



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**



CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Influência do Ácido Giberélico e Pré-resfriamento sobre a
Germinação *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* Linn.
(Lamiaceae)**

Ingrid Gaspar da Costa Geronimo

**ALEGRE-ES
Novembro/2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**



CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Influência do Ácido Giberélico e Pré-resfriamento sobre a
Germinação *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* Linn.
(Lamiaceae)**

Ingrid Gaspar da Costa Geronimo

“Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, como exigência para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas e avaliação obrigatória da disciplina Seminários de Graduação em Ciências Biológicas”

Orientador: Professora Doutora
Milene Miranda Praça Fontes

**ALEGRE-ES
Novembro/2011**

Ingrid Gaspar da Costa Geronimo

**Influência do Ácido Giberélico e Pré-resfriamento sobre a
Germinação *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* Linn.
(Lamiaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Curso de Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Aprovada: 25 de novembro de 2011.

COMISSÃO EXAMINADORA



**Prof (a). Dr (a). Milene Miranda Praça Fontes
Orientador (a)**



**Prof (a). Dr (a). Andréia Barcelos Passos Lima
Universidade Federal do Espírito Santo**



**Prof (a). Dr (a). Nina Cláudia Barboza da Silva
Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**ALEGRE-ES
Novembro/2011**

DEDICATÓRIA

A DEUS, pela maravilhosa oportunidade de viver toda essa experiência.

Minha família, especialmente meus pais, NILTON e MARCIA, pelo exemplo de vida e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Milene Miranda Praça Fontes pela orientação, amizade, auxílio e principalmente confiança a mim cedidos.

A Prof^a. Andreia, pelo incentivo, amizade e confiança. Obrigada pelos conselhos, pela oportunidade a mim cedida e por aceitar prontamente integrar a banca.

A Prof^a. Nina pela confiança, incentivo durante a condução do trabalho e por aceitar com tanta boa vontade integrar a banca.

A todos os amigos do laboratório de Cultura de Tecidos, especialmente ao Elias pelo auxílio nas análises estatísticas e conselhos cedidos para a boa condução do trabalho.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação, cada um possui um valor especial e serão lembrados em cada momento.

Aos professores Juliana Lanna, Tatiana Carrijo pela imensa boa vontade e pelos materiais de pesquisa cedidos.

Ao namorado Renan Gabriel por todo carinho, amizade, paciência, compreensão, apoio incondicional e pela ajuda recebida na execução deste trabalho.

A D^{ie}yna pela grande ajuda na tradução do texto.

Aos amigos Ramon e Suzanny, por todo carinho e animação. A Patricia, Raphaela e Joyce que mesmo longe se mostraram sempre presentes.

As novas amigas Gilza e Lívia que foram muito especiais neste final de curso.

A todos os colegas de curso pelo companheirismo, principalmente nesta reta final.

A todos mais que, de alguma maneira, fizeram parte dessa jornada.

RESUMO

A família Lamiaceae possui muitas espécies economicamente importantes, utilizadas tanto como medicamentos como na medicina popular. Apresenta distribuição cosmopolita, sendo o Mediterrâneo o seu maior centro de dispersão. Dentre os vários gêneros pertencentes a esta família, destaca-se o *Rosmarinus officinalis*, conhecido popularmente como alecrim e possui ampla utilização. Na Grécia antiga era utilizado como fortificante para o cérebro. Atualmente várias outras aplicações são atribuídas a esta espécie, como a atividade antimicrobiana. Apesar do interesse medicinal, as sementes de alecrim apresentam dormência, uma vez que, mesmo em condições adequadas, elas demonstram dificuldade de germinação. O objetivo do presente estudo foi testar a influência de várias concentrações de GA₃ e a exposição a baixas temperaturas, a partir da embebição das sementes, na quebra da dormência de sementes de alecrim. Foram testadas duas concentrações de GA₃, 100 e 200mg.L⁻¹ e pre-resfriamento a 5°C por 7 dias, totalizando sete tratamentos. Foram avaliados a porcentagem de sementes germinadas e o índice de velocidade de germinação (IVG). Os dados referentes aos tratamentos foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade. O tratamento 100 mg.L⁻¹ de GA₃ e 5°C por 7 dias + água destilada foram os mais eficientes para a germinação e IVG de *R. officinalis*. Os tratamentos 200 mg.L⁻¹ de GA₃ e 5°C por 7 dias + água destilada foram ineficientes. Apesar das respostas positivas de *R. officinalis* a alguns dos pré-tratamentos, esta espécie ainda possui deficiente conhecimento sobre sua cultura *in vitro*, sendo necessário mais estudo.

Palavras-Chaves: *Rosmarinus officinalis*, Ácido giberélico (GA₃), Germinação *in vitro*, Lamiaceae, embebição.

ABSTRACT

The Lamiaceae family has many economically important species, both used as condiments and in folk medicine. Presents a cosmopolitan distribution, and the Mediterranean is their large center of dispersion. Among the various kind belonging to this family, there is the *Rosmarinus officinalis*, popularly known as rosemary and has wide use. In the ancient Greece it was used as a tonic to the brain. Nowadays several other applications are imputed to this specie, such as antimicrobial activity. Despite the medicinal concern, the rosemary's seeds present dormancy, since even under appropriate conditions, they demonstrate difficulty of germination. The objective of this study was to test the influence of various concentrations of gibberelic acid an exposure to low temperatures, from soaking the seeds, in seed dormancy breaking of rosemary. We tested two concentrations of GA₃, 100 and 200 mg.L⁻¹ and pre-cooling at 5°C for 7 days, a total of seven treatments. We evaluate the percentage of germinated seeds and germination seeds index (IVG). Data regarding treatments were subjected to analysis of variance followed by Tukey test at a significance level of 5% probability. 100 mg.L⁻¹ and 5°C for 7 days + distilled water treatment was the most efficient for germination and IVG of *R. officinalis*. The 200 mg.L⁻¹ GA₃ and 5°C for 7 days + 100 mg.L⁻¹ treatments were ineffective. A despite of the positive responses of *R. officinalis* to some pretreatments, this specie still has insufficient knowledge about their *in vitro* culture, requiring further study.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, Gibberellic acid (GA₃), *In vitro* Germination, Lamiaceae, soaking.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. FAMÍLIA LