio com meio MS.

Tabela 2 – Esquema dos tratamentos com agentes c-mitóticos

Meio Utilizado	**Espécie**	**Agente C-mitótico**	**Concentração (µM)**	**Tempo de Exposição**	**N=**
Meio Líquido	***Lavandula multifida***	Controlo	0	6 dias	54
		Colquicina	50	6 dias	30
			250		30
			500		30
		Orizalina	10	6 dias	25
			25		25
			50		25
Meio Líquido	***Lavandula pedunculata***	Controlo	0	6 dias	54
		Colquicina	50	6 dias	30
			250		30
			500		30
		Orizalina	10	6 dias	25
			25		25
			50		25

2.5. Parâmetros das culturas analisados

2.5.1. Observação de níveis de sobrevivência e desenvolvimento

Após o período de indução de poliploidia, durante o período de desenvolvimento dos explantes, foram avaliados os seguintes parâmetros: 1) a sobrevivência, 2) ausência de desenvolvimento e 3) explantes que entraram em senescência. Os explantes que nunca se desenvolveram e os senescentes foram englobados no mesmo grupo para o estudo da taxa de sobrevivência dos explantes aos tratamentos com agentes c-mitóticos.

2.5.2. Análise da ploidia por citometria de fluxo

As plântulas que sofreram tratamento com agentes c-mitóticos (ou os grupos controlo) e que atingiram um desenvolvimento adequado, i.e., atingiram um número de folhas suficiente para garantir o seu desenvolvimento mesmo removendo algumas folhas, e cujas folhas possuíam tamanho apropriado para análise, foram sujeitas a análise do nível de ploidia por citometria de fluxo.

A metodologia utilizada para a análise por citometria de fluxo (Fig. 4) encontra-se descrita por Loureiro (2007). Resumidamente, o processo inicia-se com a colocação de tecido da plântula em análise, e de uma quantidade equivalente de planta padrão, com tamanho genómico previamente definido (*Raphanus sativus* L., 2C=1.11 pg (Dolezel *et al.,* 1992), para *Lavandula multifida* e *Lavandula pedunculata*), numa caixa de Petri com 1 mL de tampão de isolamento nuclear WPB ("Woody plant buffer" 0,2M Tris-HCl, 4 mM$MgCl_2 \bullet 6H_2O$, 2mM EDTA $Na_2 \bullet 2H_2O$, 86mM NaCl, 10mM metabissulfito de sódio, 1% (m/v) PVP-10, 1% (v/v) Triton X-100, pH=7.5).

O material sofre *chopping* com recurso a uma lâmina de barbear bem afiada, de acordo com a metodologia proposta por Galbraith et al. (1983). A solução onde se encontram os núcleos libertados pelo *chopping* é filtrada para um tubo de citometria, através de um filtro com uma rede de *nylon* de 50 μm de diâmetro. Ao filtrado são adicionados 50 μL/mL de iodeto de propídeo (Sigma), para a marcação do DNA dos núcleos e 50 μL/mL de RNase (Fluka), para evitar a ligação do iodeto de propídeo ao RNA, evitando a adulteração dos resultados. Após a adição do corante as amostras são deixadas a incubar à temperatura ambiente, durante aproximadamente 5 minutos, de modo a que o corante tenha possibilidade de se ligar ao DNA.

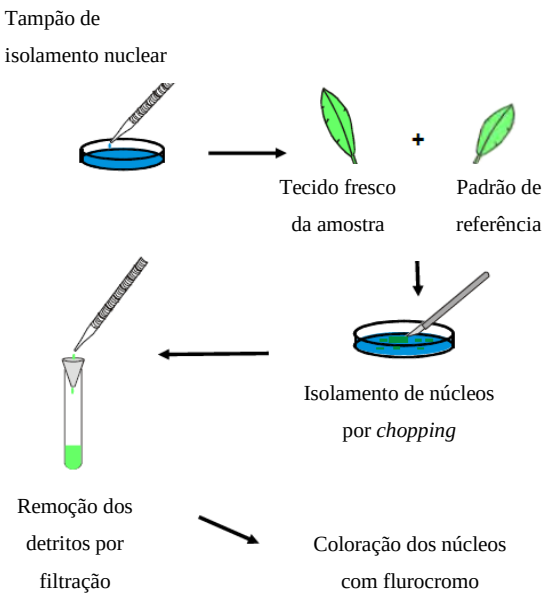


Figura 4. Procedimento adoptado no tratamento do material vegetal para avaliação do teor em DNA por citometria de fluxo (adaptado de Galbraith, 1983; in Loureiro, 2007).

Após o período de preparação das amostras, estas foram analisadas num citómetro de fluxo (CyFlow Space®, Partec), equipado com um laser de árgon arrefecido a ar e a operar nos 488nm. As configurações do aparelho foram mantidas sensivelmente iguais nas várias medições efetuadas. No início de cada medição, foi preparada uma amostra constituída apenas pela planta padrão, de modo a avaliar a qualidade de funcionamento do citómetro de fluxo. A fluorescência relativa das partículas da amostra foi analisada no programa FloMax software (Partec).

Para cada amostra foi calculado, o índice de DNA (rácio entre a fluorescência média do pico G_0/G_1 da amostra e do pico do padrão utilizado), o número de núcleos e o tamanho do genoma.

O tamanho do genoma foi calculado com recurso à equação:

$$\text{Amostra 2C conteúdo DNA nuclear (pg)} = \frac{\text{Média do pico } G_0/G_1 \text{ da amostra}}{\text{Média do pico } G_0/G_1 \text{ do padrão}} \text{ X } \text{2C conteúdo DNA nuclear do padrão}$$

A partir destes 3 parâmetros, as plantas foram classificadas como diplóides, tetraplóides ou mixoplóides. As plantas foram consideradas mixoplóides quando os núcleos que normalmente correspondem apenas à fase G_2 do ciclo celular compreendem a mais de 25% do

total de núcleos da amostra em estudo. Neste caso é considerado que além dos núcleos na fase G_2, existem também núcleos com o dobro da ploidia e que estes se encontravam na fase G_0/G_1 do ciclo celular, possuindo o tecido dois tipos de ploidia distintos, ou seja mixoploidia.

As plantas modificadas com sucesso e algumas plantas não modificadas, foram selecionadas para aclimatação e para ensaios posteriores para avaliação dos caracteres morfológicos.

2.6. Enraizamento

Após 2 ou 3 gerações de micropropagação, ambas as espécies em estudo perderam a capacidade de gerar raízes por si próprias, ao contrário das fases iniciais do estudo onde várias raízes funcionais eram formadas, como tal, foi necessário um período de enraizamento antes das plantas serem transferidas para a fase de aclimatação.

Rebentos caulinares de *Lavandula pedunculata* e *Lavandula multifida* foram colocados em meio MS, suplementado com 0,2 mg/L de NAA (ácido naftaleno-acético). Após 30 dias de cultura neste meio, a presença ou ausência de raiz foi avaliada, e as plantas que formaram raízes foram transferidas para substrato, num fitoclima (1000 EHHR) com condições controladas para aclimatação (20 ºC; 70% humidade; fotoperíodo de 12 horas luz para 12 horas escuro).

2.7. Aclimatação

Após o período de enraizamento, as plantas foram transferidas para um fitoclima (1000 EHHR), de modo a avaliar a sua capacidade de sobrevivência, e algumas características morfológicas (altura do caule, comprimento da maior folha e largura da maior folha). Para analisar as eventuais diferenças entre a ploidia e a evolução temporal da planta, foi realizada uma análise estatística ANOVA de 2 VIAS, de modo a inferir se o fator tempo e/ou ploidia afetam significativamente o crescimento das plantas.

2.8. Microscopia Eletrónica de Varrimento

Para a realização de ensaios de microscopia eletrónica de varrimento, foram isoladas folhas de plantas modificadas (mixoplóides ou tetraplóides) e de plantas controlo (sem alteração de ploidia), que foram seccionadas em pequenas porções com aproximadamente 2 x 2 mm, e colocadas diretamente num frasco de vidro, devidamente identificado, com o fundo coberto por

um fixador composto por gluteraldeído 2,5%, tampão cacodilato de sódio 0,1M e cloreto de cálcio 0,01M, durante 3 horas. Após este período, mantendo sempre as amostras no mesmo frasco, o fixador foi retirado e foram realizadas três lavagens com o tampão cacodilato de sódio, com a duração de 10 minutos cada. As amostras foram novamente lavadas durante 10 minutos com água destilada. Após as várias etapas de lavagem, as amostras foram desidratadas numa sequência de etanol a diferentes concentrações.

O processo iniciou-se em etanol a 70% (v/v), seguindo para 80%, 90%, 95% e duas vezes com etanol absoluto (100%), sendo que cada passo tinha a duração de 10 minutos. Até ao período de análise no microscópio, as amostras ficaram armazenadas no etanol absoluto a 4ºC.

Para a análise ao microscópio, as amostras tiveram de sofrer uma metalização, com recurso a um metalizador Quorum Technologies SC7620 Mini Sputter Coater, sendo cobertas com uma camada de 10 nm de uma liga de ouro e paládio.

As amostras foram colocadas no microscópio eletrónico de varrimento (VEGA 3 SBH; TESCAN), e foram tiradas imagens de tricomas (glandulares e não glandulares) e estomas, sendo que nos estomas foram também medidos o comprimento e a largura, com recurso ao mesmo *software*.

Capítulo 3 - Resultados

3.1. Ensaios de germinação com sementes de *Lavandula pedunculata* e *Lavandula multifida*

Com o objetivo de estabelecer plantas *in vitro* para os vários ensaios realizados neste projeto, sementes de *L. pedunculata* e *L. multifida* foram esterilizadas e inoculadas em tubos de ensaio com meio MS gelificado (Fig. 5). Foram colocadas 3 sementes por tubo, num total de 171 sementes para cada uma das espécies, e foi estudada a taxa de germinação em dois tratamentos diferentes, ao longo de 30 dias, em que a concentração da sacarose adicionada ao meio de cultura variou entre 1,5% e 3% (Fig. 6).

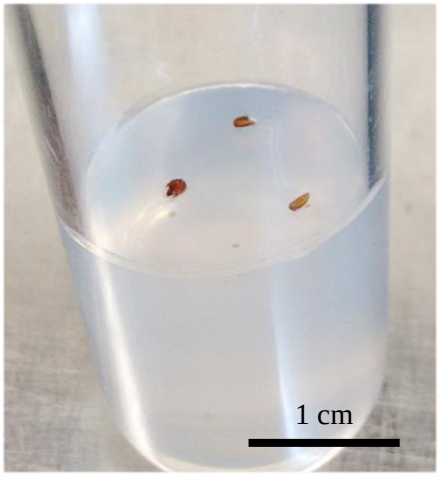


Figura 5: Tubo de ensaio com sementes de *L. pedunculata* e *L. multifida* num ensaio de germinação *in vitro*.

As taxas de contaminação neste ensaio foram reduzidas (inferiores a 5%), e nos casos onde ocorreu germinação mesmo com contaminação, esta foi desprezada, embora as plântulas não pudessem ser utilizadas nos ensaios ulteriores.

A taxa de germinação em *L. pedunculata* (Fig. 6a) para os dois tratamentos (MS+1,5% sacarose com 85,85% de germinação e MS+3% sacarose 90,28% germinação) foi bastante superior à verificada em *L. multifida* (Fig. 6b) (MS+1,5% sacarose com 63,63% germinação e MS+3% sacarose com 26,39% germinação).

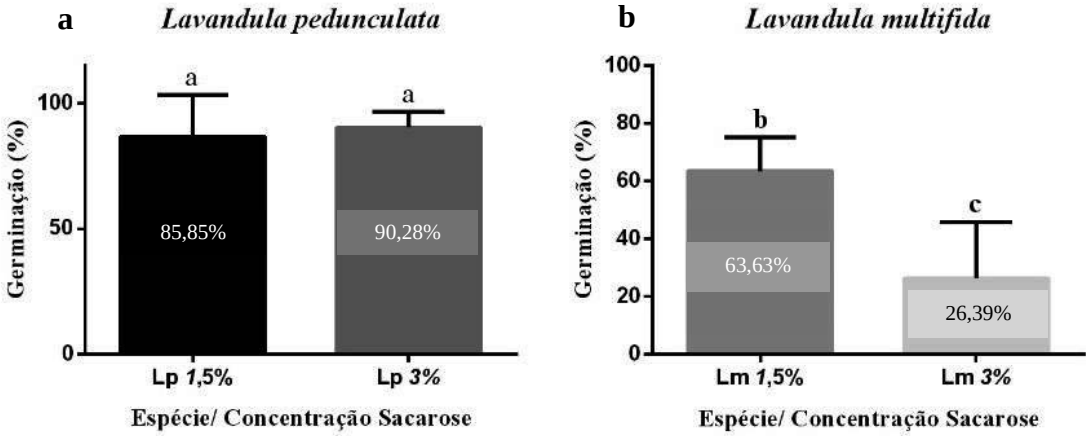


Figura 6 – Taxas de germinação em *L. pedunculata* e *L. multifida* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose (1,5% e 3%). a) *L. pedunculata* b) *L. multifida* (Letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$)).

Em *L. pedunculata* (Fig. 6a) a análise estatística não revelou qualquer diferença significativa na taxa de germinação entre o meio MS suplementado com 1,5% de sacarose e o suplementado com 3%, enquanto que em *L. multifida* (Fig. 6b) a análise estatística revelou diferenças significativas entre os dois tratamentos, sendo que o tratamento em que o meio MS foi suplementado com 1,5% de sacarose apresentou melhores resultados do que o tratamento com 3% de sacarose.

3.2. Multiplicação de segmentos nodais

As plântulas resultantes da germinação de sementes foram transferidas para tubos de ensaio que continham 10 mL de meio MS, suplementado com 3% de sacarose e sem adição de hormonas vegetais, com o intuito de manter uma coleção *in vitro* de exemplares das duas espécies, *L. pedunculata* (Fig. 7a, 7b) e *L. multifida* (Fig. 7c, 7d). As culturas foram mantidas com uma periodicidade bimensal, sendo que a partir de cada explante após os 2 meses de cultura existiam entre 3 a 4 segmentos nodais para isolar e multiplicar.

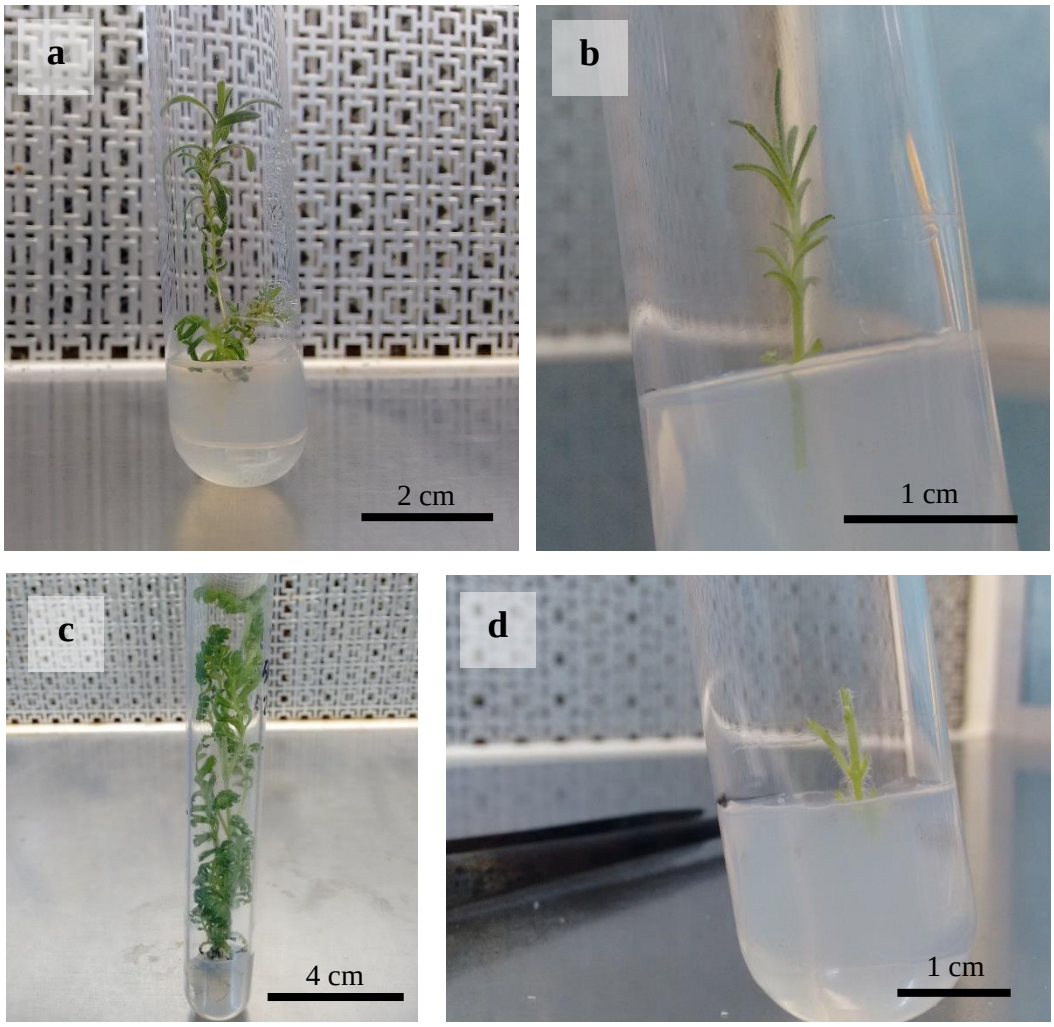


Figura 7: Micropropagação de *Lavandula pedunculata* e *Lavandula multifida* através da proliferação de meristemas axilares. a) rebento caulinar com aproximadamente 4 semanas de *L. pedunculata;* b) segmento nodal de *L. pedunculata*; c) rebento caulinar com aproximadamente 12 semanas de *L. multifida*; d) segmento nodal de *L. multifida*.

3.3. Efeito do meio líquido na cultura dos explantes

Após o tratamento com agentes c-mitóticos, os níveis de desenvolvimento e sobrevivência dos explantes foi analisado. Os explantes foram classificados como 1) desenvolvidos, nas situações em que o desenvolvimento foi pleno, foram considerados como 2) senescentes, quando o desenvolvimento do explante se iniciou corretamente mas ao fim de 1,5 meses, no fim do processo de análise, ou estagnou ou os explantes não resistiram e foram ainda classificados como 3) não desenvolvidos, quando o desenvolvimento nunca se iniciou e passados 1,5 meses não existiam alterações.

Para o cálculo da taxa de sobrevivência, os explantes senescentes e os não desenvolvidos foram incluídos no mesmo grupo, como não sobreviventes.

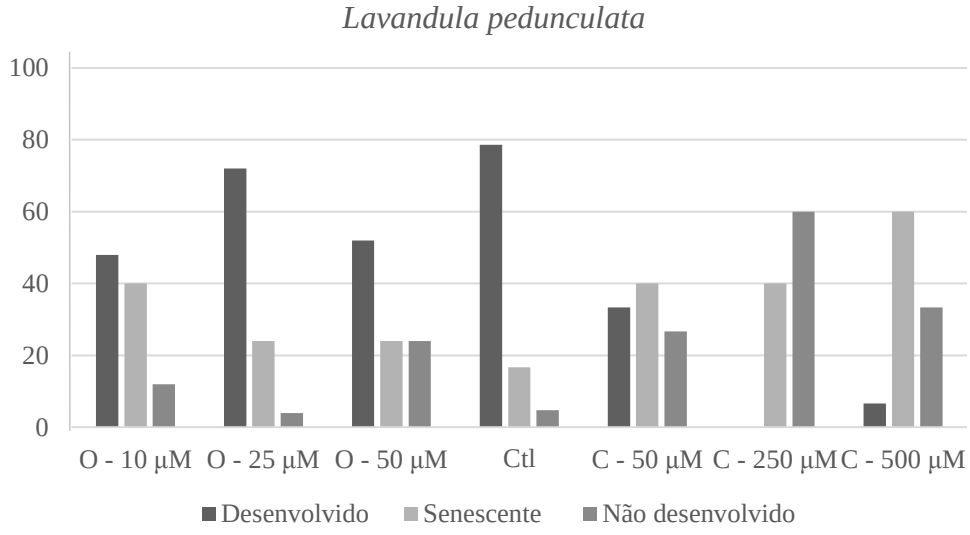


Figura 8: Explantes desenvolvidos, senescentes e não desenvolvidos em *L. pedunculata*. (O – tratamento com orizalina; C – tratamento com colquicina)

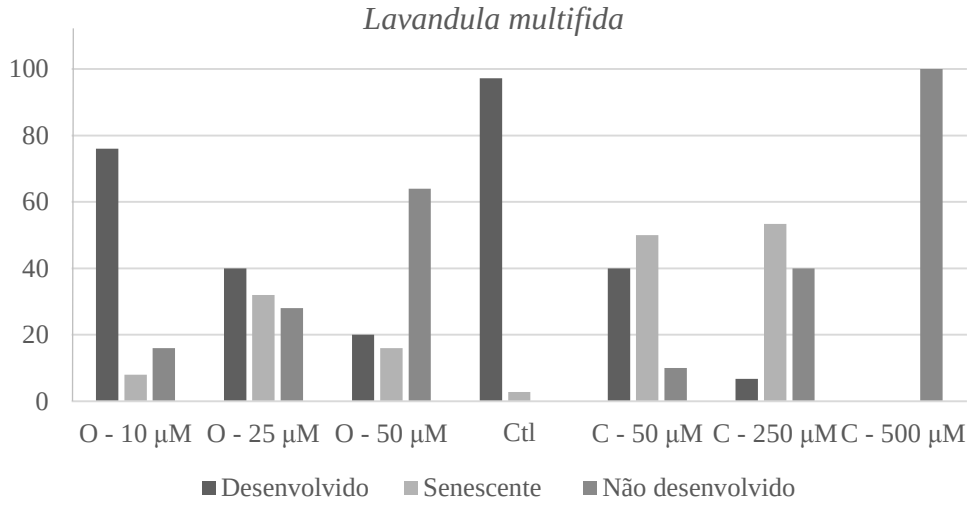


Figura 9: Explantes desenvolvidos, senescentes e não desenvolvidos em *L. multifida.* (O – tratamento com orizalina; C – tratamento com colquicina)

As taxas de sobrevivência dos explantes expostos à colquicina descem abruptamente do grupo controlo para os tratamentos com o agente, existindo um claro efeito nocivo na diminuição da sobrevivência dos explantes com o aumento da concentração do agente (Figs. 8,

9). As soluções foram autoclavadas, visto que para a colquicina a autoclavagem revelou ser mais segura e eficaz que a filtragem.

No tratamento controlo foi onde se verificou uma taxa de sobrevivência superior, aproximadamente 80% para *L. pedunculata* e aproximadamente 95% para *L. multifida.*

Em *L. multifida*, para a concentração de 500 μM de colquicina, não houve qualquer explante desenvolvido (Fig. 9), enquanto que para *L. pedunculata* foi nos 250 μM onde não se encontrou nenhum explante desenvolvido (Fig. 8), sendo que em ambas as espécies para concentrações de colquicina superiores a 250 μM, a taxa de sobrevivência foi sempre inferior a 20% (fig. 10a, 10b).

Para analisar a distribuição gaussiana dos dados, foram realizados testes de normalidade, onde a amostra não revelou uma distribuição normal e, deste modo, foi realizado um teste não paramétrico – Kruskal-Wallis.

O teste não paramétrico revelou a existência de diferenças significativas entre tratamentos tanto para *L. pedunculata* como para *L. multifida*, nomeadamente no tratamento controlo, onde foram descobertas diferenças significativas para os tratamentos de 250 μM e 500 μM (Figs. 10a, 10b).

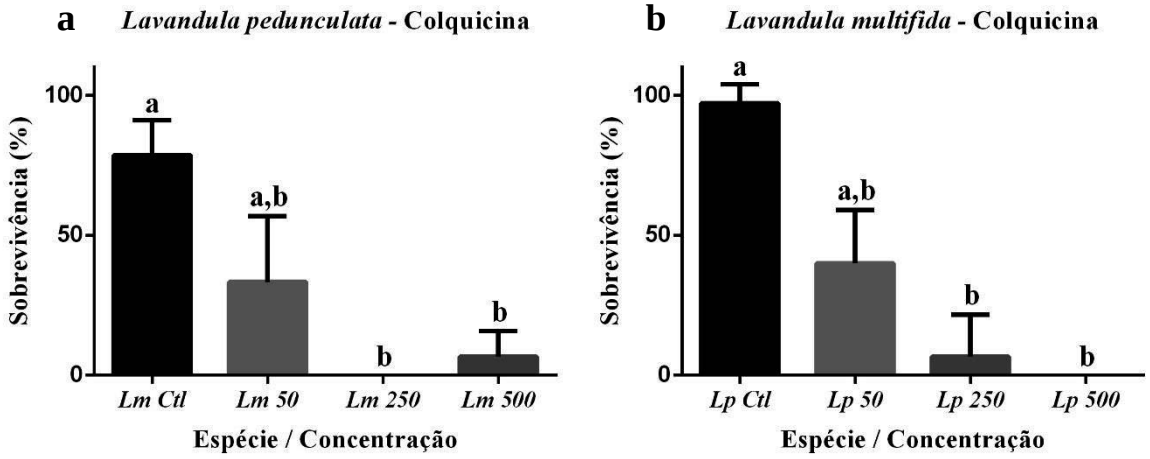


Figura 10: Análise das diferenças existentes na taxa de sobrevivência para os explantes sujeitos a tratamentos com colquicina; a) diferenças para *L. pedunculata;* b) diferenças para *L. multifida*.

A resposta das duas espécies em estudo em relação à resistência ao agente c-mitótico foi bastante distinta entre a colquicina e a orizalina. Enquanto que no que diz respeito à colquicina, as espécies revelaram o efeito nocivo do agente a partir de metade da concentração máxima utilizada, no caso da orizalina a taxa de sobrevivência foi na generalidade superior. Porém como

seria expectável, a um aumento da concentração do agente c-mitótico correspondeu uma diminuição da taxa de sobrevivência dos explantes.

Em *L. pedunculata,* a sobrevivência dos explantes foi sempre superior a 40% (Fig. 11a), e o aumento da concentração do agente não parece influenciar a taxa de sobrevivência (Fig. 11a). Este facto foi comprovado pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis, que revelou não existirem diferenças significativas entre os vários tratamentos e também pelo facto de a concentração onde se atingiu maior taxa de sobrevivência não foi aquela onde existia menor concentração do agente (Fig. 11a).

Em *L. multifida* o efeito nocivo do aumento da concentração do agente c-mitótico na taxa de sobrevivência dos explantes é facilmente observável na figura 11b, ocorrendo uma clara diminuição da sobrevivência ao longo da sequência crescente de concentrações. Neste caso a análise estatística revelou existirem diferenças significativas entre o tratamento controlo e os tratamentos com concentração de 25 μM e 50 μM de orizalina, nos quais se obtiveram taxas de sobrevivência inferiores a 50% (fig. 11b).

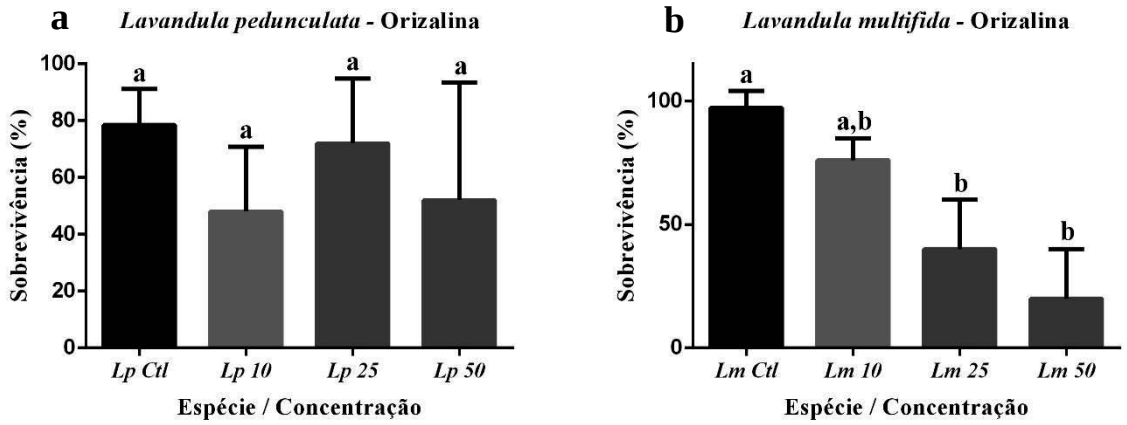


Figura 11: Análise das diferenças existentes na taxa de sobrevivência para os explantes sujeitos a tratamentos com orizalina; a) diferenças para *L. pedunculata;* b) diferenças para *L. multifida*.

3.4. Citometria de fluxo

De modo a avaliar a ploidia das plantas de *L. pedunculata* e *L. multifida* foi utilizada citometria de fluxo.

Em ambas as espécies de *Lavandula* os núcleos da fase G_0/G_1 foram bem visíveis, enquanto que os núcleos da fase G_2 eram muitas das vezes impercetíveis (Figs. 12, 13). Foram encontrados tecidos diplóides (Figs. 12a, 13a) e tecidos mixoplóides (tecidos da planta que possuem núcleos diplóides e tetraplóides em simultâneo) (Figs. 12b, 13b) em ambas as espécies. Tecidos unicamente tetraplóides foram apenas encontrados em *Lavandula pedunculata* (Fig. 13c).

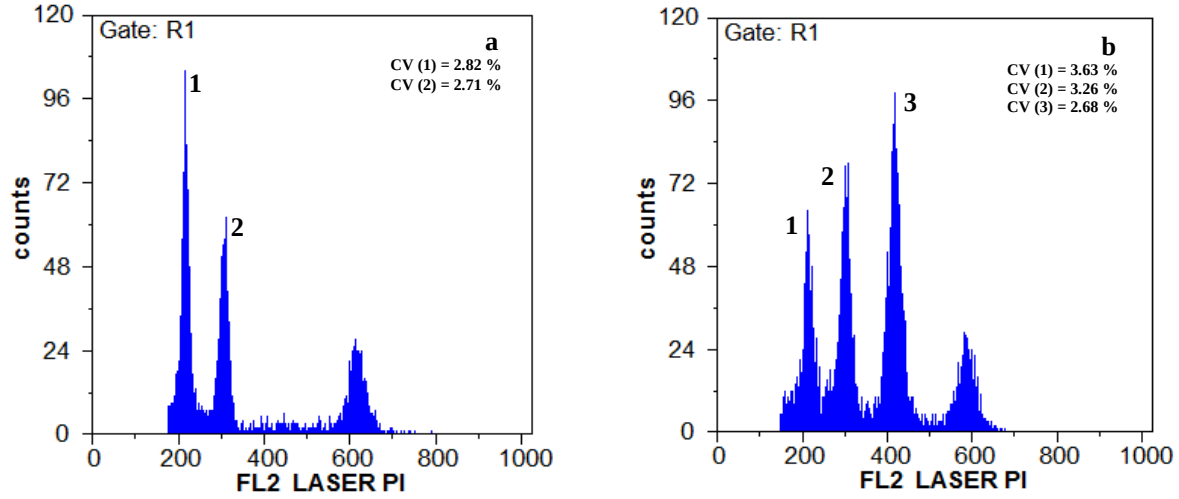
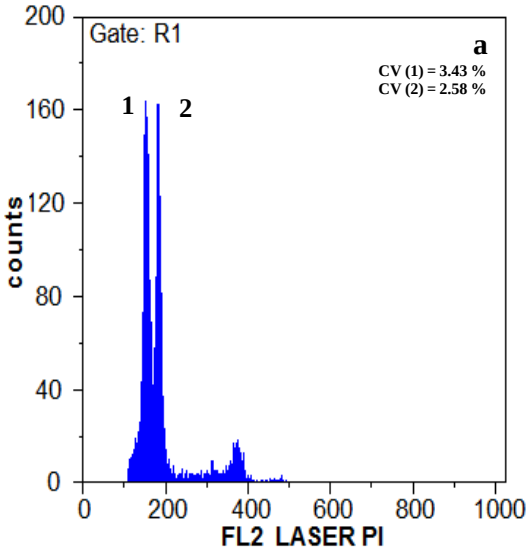


Figura 12: Histogramas de florescência relativa obtidos após análise em simultâneo de núcleos isolados de *Lavandula multifida* (picos 1 (2n) e 3 (4n)) e de um padrão de referência interna (*Raphanus sativus*, pico 2, 2C=1,11 pg DNA) a) plântula diplóide; b) plântula mixoplóide (as informações no canto superior direito de cada gráfico correspondem aos valores dos coeficientes de variação (CV) para os picos em questão).



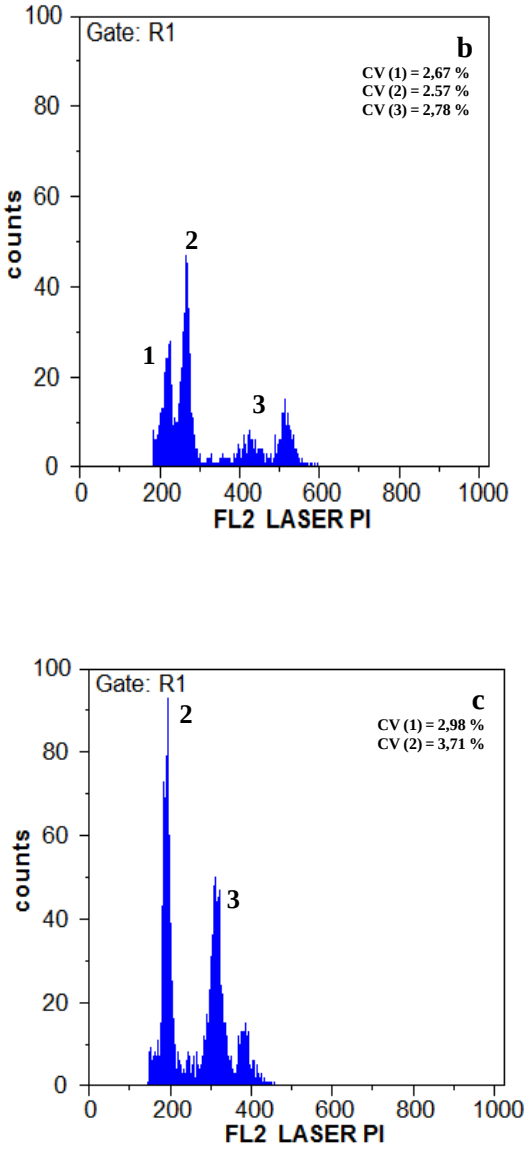


Figura 13: Histogramas de florescência relativa obtidos após análise em simultâneo de núcleos isolados de *Lavandula pedunculata* [pico 1 (2n) e 3 (4n)] e de um padrão de referência interna (*Raphanus sativus*, pico 2, 2C=1,11 pg DNA). a) plântula diplóide; b) plântula mixoplóide; c) plântula tetraplóide. (as informações no canto superior direito de cada gráfico correspondem aos valores dos coeficientes de variação (CV) para os picos em questão).

O índice de DNA para plantas diplóides de *L. pedunculata* variou entre 0.802 e 0,842, enquanto que para *L. multifida* variou entre 0,696 e 0,741. O tamanho do genoma de *L. pedunculata* variou entre 797,04 Mpb (mega pares de bases) e os 829,03 Mpb, enquanto que em *L. multifida* se situou entre 744,38 Mpb e 804,60 Mpb.

Em *L. pedunculata* o índice de DNA para as plantas mixoplóides foi em média 0,832 para os núcleos diplóides e 1,61 para os núcleos tetraploides, o tamanho do genoma foi em média 813,44 Mpb para os núcleos diplóides e 1575,37 Mpb para os núcleos tetraplóides. A proporção

de núcleos foi de 72,9% de núcleos diplóides para 27,1% de núcleos tetraplóides. No caso de *L. multifida* o índice de DNA para os núcleos diploides foi em média 0,709 e para os tetraploides 1,38, o tamanho do genoma calculado para os núcleos diploides foi em média de 772,62 e 1506,12 para os tetraploides. A proporção de núcleos diploides para tetraploides foi de 30,9% para 69,1%.

Para as plantas tetraplóides, apenas conseguidas em *L. pedunculata*, os valores do índice de DNA foram em média 1,619, enquanto que o tamanho de genoma foi de 1757,96 Mpb.

As plantas mixoplóides e tetraplóides foram novamente analisadas passados 30 dias da primeira análise e todas mantiveram o estado de ploidia da primeira análise.

3.5. Taxa de indução de poliploidia

Foi calculada a taxa de indução de poliploidia e das plantas que permaneceram diploides nas duas espécies, apenas com os dados das plantas que sobreviveram ao processo de indução, para cada agente c-mitótico.

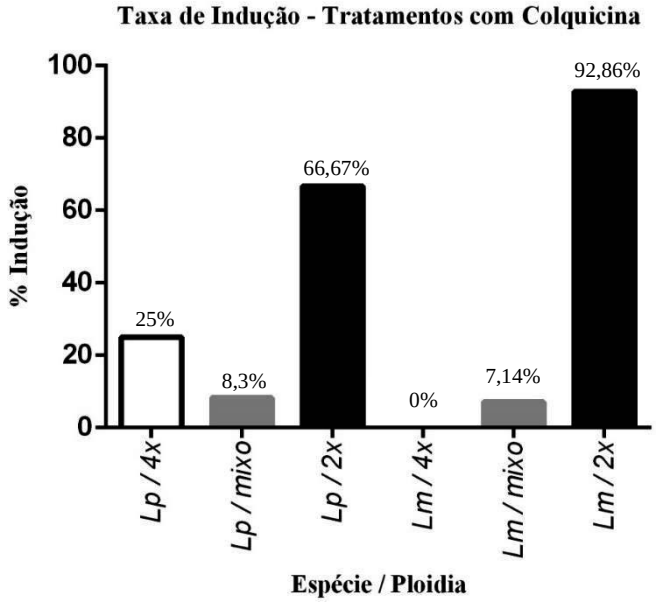


Figura 14: Taxas de indução de tetraploidia, mixoploidia e de indivíduos não modificados obtidos em *Lavandula pedunculata* (no gráfico Lp) e *Lavandula multifida* (no gráfico Lm) após exposição a tratamentos com colquicina. Os valores acima das barras correspondem à taxa de indução (em percentagem) apenas dos indivíduos que sobreviveram aos tratamentos (explantes desenvolvidos) e que foram analisados por citometria de fluxo.

Em *L. pedunculata* a taxa de indução de tetraploidia foi de 25% (Fig. 14) (16,66% no tratamento de colquicina a 50 μM e 8,33% no tratamento de 500 μM, o tratamento de 250 μM não originou nenhum indivíduo tetraplóide) e de mixoploidia foi de 8,33% (Fig. 14) (apenas um indivíduo no tratamento 50 μM). Em *L. multifida* não se originou qualquer indivíduo tetraplóide (Fig. 14), sendo que a taxa de indução de mixoplóides foi bastante reduzida (7,14%) (Fig. 14). Todos os indivíduos que não foram identificados como mixoplóides ou tetraplóides permaneceram no estado diplóide (66,67% para *L. pedunculata e* 92,86% para *L. multifida*) (Fig. 14).

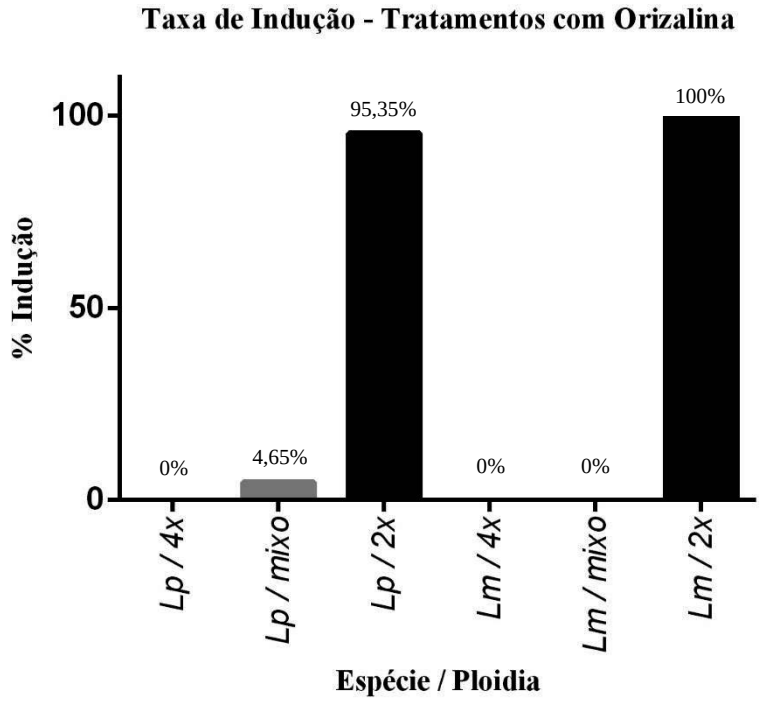


Figura 15: Taxas de indução de tetraploidia, mixoploidia e de indivíduos não modificados obtidos em *Lavandula pedunculata* e *Lavandula multifida* após exposição a tratamentos com orizalina. Os valores acima das barras correspondem à taxa de indução (em percentagem) apenas dos indivíduos que sobreviveram aos tratamentos (explantes desenvolvidos) e que foram analisados por citometria de fluxo.

Quando o agente c-mitótico utilizado foi a orizalina verificou-se que em *L. pedunculata* a taxa de indução de tetraploidia foi de 0% (Fig. 15), enquanto que a taxa de mixoploidia, foi de 4,65% (Fig. 15) (um indivíduo no tratamento de 25 μM e um indivíduo no tratamento de 50 μM). Em *L. multifida* não se obteve qualquer indivíduo tetraplóide ou mixoplóide (Fig. 15). Todos os indivíduos que não foram identificados como mixoplóides ou tetraplóides

permaneceram no estado diploide (Fig. 15) (95,35% para *L. pedunculata e* 100% para *L. multifida*).

A taxa de tetraploidia foi nula nos tratamentos com orizalina, e muito reduzida para os tratamentos com colquicina, originando-se no total apenas 3 indivíduos tetraplóides e apenas e *Lavandula pedunculata*. A indução de mixoplóides também não foi muito elevada em nenhum dos agentes c-mitóticos, situando-se sempre abaixo dos 10% e sendo nula em *Lavandula multifida* nos vários tratamentos com orizalina.

3.6. Enraizamento

Ao fim de 2 ou 3 ciclos de multiplicação, observou-se que os rebentos caulinares perdiam a capacidade de formar raízes espontaneamente. Deste modo, foi necessário induzir o enraizamento dos rebentos caulinares resultantes dos tratamentos com agentes c-mitóticos, num tratamento com uma modificação do meio MS (constituintes habituais reduzidos a 25% da concentração habitual), ao qual foi adicionado 0,2mg/L de NAA, durante 30 dias.

Tabela 3: Enraizamento em *L. pedunculata* e *L. multifida*.

Espécie	Sucesso no Enraizamento	Ploidia
Lavandula pedunculata	100% (18/18)	3 Tetraplóides
		1 Mixoplóide
		14 Diplóides
Lavandula multifida	82,35% (14/17)	0 Tetraplóides
		2 Mixoplóides
		15 Diplóides

Em *Lavandula pedunculata* foi obtida uma taxa de enraizamento de 100%, sendo que todos os rebentos caulinares tetraplóides, mixoplóides e diplóides conseguiram com sucesso formar raízes (Tabela 3; Fig. 16a).

Em *Lavandula multifida*, os resultados foram bons, porém inferiores aos obtidos em L. pedunculata. Foi obtida uma taxa de enraizamento de 82,35%, sendo que os 2 rebentos caulinares mixoplóides conseguiram com sucesso enraizar, todavia no caso dos explantes diplóides nem todas os rebentos conseguiram obter raízes.

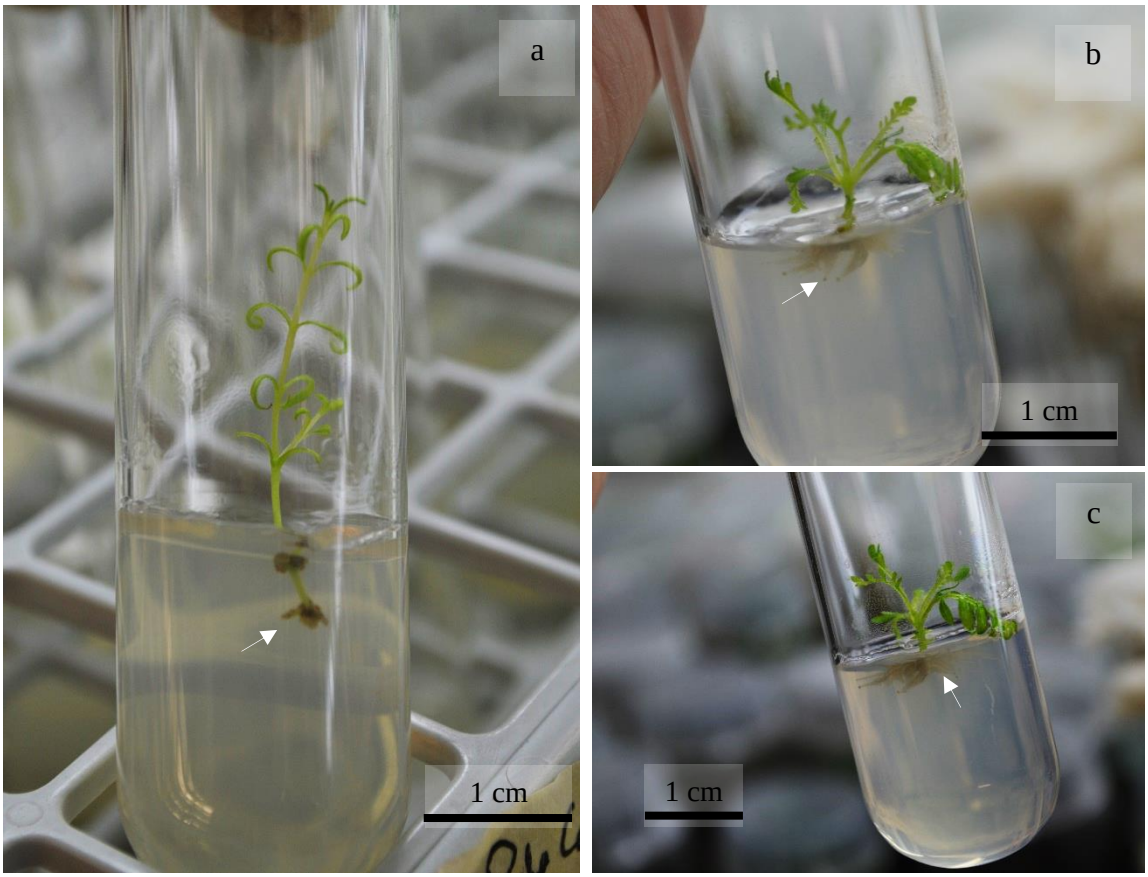


Figura 16: a) enraizamento em *Lavandula pedunculata*; b), c) enraizamento em *Lavandula multifida* (A posição das setas indica a posição da raiz).

3.7. Aclimatação

Para a comparação das características de desenvolvimento *ex vitro* entre as plantas de várias ploidias, as plantas cujo enraizamento foi bem-sucedido foram transferidas para substrato e colocadas num fitoclima com condições controladas e submetidas a um processo de aclimatação (Fig. 17) após o qual foram transferidas para uma estufa exterior. Durante aproximadamente um mês, foram estudadas três características do crescimento das plantas, a altura do caule, o comprimento da maior folha e a largura da maior folha.

Figura 17: Aclimatação; a) visão geral da disposição das plântulas; b), c) aclimatação de plantas de *Lavandula pedunculata*; d), e) aclimatação de plantas de *Lavandula multifida*.

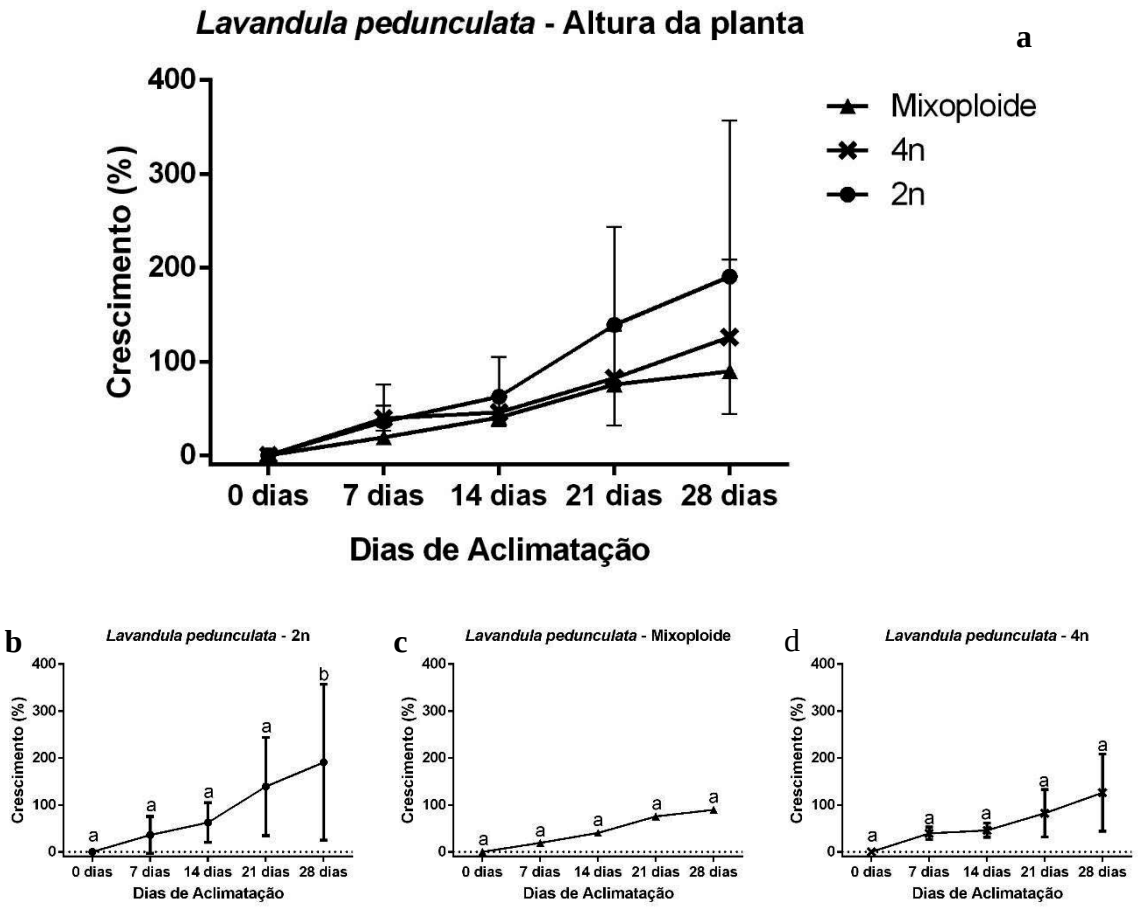


Figura 18: Gráfico resultante da ANOVA de 2 VIAS, revelando as diferenças na taxa de crescimento relativa à altura da planta em *Lavandula pedunculata*, durante os 28 dias de medição. a) comparação das taxas médias de crescimento entre plantas diplóides, tetraplóides e mixoplóides; b), c), d), análise de pormenor a evidenciar as diferenças entre tratamentos para diplóides (2n), mixoplóides e tetraplóides (4n), respetivamente (letras diferentes revelam diferenças significativas entre os tratamentos ($p<0,05$)).

As plantas diplóides foram as que obtiveram maiores taxas de crecimento, seguidas das plantas tetraplóides e das mixoplóide, com taxas de crescimento inferiores. Os gráficos b) c) d) da figura 18 revelam as diferenças significativas na taxa de crescimento entre os vários níveis de ploidia e ao longo do tempo, partindo do dia zero (0% de crescimento) até ao dia 28.

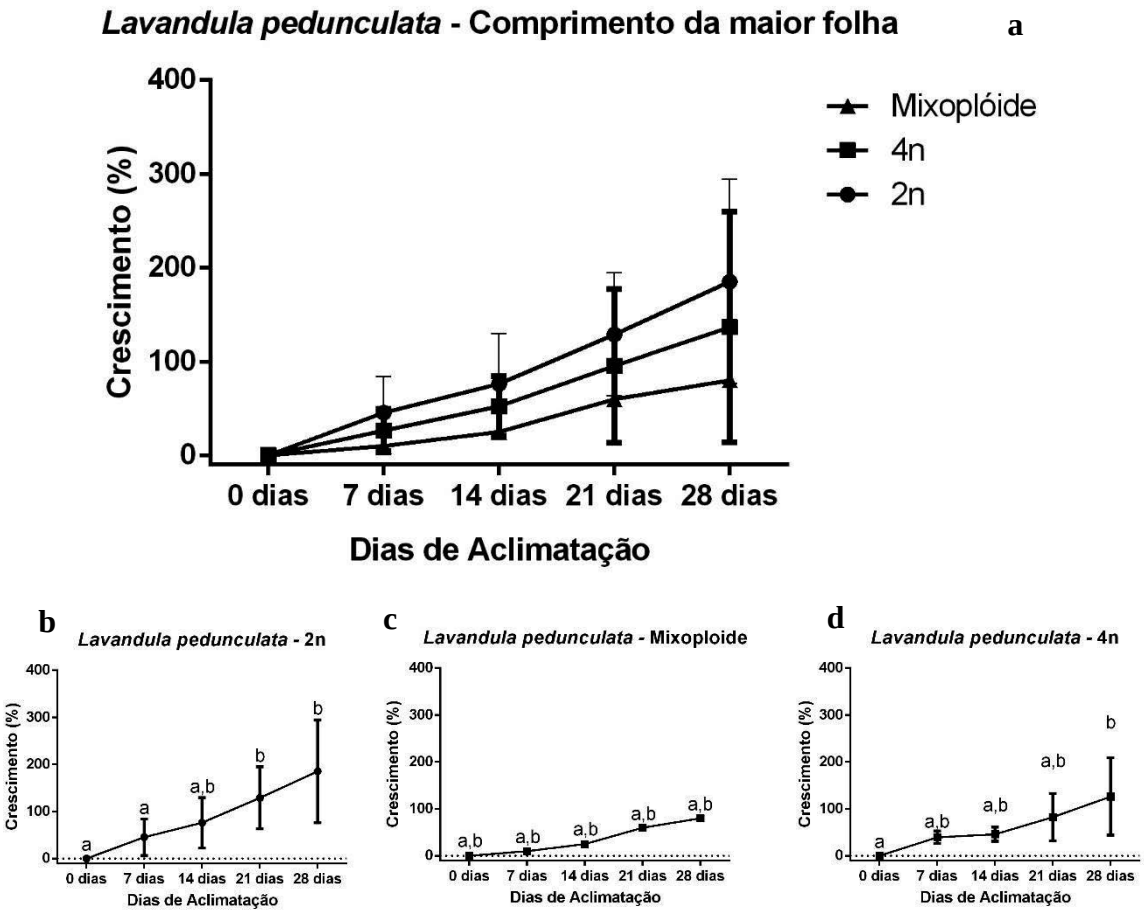


Figura 19: Gráfico resultante da ANOVA de 2 VIAS, revelando as diferenças na taxa de crescimento relativa ao comprimento da maior folha em *Lavandula pedunculata*, durante os 28 dias de medição. a) comparação das taxas médias de crescimento entre plantas diplóides, tetraplóides e mixoplóides; b), c), d), análise de pormenor a evidenciar as diferenças entre tratamentos para diplóides (2n), mixoplóides e tetraplóides (4n), respetivamente (letras diferentes revelam diferenças significativas entre os tratamentos ($p<0,05$)).

As plantas diplóides foram as que obtiveram superiores taxas de crescimento, seguidas das plantas tetraplóides e das mixoplóides, com taxas de crescimento inferiores. Os gráficos b) c) d) da figura 19 revelam as diferenças significativas na taxa de crescimento entre os vários níveis de ploidia e ao longo do tempo, partindo do dia zero (0% de crescimento) até ao dia 28.

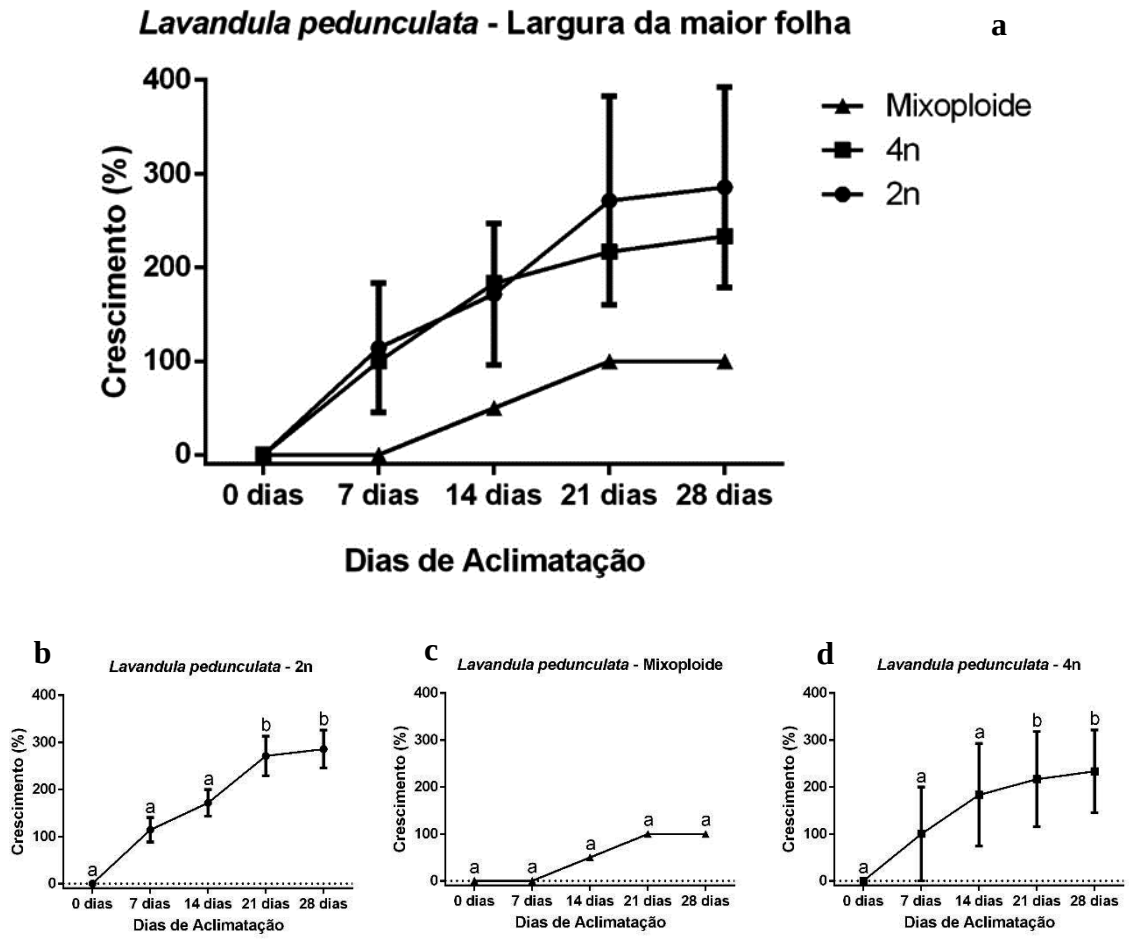


Figura 20: Gráfico resultante da ANOVA de 2 VIAS, revelando as diferenças na taxa de crescimento relativa à largura da maior folha em *Lavandula pedunculata*, durante os 28 dias de medição. a) comparação das taxas médias de crescimento entre plantas diplóides, tetraplóides e mixoplóides; b), c), d), análise de pormenor a evidenciar as diferenças entre tratamentos para diplóides (2n), mixoplóides e tetraplóides (4n), respetivamente (letras diferentes revelam diferenças significativas entre os tratamentos ($p<0,05$)).

As plantas diplóides foram as que obtiveram maiores taxas de crescimento, seguidas das plantas tetraplóides e das mixoplóides, com taxas de crescimento inferiores. Os gráficos b) c) d) da figura 20 revelam as diferenças significativas na taxa de crescimento entre os vários níveis de ploidia e ao longo do tempo, partindo do dia zero (0% de crescimento) até ao dia 28.

Em todas as análises em *Lavandula pedunculata*, as plantas diplóides apresentaram superior taxa de crescimento, revelando uma maior capacidade de adaptação às condições de aclimatação.

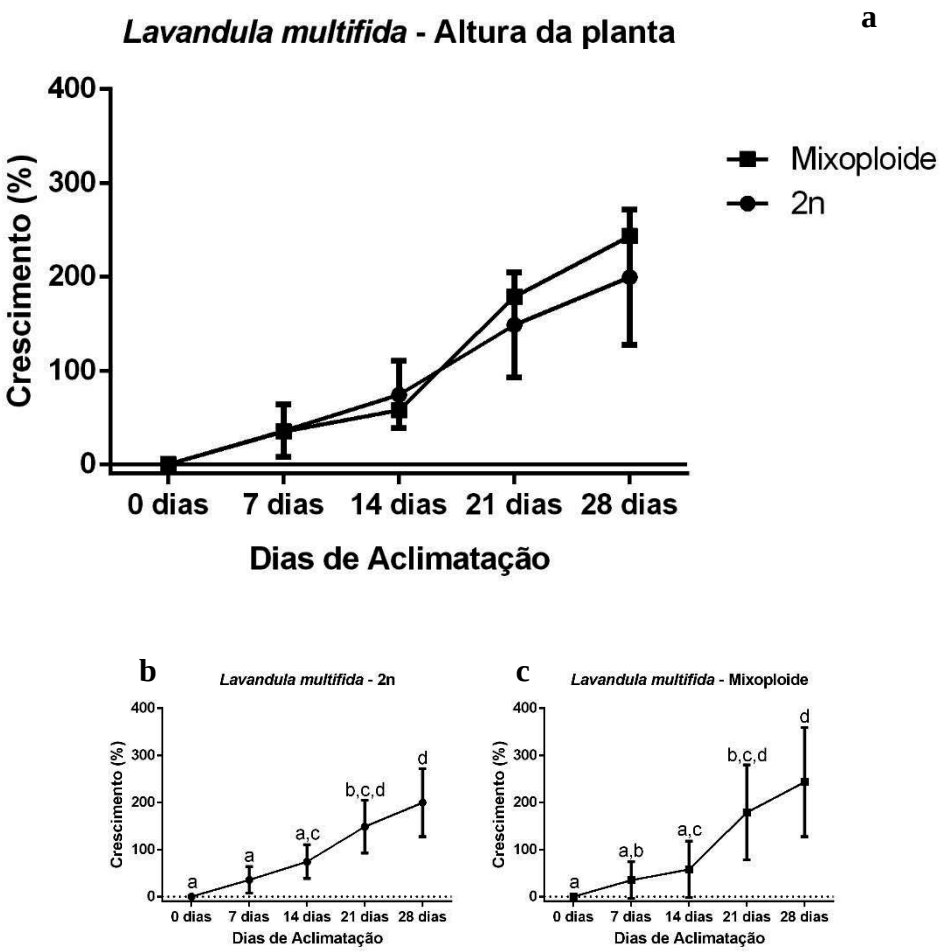


Figura 21: Gráfico resultante da ANOVA de 2 VIAS, revelando as diferenças na taxa de crescimento relativa à altura da planta em *Lavandula multifida* durante os 28 dias de medição. a) comparação das taxas médias de crescimento entre plantas diplóides e mixoplóides; figura b), c), análise de pormenor a evidenciar as diferenças entre tratamentos para diplóides (2n) e mixoplóides, respetivamente (letras diferentes revelam diferenças significativas entre os tratamentos ($p<0,05$)).

As plantas mixoplóides apresentaram taxas de crescimento superiores às plantas diplóides. Os gráficos b) c) da figura 21 revelam as diferenças na taxa de crescimento entre os vários níveis de ploidia e ao longo do tempo, partindo do dia zero (0% de crescimento) até ao dia 28.

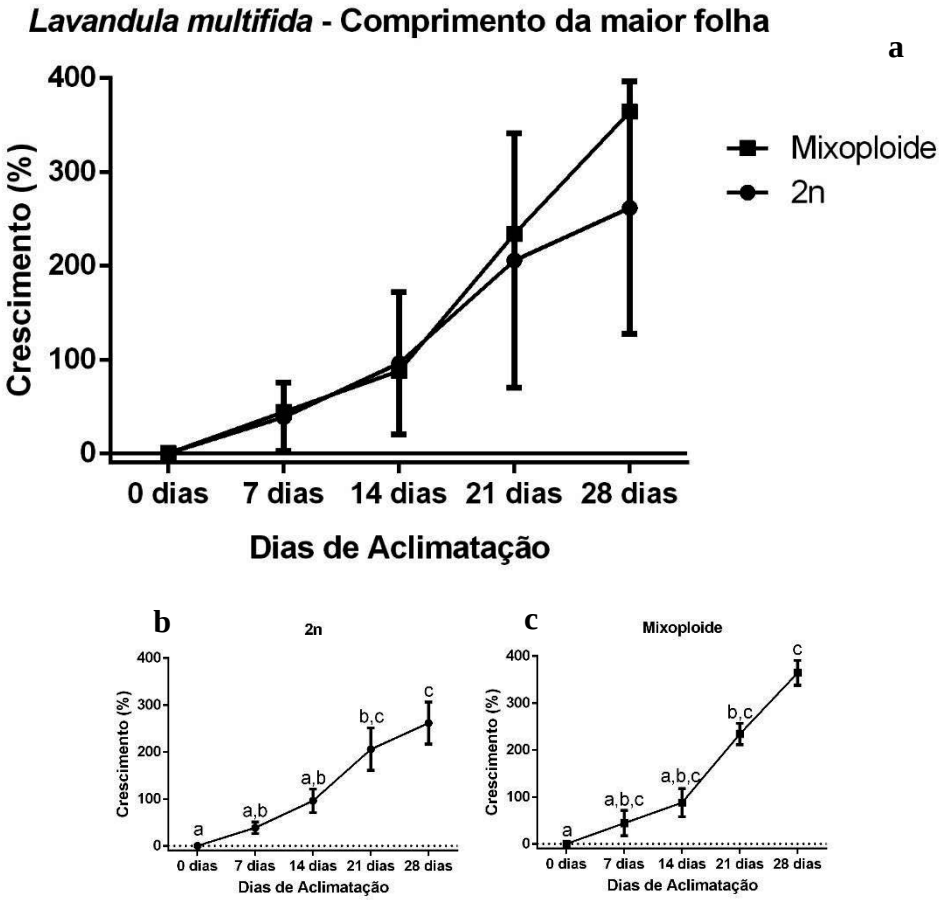


Figura 22: Gráfico resultante da ANOVA de 2 VIAS, revelando as diferenças na taxa de crescimento relativa ao comprimento da maior folha em *Lavandula multifida* durante os 28 dias de medição. a) comparação das taxas médias de crescimento entre plantas diplóides e mixoplóides; figura b), c), análise de pormenor a evidenciar as diferenças entre tratamentos para diplóides (2n) e mixoplóides, respetivamente (letras diferentes revelam diferenças significativas entre os tratamentos ($p<0,05$)).

As plantas mixoplóides apresentaram taxas de crescimento superiores às plantas diplóides. Os gráficos b) c) da figura 22 revelam as diferenças na taxa de crescimento entre os vários níveis de ploidia e ao longo do tempo, partindo do dia zero (0% de crescimento) até ao dia 28.

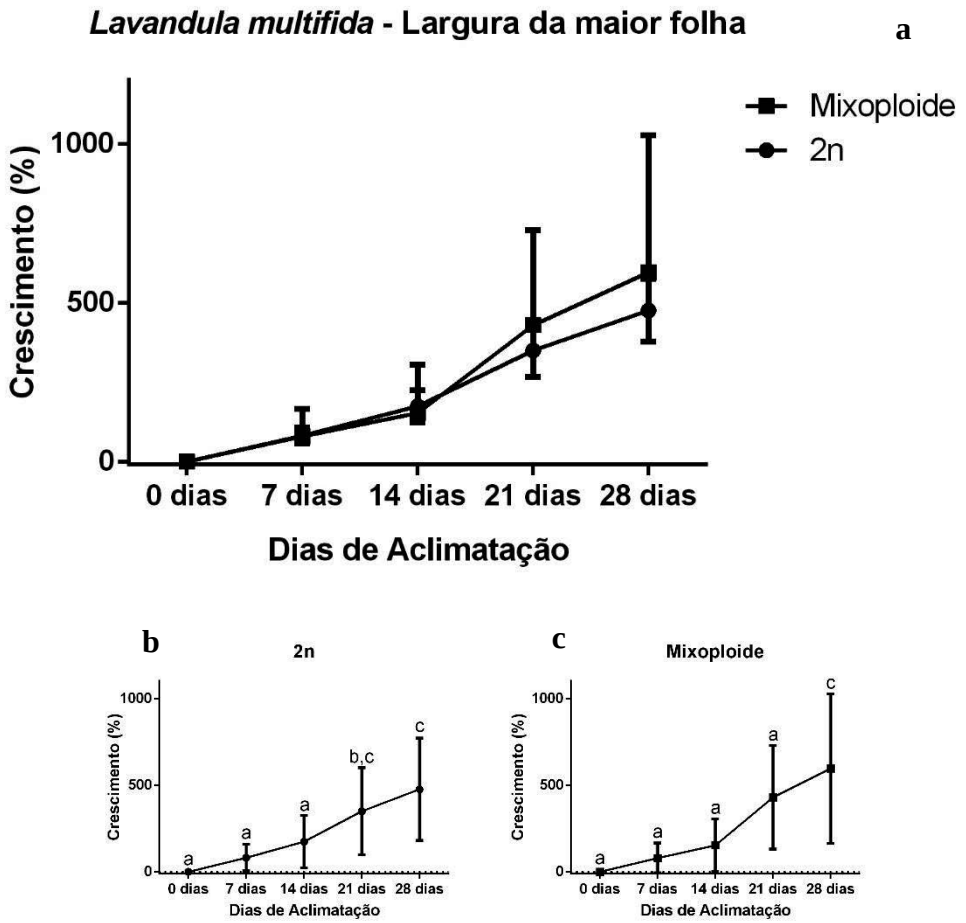


Figura 23: Gráfico resultante da ANOVA de 2 VIAS, revelando as diferenças na taxa de crescimento relativa à largura da maior folha em *Lavandula multifida* durante os 28 dias de medição. a) comparação das taxas médias de crescimento entre plantas diplóides e mixoplóides; figura b), c), análise de pormenor a evidenciar as diferenças entre tratamentos para diplóides (2n) e mixoplóides, respetivamente (letras diferentes revelam diferenças significativas entre os tratamentos ($p<0,05$)).

As plantas mixoplóides apresentaram taxas de crescimento superiores às plantas diplóides. Os gráficos b) c) da figura 23 revelam as diferenças na taxa de crescimento entre os vários níveis de ploidia e ao longo do tempo, partindo do dia zero (0% de crescimento) até ao dia 28.

As plantas diplóides em *L. pedunculata* apresentaram para todos os parâmetros avaliados melhores resultados de crescimento do que as plantas tetraplóides e mixoplóides. Em *L. multifida* as plantas mixoplóides revelaram uma melhor capacidade de adaptação às condições de aclimatação tendo sido obtidas superiores taxas de crescimento para todas as características em estudo.

3.8. Microscopia eletrónica de varrimento

Para visualização de tricomas (glandulares e não glandulares) presentes nas plantas diplóides, tetraplóides e mixoplóides, e analisar eventuais diferenças no formato, dimensão e densidade, foi utilizada a microscopia eletrónica de varrimento (Fig. 24). O mesmo foi realizado para analisar diferenças morfológicas e na dimensão dos complexos estomáticos (Fig. 25).

Em relação aos tricomas, as amostras eram relativamente pobres, e em regra geral os mesmos encontravam-se danificados, não permitindo retirar conclusões das diferenças entre espécies e ploidias para estas estruturas. Não obstante, foram encontrados alguns tricomas glandulares (Figs. 24a, 24b, 24c) e inclusive um tricoma bifurcado (Fig. 24d) em *Lavandula pedunculata*.

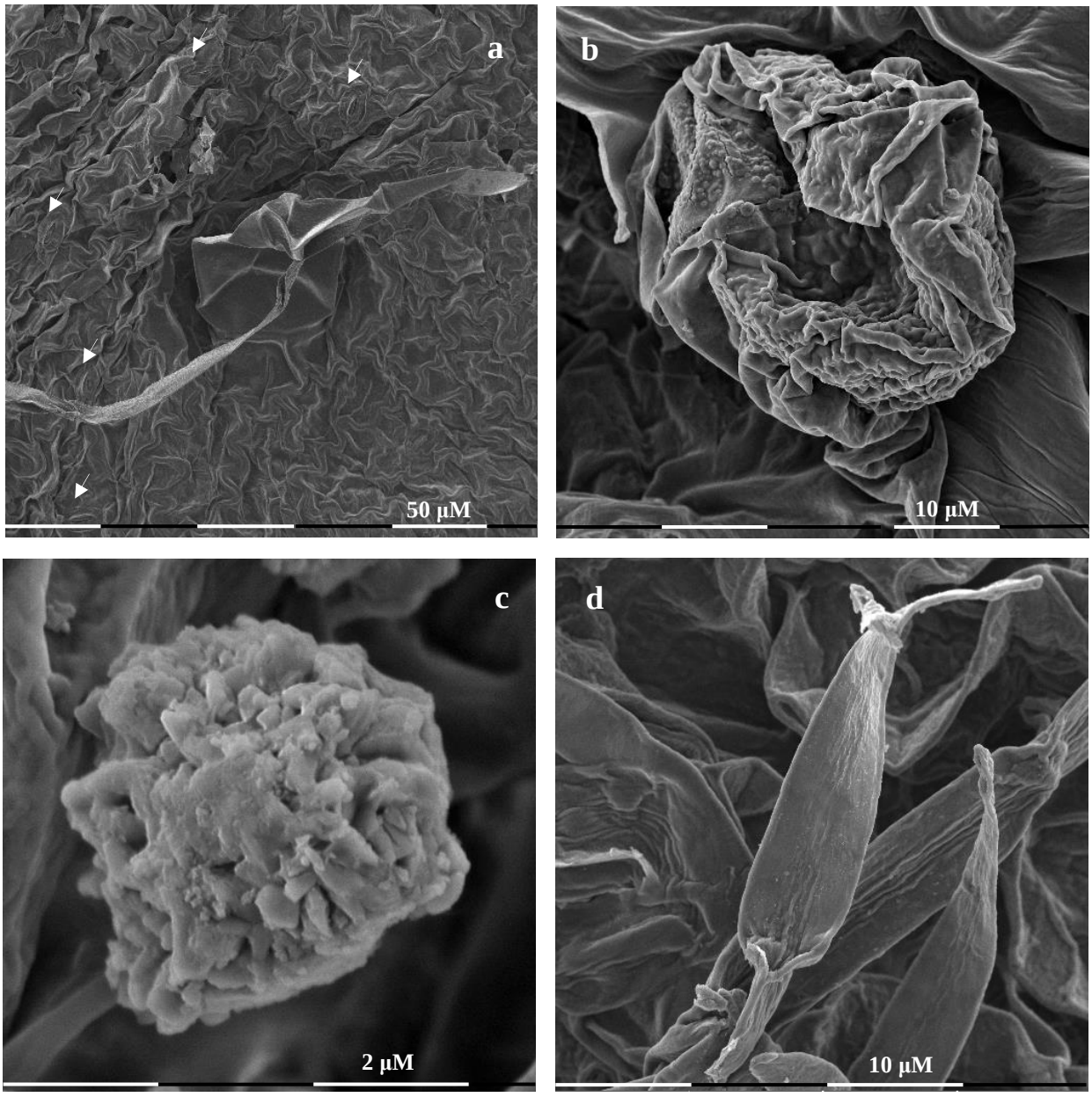


Figura 24: Tricomas em *Lavandula.* a) visão geral de tecido foliar em *Lavandula multifida* com destaque para um tricoma na posição central (as setas a branco representam estomas na superfície foliar; (ampliação 500x); b) tricoma glandular de um indivíduo mixoplóide de *Lavandula multifida* (ampliação 3000x); c) tricoma glandular de um indivíduo diplóide de *Lavandula multifida* (ampliação 20.000x); d) tricoma glandular bifurcado de um indivíduo mixoplóide de *Lavandula pedunculata* (ampliação 5000x).

As células estomáticas foram também alvo de análise para deteção de diferenças entre as dimensões dos indivíduos com níveis distintos de ploidia (Fig. 25). Foi estudado o comprimento e a largura de vários complexos estomáticos de plantas diplóides (Fig. 25a) e mixoplóides (Fig. 25b) em *L. multifida* e de plantas diplóides (Fig. 25c), tetraplóides (Fig. 25d) e mixoplóides em *L. pedunculata* e as médias foram comparadas de modo a inferir se as variações de ploidia fazem ou não variar a dimensão dos estomas. Os resultados foram comparados estatisticamente através do teste ANOVA de 1 VIA.

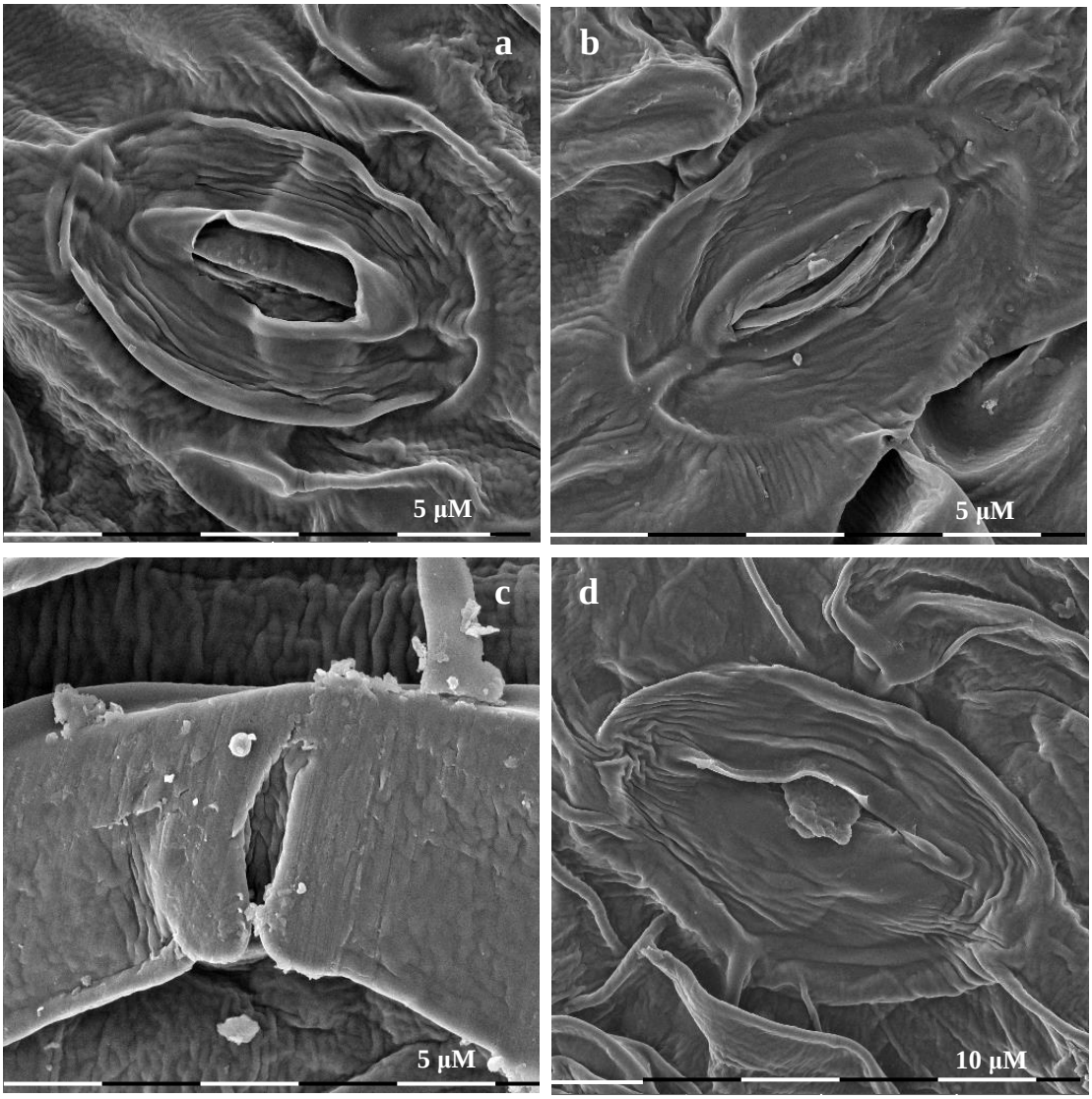


Figura 25: Estomas em *Lavandula multifida* e *Lavandula pedunculata*. a) estoma de planta diplóide de *L. multifida* (ampliação 5000x); b) estoma de planta mixoplóide de *L. multifida* (ampliação 5000x); c) estoma de planta diplóide de *L. pedunculata* (ampliação 7500x); d) estoma de planta tetraplóide de *L. pedunculata* (ampliação 3500x).

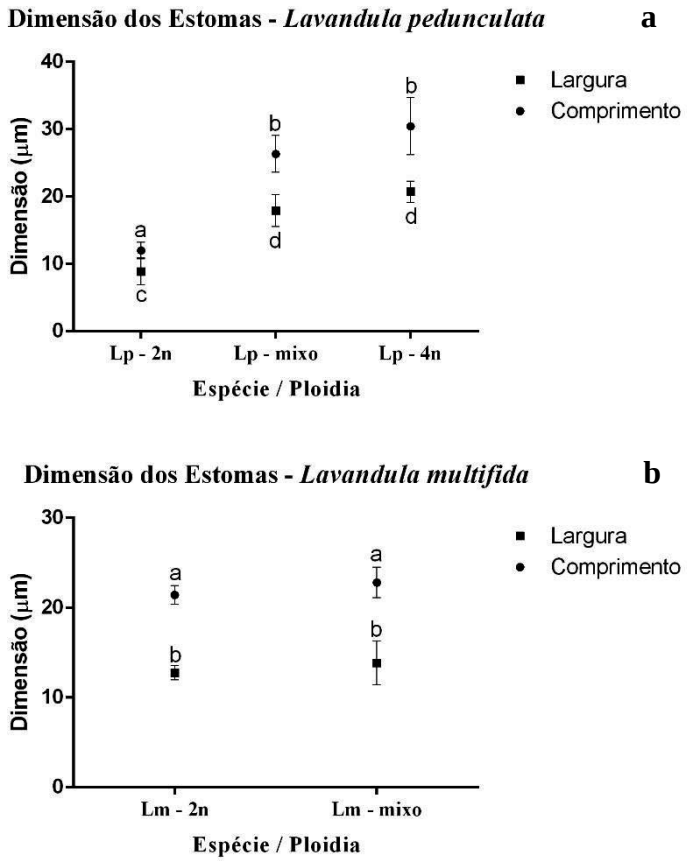


Figura 26: resultados da análise estatística das dimensões dos complexos estomáticos em *Lavandula pedunculata* e *Lavandula multifida*. a) dimensão dos estomas (comprimento e largura) em *L. pedunculata*; b) dimensão dos estomas (comprimento e largura) em *L. multifida* (letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os vários grupos).

Em *Lavandula pedunculata* (Fig. 26a), existe um claro aumento das duas dimensões em estudo com o aumento da ploidia das plantas em questão, sendo que a análise estatística descobriu diferenças estatísticas entre as plantas diplóides e as mixoplóides e tetraplóides, tanto para o comprimento como para a largura, podendo ser este um importante caracter para a identificação do nível de ploidia desta espécie. O desvio padrão das plantas mixoplóides é em média superior ao das outras plantas devido à grande divergência no tamanho dos complexos estomáticos encontrados nos tecidos dos indivíduos mixoplóides.

No caso de *Lavandula multifida* (Fig. 26b) não foram encontradas diferenças significativas nas dimensões dos estomas para diplóides e mixoplóides, no entanto, a comparação entre os desvios padrão permite concluir que existe uma maior variação do tamanho dos complexos estomáticos em plantas mixoplóides.

Capítulo 4 - Discussão

4.1. Germinação de sementes

A semente é uma estrutura resultante da reprodução sexuada e, por isso, perfeitamente adaptada à multiplicação das plantas (gimnospérmicas e angiospérmicas). Contudo, em algumas espécies, a propagação por semente apresenta limitações devido a dificuldades no processo de germinação (Engelmann *et al*., 1999; Berjak & Pammenter, 2000; Pammenter & Berjak, 2008; Walters *et al*., 2013), a recalcitrância, quando uma semente necessita de manter um determinado valor de humidade para manter a sua viabilidade, (Bewley & Black, 1982), a impermeabilidade do tegumento (Rolston, 1978; Baskin *et al*., 2000; Debeaujon *et al*., 2000) e a dormência (Khan, 1982; Koornneef *et al*., 2002; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006) são todos fatores condicionantes para a efetividade deste processo fisiológico.

Estudos de germinação na família Lamiaceae indicam a existência de uma dormência fisiológica, que pode ser quebrada com um período variável (para cada espécie) de estratificação (Albrecht & McCarthy, 2006). Nos ensaios realizados neste trabalho, a dormência das sementes não foi considerada como um fator importante, visto que foi colocado em germinação um elevado número de sementes e que mesmo que a germinação fosse reduzida, a micropropagação iria permitir um número adequado de explantes para os ensaios realizados.

A germinação foi realizada em meio de cultura MS, com diferentes concentrações de sacarose (1,5% e 3%) após dupla esterilização superficial das sementes e um período de embebição em água destilada esterilizada de 12 horas, e foi estudada a resposta das sementes à variação de sacarose no meio, tendo em conta as taxas de germinação obtidas.

As taxas de contaminação neste ensaio foram muito reduzidas (inferior a 5%), o que indica o sucesso do protocolo utilizado.

Os resultados em *Lavandula pedunculata* foram muito satisfatórios, tendo-se obtido taxas de germinação na ordem dos 90% (MS+3% sacarose - 90,3% germinação; MS+1,5% sacarose – 85,9%), não tendo sido encontradas diferenças estatísticas significativas nestes dois tratamentos. Estes resultados indicam que a propagação por sementes para *L. pedunculata* é um processo eficaz.

No caso de *Lavandula multifida*, os resultados não foram tão bons, com percentagens de germinação de 63,63%, no tratamento MS+1,5% sacarose, e de 26,4% no caso do tratamento MS+3% sacarose, tendo sido encontradas diferenças significativas entre estes dois tratamentos. São necessários mais ensaios para perceber a exata razão

pela qual as taxas de germinação para *L. multifida* foram tão reduzidas. Alterar os meios de cultura, sujeitar as sementes a períodos de estratificação ou escarificar as sementes poderão contribuir para uma melhoria dos resultados.

As plântulas resultantes deste ensaio de germinação possuíam fenótipo normal, apresentando esporadicamente fenómenos de hiperhidricidade.

4.2. Cultura *in vitro* de segmentos nodais

As técnicas de propagação vegetativa são muito utilizadas e as mais eficazes para a produção de um elevado número de indivíduos (Giles & Morgan, 1987; Debnath *et al*., 2006; de Gyves *et al*., 2007; Zuzarte *et al*., 2010; Georgiev *et al*., 2013). A micropropagação pode garantir a produção em larga-escala, num curto período de tempo e em condições controladas de plantas de interesse (Echeverrigaray *et al*., 2005; Prathanturarug *et al*., 2005; Idowu *et al*., 2009). De entre as técnicas passíveis de ser utilizadas em micropropagação, a proliferação de meristemas axilares é a mais adequada para a produção de clones (Saha *et al*., 2012), visto que permite manter a homogeneidade genotípica. Porém, ao contrário do que se pensava até há poucos anos atrás, a propagação por organogénese e a embriogénese somática na maioria dos casos também permitem manter a homogeneidade genotípica (Pandey *et al*., 2012; Rai *et al*., 2012; Cheruvathur *et al*., 2013; Haque & Ghosh, 2013).

Neste estudo segmentos nodais foram propagados em meio MS, sem adição de reguladores de crescimento vegetal, e os resultados foram ótimos, visto que em períodos inferiores a dois meses foram sempre obtidas plantas com um comprimento suficiente (aproximadamente 10 cm, 2 cm cada segmento nodal) para nova propagação, resultados que vão de acordo com estudos anteriores (Zuzarte *et al*., 2010; Gonçalves & Romano, 2013)

4.3. Cultura em meio líquido

A indução de poliploidia com recurso a agentes c-mitóticos é uma técnica antiga (Stebbins, 1956; Ranney, 2006), e vêm sendo obtidos resultados satisfatórios num grande número de espécies, tanto para cultura em meio líquido (Bhagyalakshmi *et al*., 1994) como para meio sólido agarizado. Os agentes c-mitóticos mais estudados e utilizados são a colquicina (Dermen, 1940; Dermen & Bain, 1944; Griesbach, 1981; Thao *et al*., 2003;

Rasuli & Sotudeh, 2007; Kobayashi *et al*., 2008; Lin *et al*., 2010; Omidbaigi *et al*., 2010; Urwin, 2014) e a orizalina (Madon *et al.*, 2005; Ascough *et al*., 2008; Jones *et al*., 2008; Miguel & Leonhardt, 2011).

Os agentes c-mitóticos bloqueiam a metafase do ciclo celular, formando complexos com a tubulina, que resultam numa inibição da formação do fuso acromático, impedindo a normal separação dos cromatídeos (Caperta *et al*., 2006), acabando os mesmos por ficar enclausurados numa nova membrana nuclear, formando um núcleo de restituição com o dobro do material genético normal.

Neste estudo foram utilizados dois agentes c-mitóticos com diferentes afinidades para a tubulina (Lehrer *et al*., 2008; Sakhanokho *et al*., 2009) e diferentes toxicidades para os tecidos vegetais (Zeng *et al*., 2006; Sarathum *et al*., 2010), e foi estudado o efeito de uma cascata crescente de concentrações dos agentes em meio líquido no desenvolvimento bem-sucedido dos explantes.

Devido à inferior afinidade da colquicina para a tubulina em comparação com a orizalina, as concentrações de colquicina utilizadas tiveram de ser superiores (colquicina – 50 μM, 250 μM e 500 μM; orizalina – 10 μM, 25 μM e 50 μM), o que resultou num efeito mais tóxico para o desenvolvimento dos explantes, havendo baixa taxa de desenvolvimento tanto para *L. pedunculata* (50 μM – 21,08%; 250 μM – 0%; 500 μM – 8,16%) como para *L. multifida* (50 μM – 40%; 250 μM – 6,66%; 500 μM – 0%), em comparação com o tratamento controlo, partilhado para os dois ensaios mas com número de réplicas maior e taxas de desenvolvimento muito superiores (*Lavandula pedunculata* – 78,57%; *Lavandula multifida* – 97,22%). No caso da orizalina as taxas de desenvolvimento foram superiores tanto para *L. pedunculata* (10 μM – 48%; 25 μM – 72%; 50 μM – 52%) como para *L. multifida* (10 μM – 76%; 25 μM – 40%; 50 μM – 8,20%), tal como o reportado em ensaios anteriores (Stanys *et al*., 2006), porém como mais tarde será discutido, o sucesso na indução foi muito inferior. Segundo alguns autores (Väinölä, 2000), a um aumento da concentração do agente, corresponde uma diminuição da taxa de desenvolvimento dos explantes, e este efeito fica patente no caso dos explantes sujeitos a colquicina, onde existe uma diminuição abrupta do desenvolvimento dos explantes nas concentrações superiores, e no caso de *L. multifida* nos tratamentos com orizalina.

Os explantes que efetivamente se desenvolveram no meio líquido, originaram folhas com dimensões muito superiores aos criados em meio sólido, e possuíam uma

coloração mais esbranquiçada, provavelmente devido ao período de indução passado na escuridão.

4.4. Determinação do nível de ploidia

A ploidia de todas as plantas desenvolvidas e de alguns indivíduos não desenvolvidos, mas dos quais foi possível retirar material vivo, foi analisada por citometria de fluxo.

Foram analisados um total de 91 indivíduos de *Lavandula pedunculata* e 99 de *Lavandula multifida*, todos os indivíduos que apresentaram alterações do conteúdo genómico revelaram ser explantes desenvolvidos, os explantes que acabaram por não se desenvolver mas que foram analisados revelaram ser todos diplóides, tendo mantido o seu conteúdo genético original.

De entre as plantas tratadas com colquicina, em *L. pedunculata*, foram encontrados 3 indivíduos tetraplóides (2 indivíduos no tratamento de 50 μM e 1 indivíduo no tratamento de 500 μM, correspondente a 25% de indução) com um tamanho genómico de 1757,96 Mpb. Estes resultados necessitam de confirmação visto não estarem presentes em nenhuma das principais bases de dados de tamanho genómico. Foi ainda obtida uma planta mixoplóide, em que os núcleos diplóides possuíam em média 813,44 Mpb e os tetraplóides 1575,37 Mpb, e 8 indivíduos diplóides com tamanho genómico de 813,44 Mpb. No caso de *L. multifida* foi detetado 1 indivíduo mixoplóide e 13 indivíduos diplóides. Através da análise das taxas de indução podemos concluir que o tratamento de 50μM foi o tratamento com melhores resultados nesta experiência.

Os indivíduos pertencentes ao grupo controlo exibiram todos o comportamento esperado mantendo a diploidia.

Nos tratamentos com orizalina as taxas de indução foram muito insatisfatórias, sendo que apenas em *L. pedunculata* foram encontrados 2 indivíduos mixoplóides (correspondente a 4,7% de indução) e nenhum tetraplóide, e os restantes 42 explantes permaneceram diplóides. Em *L. multifida*, a taxa de indução de mixoplóides e tetraplóides foi nula.

Os explantes isolados dos tratamentos com agentes c-mitóticos que se desenvolveram tiveram um crescimento normal, sem quaisquer anomalias fenotípicas facilmente identificáveis, variando apenas a cor das folhas entre os tetraplóides de *L.*

pedunculata para os diplóides, possuindo os tetraplóides uma tonalidade verde mais pronunciada.

As plantas mixoplóides das duas espécies mostraram-se bastante diferentes em termos de proporção de núcleos com diferentes níveis de ploidia. Assim, em *L. multifida*, os núcleos tetraplóides encontravam-se em número superior (proporção 3:1 aproximadamente), e passados 30 dias, na segunda análise, a ploidia permanecia igual. No caso de *L. pedunculata* a quantidade de núcleos diplóides era superior aos tetraplóides (proporção 4:1 aproximadamente), e na análise passados 30 dias a situação mantinha-se.

Um outro método testado para comparar a ploidia das plantas foi a medição das características bidimensionais dos complexos estomáticos (comprimento x largura) através de fotografias de microscopia eletrónica de varrimento. Seria de esperar que a um aumento da ploidia correspondesse um aumento das dimensões do complexo estomático (Foschi *et al*., 2013; Jang *et al*., 2014; Tavan *et al*., 2015; Monda *et al*., 2016), e que nos indivíduos mixoplóides ocorressem complexos estomáticos com características diplóides e tetraplóides. O aumento médio das dimensões dos complexos estomáticos foi comprovado para *L. pedunculata* (4n – 30,45 x 20,74 μM; mixo – 26,36 x 17,91 μM; 2n – 12,02 x 8,89 μM), onde existe um claro aumento, superior ao dobro, de ambas as dimensões avaliadas com o aumento da ploidia, e também através de um teste de análise de variâncias, onde foram encontradas diferenças significativas entre ambas as dimensões das plantas diplóides, para as plantas mixoplóides e tetraplóides. Em *L. multifida* este efeito não foi comprovado (mixo – 22,82 x 13,87 μM; 2n – 21,43 x 12,76), e embora as plantas mixoplóides possuam dimensões ligeiramente superiores, não foram encontradas diferenças significativas no teste de análise de variâncias.

4.5. Enraizamento

Um fenómeno ocorrido a partir do terceiro ou quarto ciclo de propagação foi a perda da capacidade de enraizamento dos rebentos caulinares. O mesmo fenómeno ocorreu nos explantes isolados dos tratamentos com agentes c-mitóticos, que também não foram capazes de criar as suas próprias raízes e como tal tiveram de ser sujeitos a enraizamento num meio próprio, desenvolvido por (Andrade *et al*., 1999), onde se alterou a concentração habitual dos componentes do meio MS e ao qual foi adicionado GA_3. Ao fim dos 30 dias do tratamento foi registado quais os explantes que tinham efetivamente produzido raiz, seguindo para fase de aclimatação, em condições controladas.

O resultado final do enraizamento para as duas espécies em termos morfológicos foi bastante diferente, visto que em *L. multifida* as raízes possuíam elevada densidade de pelos radiculares de tonalidade esbranquiçada, enquanto que em L. pedunculata, as raízes possuíam 2, 3 ou 4 pelos radiculares principais, de tonalidade mais escura. Na fase de aclimatação, ocorreu uma mortalidade na ordem dos 50% para ambas as espécies, o que indica que provavelmente parte das raízes formadas não seriam funcionais, assim urge melhorar a sobrevivência nesta fase, novos ensaios são necessários para produzir maior densidade e melhores raízes em termos funcionais nas duas espécies.

4.6. Aclimatação

As plantas que possuíam raízes com um desenvolvimento adequado sofreram um processo de aclimatação num fitoclima com temperatura e humidade controladas, sendo colocadas em vasos plásticos com substrato (perlite + turfa + terra), e foram analisados três parâmetros, sob a forma de taxa de crescimento, ao longo de 28 dias, com um período entre medições de 7 dias, para as plantas dos três tipos de ploidia, tetraplóides, mixoplóides e diplóides. Os parâmetros analisados foram a altura da planta, o comprimento da maior folha e a largura da maior folha.

Em *L. pedunculata* as plantas diplóides apresentaram de forma consistente, superiores taxas de crescimento para os três parâmetros em questão, o que parece indicar uma maior capacidade de adaptação dos diplóides ao novo ambiente, não obstante deste resultado, tanto a planta mixoplóide como as tetraplóides se desenvolveram normalmente, apenas mais lentamente do que as plantas diplóides. Em relação à altura da planta, as plantas diplóides no final dos 28 dias de medição, tinham em média aumentado para 200% da sua altura original, enquanto que os tetraplóides se ficaram por aproximadamente 100% e os mixoplóide por um valor a rondar os 80%. No que diz respeito ao comprimento da maior folha, os resultados são consistentes com os anteriores, tendo os indivíduos diplóides apresentado superiores taxas de crescimento, novamente na ordem dos 200% ao fim de 28 dias, com os tetraplóides a apresentar taxas na ordem dos 120% e os mixoplóide na ordem dos 95% de crescimento. O mesmo sucede no parâmetro largura da maior folha, no qual os diplóides voltam a apresentar melhores resultados, na ordem dos 280% de crescimento, os tetraplóides situam-se nos 200% e o indivíduo mixoplóide nos 100%.

Em *L. multifida* a ordem das taxas de crescimento inverteu-se, sendo que os indivíduos mixoplóides apresentaram taxas de crescimento superiores em comparação com os diplóides. No parâmetro altura da planta, os mixoplóides apresentaram taxas de crescimento na ordem dos 230% enquanto que os indivíduos diplóides exibiram taxas de crescimento na ordem dos 200%. No caso do comprimento da maior folha, as taxas de crecimento para mixoplóides foram muito elevadas, na ordem dos 350% de crescimento, ficando os diplóides por um valor a rondar os 250% de crescimento. No parâmetro largura da maior folha, o crescimento nos mixoplóides e diplóides foi estupendo, atingindo-se uma taxa na ordem dos 500%.

4.7. Tricomas

Através de microscopia eletrónica de varrimento procurou-se catacterizar os tricomas glandulares em *L. pedunculata* e *L. multifida*. Os resultados ficaram aquém do esperado, tendo-se encontrado reduzida densidade de tricomas glandulares para as três ploidias em estudo, e na maioria dos casos encontrados encontravam-se relativamente degradados, provavelmente devido ao processo de metalização da amostra, que é um processo algo violento para estruturas tão sensíveis como os tricomas. Não foi possível retirar conclusões desta análise, nomeadamente devido à falta de tricomas e à situação estrutural dos mesmos.

Capítulo 5 – Conclusão e perspetivas futuras

O principal objetivo deste trabalho foi em parte concretizado, foram conseguidas 3 plantas tetraplóides e 3 mixoplóides em *Lavandula pedunculata*, com taxas de indução reduzidas. Porém o mesmo não foi conseguido em *Lavandula multifida*, onde foi apenas conseguida 1 planta mixoplóide.

Tendo em conta os resultados foi possível perceber que para *Lavandula pedunculata*, a utilização de colquicina, como suplemento a meio MS líquido, com uma concentração de 50 μM será o ideal. São necessários ensaios complementares de modo a avaliar o tempo de exposição ao agente, visto que apenas foram utilizados 6 dias de exposição. Uma redução do tempo de exposição poderá aumentar a taxa de sobrevivência das plantas ao tratamento e desse modo aumentar o número de plantas tetraplóides. Para *Lavandula multifida* é necessária uma reformulação do protocolo, provavelmente aumentando a concentração dos agentes e diminuindo o tempo de exposição, e eventualmente utilizar diferentes agentes c-mitóticos. Após os 6 dias de indução os explantes são lavados em destilada autoclavada e isolados para meio de cultura MS sólido. A ploidia das plantas foi avaliada por citometria de fluxo e posteriormente pelas dimensões (comprimento e largura) dos complexos estomáticos de algumas plantas selecionadas.

O enraizamento das plantas modificadas, bem como de algumas plantas diplóides, foi realizado com um tratamento com meio MS, em que a concentração dos vários constituintes foi reduzida a 25% do normal, e ao qual foram adicionados 0,2 mg/L de NAA. Todos os explantes de *Lavandula pedunculata* conseguiram formar raízes, enquanto que apenas cerca de 80% das plantas de *Lavandula multifida* foram capazes de produzir raízes. Mais estudos em relação ao enraizamento e às condições de aclimatação, nomeadamente o substrato utilizado são essenciais para a passagem das plantas com sucesso para condições exteriores, visto a taxa de mortalidade no processo de aclimatação ter sido elevada.

Através de microscopia eletrónica de varrimento foi tentado analisar a densidade e a variação do tamanho de tricomas glandulares entre ploidias nas duas espécies, porém o mesmo não foi bem sucedido visto que a maioria dos tricomas encontrados estavam danificados, provavelmente devido à agressividade do protocolo de preparação das amostras. Através desta técnica de microscopia foi possível analisar as características bidimensionais dos complexos estomáticos e tentar relacionar um aumento da dimensão do complexo com um aumento da ploidia, o que se comprovou para *Lavandula pedunculata.*

Em passos futuro neste trabalho, a passagem das plantas modificadas para condições exteriores para estudar o seu comportamento é essencial para perceber se as plantas podem ou não ser utilizadas com fins económicos.

A análise qualitativa e quantitativa dos óleos das plantas tetraplóides em contraponto com a análise dos óleos em plantas diplóides é imperativa para inferir se existem ou não vantagens na utilização destas plantas geneticamente modificadas.

Capítulo 6 - Referências

Adams, K. L., & Wendel, J. F. (2005). Polyploidy and genome evolution in plants. Current opinion in plant biology, *8*(2), 135-141.

Albrecht, M. A., & McCarthy, B. C. (2006). Seed germination and dormancy in the medicinal woodland herbs *Collinsonia canadensis* L.(Lamiaceae) and *Dioscorea villosa* L.(Dioscoreaceae). Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, *201*(1), 24-31.

Allard, R. W. (1999). *Principles of plant breeding*. John Wiley & Sons.

Andrade, L. B., Echeverrigaray, S., Fracaro, F., Pauletti, G. F., & Rota, L. (1999). The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). Plant cell, tissue and organ culture,*56*(2), 79-83.

Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., & Cabras, P. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of Lavandula stoechas L. ssp. stoechas essential oils from stem/leaves and flowers. Journal of agricultural and food chemistry, *54*(12), 4364-4370.

Antunes, P. (2010). Indução de plantas tetraplóides através de tratamento com agentes cmitóticos no tamarilho *(Cyphomandra betacea)* e no medronheiro *(Arbutus unedo)* (Tese de mestrado. Universidade de Coimbra).

Ascensão, L., Marques, N., & Pais, M. S. (1995). Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). Annals of Botany, *75*(6), 619-626.

Ascough, G. D., Van Staden, J., & Erwin, J. E. (2008). Effectiveness of colchicine and oryzalin at inducing polyploidy in *Watsonia lepida* NE Brown.*HortScience*, *43*(7), 2248-2251.

Bailey, J. K., Deckert, R., Schweitzer, J. A., Rehill, B. J., Lindroth, R. L., Gehring, C., & Whitham, T. G. (2005). Host plant genetics affect hidden ecological players: links among Populus, condensed tannins, and fungal endophyte infection. Canadian Journal of Botany, *83*(4), 356-361.

Barbosa, P., Lima, A. S., Vieira, P., Dias, L. S., Tinoco, M. T., Barroso, J. G., & Mota, M. (2010). Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Journal of nematology, *42*(1), 8-16.

Baskin, J. M., Baskin, C. C., & Li, X. (2000). Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. Plant Species Biology, *15*(2), 139-152.

Beck, C. B. (2010). An introduction to plant structure and development: plant anatomy for the twenty-first century. Cambridge University Press.

Beck, S. L., Dunlop, R. W., & 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, *141*(2), 177-181.

Berjak, P., & Pammenter, N. (2000). What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. In *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* (12), 22-55. Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal.

Berjak, P., & Pammenter, N. W. (2008). From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. *Annals of Botany*, *101*(2), 213-228.

Bewley, J. D., & Black, M. (1982). Physiology and biochemistry of seeds. Vol. 2. *Springerverlag. Berlin*.

Bhagyalakshmi, B., Narasimhan, S., & Narenda, S. (1994). The yield and quality of ginger produced by micropropagated plants as compared with conventionally propagated plants. Journal of Horticultural Science, 69(4), 645-651.

Borlaug, N. E., & Dowswell, C. R. (2003, May). Feeding a world of ten billion people: a 21st century challenge. In Proceedings of the international congress in the wake of the double helix: From the green revolution to the gene revolution (pp. 27-31).

Byrne, M. C., Nelson, C. J., & Randall, D. D. (1981). Ploidy effects on anatomy and gas exchange of tall fescue leaves. Plant Physiology, 68(4), 891-893.

Caperta, A. D., Delgado, M., Ressurreição, F., Meister, A., Jones, R. N., Viegas, W., & Houben, A. (2006). Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. Protoplasma, *227*(2-4), 147-153.

Chauvin, J. E., Souchet, C., Dantec, J. P., & Ellisseche, D. (2003). Chromosome doubling of 2x Solanum species by oryzalin: Method development and comparison with spontaneous chromosome doubling in vitro. Plant cell, tissue and organ culture, *73*(1), 65-73.

Chen, Z. J. (2007). Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. Annual Review of Plant Biology, *58*, 377.

Cheruvathur, M. K., Abraham, J., & Thomas, T. D. (2013). Plant regeneration through callus organogenesis and true-to-type conformity of plants by RAPD analysis in *Desmodium gangeticum* (Linn.) DC. Applied biochemistry and biotechnology, *169*(6), 1799-1810.

Costa, P., Gonçalves, S., Valentão, P., Andrade, P. B., Almeida, C., Nogueira, J. M., & Romano, A. (2013). Metabolic profile and biological activities of Lavandula pedunculata subsp. lusitanica (Chaytor) Franco: Studies on the essential oil and polar extracts. Food chemistry, *141*(3), 2501-2506.

Dalgaard, V. (1986). Chromosome studies in flowering plants from Macaronesia. In Anales del Jardín Botánico de Madrid 43(1), 83-111.

De Gyves, E. M., Royani, J. I., & Rugini, E. (2007). Efficient method of micropropagation and in vitro rooting of teak (*Tectona grandis* L.) focusing on large-scale industrial plantations. Annals of forest science, *64*(1), 73-78.

de Rapper, S., Kamatou, G., Viljoen, A., & van Vuuren, S. (2013). The in vitro antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with other aroma-therapeutic oils. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, *2013*.

Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K. M., & Koornneef, M. (2000). Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. Plant physiology, *122*(2), 403-414.

Debnath, M., Malik, C. P., & Bisen, P. S. (2006). Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. Current pharmaceutical biotechnology, *7*(1), 33-49.

Dermen, H. (1940). Colchicine polyploidy and technique. The Botanical Review,*6*(11), 599-635.

Dermen, H., & Bain, H. F. (1944). A general cytohistological study of colchicine polyploidy in cranberry. American Journal of Botany, 31(8) 451-463.

Dhawan, O. P., & Lavania, U. C. (1996). Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. Euphytica, *87*(2), 81-89.

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(4), 625-631.

Dolezel, J. (1997). Application of flow cytometry for the study of plant genomes. Journal of Applied Genetics, *38*(3), 285-302.

Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. Nature protocols, *2*(9), 2233-2244.

Echeverrigaray, S., Basso, R., & Andrade, L. B. (2005). Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants. Biologia Plantarum, *49*(3), 439-442.

Engelmann, F., Marzalina, M., Khoo, K. C., Jayanthi, N., Tsan, F. Y., & Krishnapillay, B. (1999). Alternative methods for the storage of recalcitrant seeds-an update. In *IUFRO Seed Symposium 1998" Recalcitrant seeds": Proceedings of the Conference, Kuala Lumpur, Malaysia, 12-15 October 1998.* (pp. 159-170). Forest Research Institute Malaysia.

Escandón, A. S., Miyajima, I., Alderete, M., Hagiwara, J. C., Facciuto, G., Mata, D., & Soto, S. M. (2005). Wild ornamental germplasm exploration and domestication based on biotechnological approaches: In vitro colchicine treatment to obtain a new cultivar of Scoparia montevidiensis. Electronic Journal of Biotechnology, *8*(2), 86-93.

Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. M., & Araujo, M. E. M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. Journal of ethnopharmacology, *108*(1), 31-37.

Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Scheffer, J. J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. Flavour and Fragrance Journal, *23*(4), 213-226.

Finch-Savage, W. E., & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist, *171*(3), 501-523.

Foschi, M. L., Martínez, L. E., Ponce, M., Galmarini, C. R., & Bohanec, B. (2013). Effect of colchicine and amiprophos-methyl on the production of in vitro doubled haploid onion plants and correlation assessment between ploidy level and stomatal size. *Rev FCA UNCUYO*, *45*(2), 155-164.

Georgiev, M. I., Eibl, R., & Zhong, J. J. (2013). Hosting the plant cells in vitro: recent trends in bioreactors. Applied microbiology and biotechnology, *97*(9), 3787-3800.

Gershenzon, J., & Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. Nature chemical biology, *3*(7), 408-414.

Giles, K. L., & Morgan, W. M. (1987). Industrial-scale plant micropropagation. Trends in Biotechnology, *5*(2), 35-39.

Gonçalves, S., & Romano, A. (2013). In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. Biotechnology advances,31(2), 166-174.

Gouyon, P. H., Vernet, P., Guillerm, J. L., & Valdeyron, G. (1986). Polymorphisms and environment: the adaptive value of the oil polymorphisms in *Thymus vulgaris* L. *Heredity*, *57*(Part 1), 59-66.

Griesbach, R. J. (1981). Colchicine-induced polyploidy in *Phalaenopsis* orchids. Plant cell, tissue and organ culture, *1*(1), 103-107.

Guern, M., & Hervé, G. (1980). Polyploidy and aspartate-transcarbamylase activity in *Hippocrepis comosa* L. *Planta*, *149*(1), 27-33.

Gülçin, İ. (2011). Antioxidant activity of eugenol: A structure–activity relationship study. Journal of Medicinal Food, *14*(9), 975-985.

Guo, M., Davis, D., & Birchler, J. A. (1996). Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. Genetics, *142*(4), 1349-1355.

Hancock, J. F. (1997). The colchicine story. HortScience, *32*(6), 1011-1012.

Haque, S. M., & Ghosh, B. (2013). Field evaluation and genetic stability assessment of regenerated plants produced via direct shoot organogenesis from leaf explant of an endangered ‘Asthma Plant’ (*Tylophora indica*) along with their in vitro conservation. National Academy Science Letters, *36*(5), 551-562.

Haussmann, B. I. G., Parzies, H. K., Presterl, T., Susic, Z., & Miedaner, T. (2004). Plant genetic resources in crop improvement. Plant Genetic Resources,*2*(1), 3-21.

Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. Food Chemistry,*108*(3), 986-995.

Idowu, P. E., Ibitoye, D. O., & Ademoyegun, O. T. (2009). Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. African Journal of Biotechnology, *8*(16).

Jang, T. S., Lee, J., & Hong, S. P. (2014). A systematic study of *Glechoma* L.(Lamiaceae) based on micromorphological characters and nuclear ribosomal ITS sequences. Korean Journal of Plant Taxonomy, *44*(1), 22-32.

Jones, J. R., Ranney, T. G., & Eaker, T. A. (2008). A novel method for inducing polyploidy in *Rhododendron* seedlings. J. Amer. Rhododendron Soc, *62*(3), 130-135.

Khan, A. A. (1982). The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination. Elsevier Biomedical Press.

Khush, G. S. (2003). Green revolution: challenges ahead. In International Congress 'In the wake of the double helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution'Bologna, Italy.

Knop, W. (1865). Quantitative untersuchungen uber die ernahrungsprozesse der pflanzen. Landwirtsch Vers Stn, *7*, 93-107.

Kobayashi, N., Yamashita, S., Ohta, K., Hosoki, T. (2008). Morphological characteristics and their inheritance in colchicine-induced *Salvia* polyploids. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, *77*(2), 186-191.

Kong, J. M., Goh, N. K., Chia, L. S., & Chia, T. F. (2003). Recent advances in traditional plant drugs and orchids. Acta Pharmacologica Sinica, *24*(1), 7-21.

Koornneef, M., Bentsink, L., & Hilhorst, H. (2002). Seed dormancy and germination. Current opinion in plant biology, *5*(1), 33-36.

Lehrer, J. M., Brand, M. H., & Lubell, J. D. (2008). Induction of tetraploidy in meristematically active seeds of Japanese barberry (*Berberis thunbergii* var. atropurpurea) through exposure to colchicine and oryzalin. Scientia Horticulturae, *119*(1), 67-71.

Levin, D. A. (1983). Polyploidy and novelty in flowering plants. American Naturalist, 1-25.

Lin, H., Jian, M., Liang, L. Y., Pei, W. J., Liu, X. Z., & Zhang, H. Y. (2010). Production of polyploids from cultured shoot tips of Eucalyptus globulus Labill by treatment with colchicine. African Journal of Biotechnology, *9*(15), 2252-2255.

Lis-Balchin, M. (2002). The Genus Lavandula. CRC Press.

Lyrene, P. M., Vorsa, N., & Ballington, J. R. (2003). Polyploidy and sexual polyploidization in the genus *Vaccinium*. Euphytica, *133*(1), 27-36.

Madon, M., Clyde, M. M., Hashim, H., Mohd Yusuf, Y., Mat, H., & Saratha, S. (2005). Polyploidy induction of oil palm through colchicine and oryzalin treatments. Journal of Oil Palm Research, 110-123.

Marton, L., Wullems, G. J., Molendijk, L., & Schilperoort, R. A. (1979). In vitro transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. 277, 129-131.

Masterson, J. (1994). Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. Science-AAAS-Weekly Paper Edition-including Guide to Scientific Information, *264*(5157), 421-423.

Miflin, B. (2000). Crop improvement in the 21st century. Journal of Experimental Botany, *51*(342), 1-8.

Miguel, T. P., & Leonhardt, K. W. (2011). In vitro polyploid induction of orchids using oryzalin. Scientia Horticulturae, *130*(1), 314-319.

Molin, W. T., Meyers, S. P., Baer, G. R., & Schrader, L. E. (1982). Ploidy effects in isogenic populations of alfalfa II. Photosynthesis, chloroplast number, ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase, chlorophyll, and DNA in protoplasts. Plant Physiology, *70*(6), 1710-1714.

Monda, K., Araki, H., Kuhara, S., Ishigaki, G., Akashi, R., Negi, J., & Goto, N. (2016). Enhanced stomatal conductance by a spontaneous *Arabidopsis* Tetraploid, Me-0, results from increased stomatal size and greater stomatal aperture. Plant physiology, *170*(3), 1435-1444.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, *15*(3), 473-497.

Nickell, L. G., & Tulecke, W. (1960). Submerged growth of cells of higher plants. Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering, *2*(3), 287-297.

Olsen, R. T., Ranney, T. G., & Viloria, Z. (2006). Reproductive behavior of induced allotetraploid× Chitalpa and in vitro embryo culture of polyploid progeny. Journal of the American Society for Horticultural Science, *131*(6), 716-724.

Osbourn, A. E., & Lanzotti, V. (2009). Plant-derived natural products. Dordrecht: Springer.

Otto, S. P., & Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. Annual Review of Genetics, *34*(1), 401-437.

Pandey, R. N., Singh, S. P., Rastogi, J., Sharma, M. L., & Singh, R. K. (2012). Early assessment of genetic fidelity in sugarcane (*Saccharum officinarum*) plantlets regenerated through direct organogenesis with RAPD and SSR markers. Australian Journal of Crop Science, *6*(4), 618.

Pereira Coutinho, A. X. (1913). Flora de Portugal (plantas vasculares) disposta em chaves dichotomicas. *Aillaud, Alves & Cia*.

Petersen, K. 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*(2), 137-146.

Petersen, K. K., Hagberg, P., Kristiansen, K., & Forkmann, G. (2002). In vitro chromosome doubling of *Miscanthus sinensis*. Plant Breeding, *121*(5), 445-450.

Prathanturarug, S., Soonthornchareonnon, N., Chuakul, W., Phaidee, Y., & Saralamp, P. (2005). Rapid micropropagation of Curcuma longa using bud explants pre-cultured in thidiazuron-supplemented liquid medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, *80*(3), 347-351.

Prazeres, L. I. R. C. D., & Velho, C. (2014). Revisão do género *Lavandula* presente em Portugal Continental. PhD Thesis. University of Lisbon.

Rai, M. K., Phulwaria, M., Gupta, A. K., Shekhawat, N. S., & Jaiswal, U. (2012). Genetic homogeneity of guava plants derived from somatic embryogenesis using SSR and ISSR markers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, *111*(2), 259-264.

Ramsey, J., & Schemske, D. W. (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. Annual Review of Ecology and Systematics, 29, 467-501.

Randall, D. D., Nelson, C. J., & Asay, K. H. (1977). Ribulose bisphosphate carboxylase altered genetic expression in tall fescue. Plant physiology, *59*(1), 38-41.

Ranney, T. G. (2006). Polyploidy: From evolution to new plant development. In Combined Proceedings International Plant Propagators' Society (Vol. 56, pp. 137-142).

Rasuli, V. O. L., & Sotudeh, R. (2007). Autotetraploid Induction in Grape (*Vitis vinifera* var. Bidaneh) by using Colchicine.

Rodrigues, J. S. C. (2002). Contributo para o estudo etnobotânico das plantas medicinais e aromáticas na área protegida da Serra do Açor. *APPSA, ICN*.

Rolston, M. P. (1978). Water impermeable seed dormancy. The Botanical Review, *44*(3), 365-396.

Rubuluza, T., Nikolova, R. V., Smith, M. T., & Hannweg, K. (2007). In vitro induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicine. South African Journal of Botany, *73*(2), 259-261.

Rusydi, A., Talip, N., Latip, J., Rahman, R. A., & Sharif, I. (2013). Morphology of trichomes in *Pogostemon cablin* Benth.(Lamiaceae). Australian Journal of Crop Science, *7*(6), 744.

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food chemistry, *91*(4), 621-632.

Sáez, F. (1995). Essential oil variability of *Thymus hyemalis* growing wild in Southeastern Spain. Biochemical systematics and ecology, *23*(4), 431-438.

Saha, S., Kader, A., Sengupta, C., & Ghosh, P. (2012). In vitro propagation of *Ocimum gratissimum* L.(Lamiaceae) and its evaluation of genetic fidelity using RAPD marker. American Journal of Plant Sciences, *3*(1), 64-74.

Sakhanokho, H. F., Rajasekaran, K., Kelley, R. Y., & Islam-Faridi, N. (2009). Induced polyploidy in diploid ornamental ginger (*Hedychium muluense* RM Smith) using colchicine and oryzalin. HortScience, *44*(7), 1809-1814.

Sarathum, S., Hegele, M., Tantiviwat, S., & Nanakorn, M. (2010). Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. European Journal of Horticultural Science, 123-127.

Setter, T. L., Schrader, L. E., & Bingham, E. T. (1978). Carbon dioxide exchange rates, transpiration, and leaf characters in genetically equivalent ploidy levels of alfalfa. Crop Science, *18*(2), 327-332.

Shao, J., Chen, C., & Deng, X. (2003). In vitro induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, *75*(3), 241-246.

Stanys, V., Weckman, A., Staniene, G., & Duchovskis, P. (2006). In vitro induction of polyploidy in Japanese quince (*Chaenomeles japonica*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, *84*(3), 263-268.

Stebbins, G. L. (1956). Artificial polyploidy as a tool in plant breeding. InGenetics in plant breeding. Brook-haven Symposia in Biology 1956. (pp. 37-52).

Svoboda, K. P., Svoboda, T. G., Syred, A. D., & Syred, P. M. (2000). Secretory structures of aromatic and medicinal plants: a review and atlas of micrographs. Microscopix Publications.

Taiz, L., & Zeiger, E., 2010. Responses and adaptations to abiotic stress. Plant physiology. 5th edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 755-782

Tavan, M., Mirjalili, M. H., & Karimzadeh, G. (2015). In vitro polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of *Thymus persicus* (Lamiaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, *122*(3), 573-583.

Teparkum, S., & Veilleux, R. E. (1998). Indifference of potato anther culture to colchicine and genetic similarity among anther-derived monoploid regenerants determined by RAPD analysis. Plant cell, tissue and organ culture, *53*(1), 49-58.

Thao, N. T. P., Ureshino, K., Miyajima, I., Ozaki, Y., & Okubo, H. (2003). Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, *72*(1), 19-25.

Thorpe, T. A. (2006). History of plant tissue culture. Plant Cell Culture Protocols, 9-32.

Upson, T. (2002). 2 The taxonomy of the genus *Lavandula* L. Medicinal and aromatic plants–industrial profiles, 2.

Upson, T., & Andrews, S. (2004). The genus *Lavandula*. *Kew:* Royal Botanic Gardens

Urwin, N. A. (2014). Generation and characterisation of colchicine-induced polyploid *Lavandula× intermedia*. Euphytica, *197*(3), 331-339.

Väinölä, A. (2000). Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. Euphytica, *112*(3), 239-244.

Vasil, I. K. (2008). A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. Plant Cell Reports, *27*(9), 1423-1440.

Walczak, C. E., & Heald, R. (2008). Chapter Three-Mechanisms of Mitotic Spindle Assembly and Function. International Review of Cytology, *265*, 111-158.

Walters, C., Berjak, P., Pammenter, N., Kennedy, K., & Raven, P. (2013). Preservation of recalcitrant seeds. Science, *339*(6122), 915-916.

Warner, D. A., & Edwards, G. E. (1989). Effects of polyploidy on photosynthetic rates, photosynthetic enzymes, contents of DNA, chlorophyll, and sizes and numbers of photosynthetic cells in the C4 dicot *Atriplex confertifolia*. Plant physiology, *91*(3), 1143-1151.

Werker, E. (1993). Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plans of Lamiaceae—a review. Flavour and Fragrance Journal, *8*(5), 249-255.

Werker, E. (2000). Trichome diversity and development. Adv. Bot. Res, *31*, 1-35.

White, P. R. (1943). A handbook of plant tissue culture. *Soil Science*, *56*(2), 151.

Yang, X. M., Cao, Z. Y., An, L. Z., Wang, Y. M., & Fang, X. W. (2006). In vitro tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Euphytica, *152*(2), 217-224.

Zeng, S. H., Chen, C. W., Hong, L., Liu, J. H., & Deng, X. X. (2006). In vitro induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicine in *Citrus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, *87*(1), 85-93.

Zhang, J., Zhang, M., & Deng, X. (2007). Obtaining autotetraploids in vitro at a high frequency in *Citrus sinensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, *89*(2-3), 211-216.

Zhang, Z., Dai, H., Xiao, M., & Liu, X. (2008). In vitro induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. Euphytica, *159*(1-2), 59-65.

Zuzarte, M. D. R. (2013). Portuguese lavenders: evaluation of their potential use for health and agricultural purposes.

Zuzarte, M. R., Dinis, A. M., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. R., & Canhoto, J. M. (2010). Trichomes, essential oils and in vitro propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). Industrial Crops and Products, *32*(3), 580-587.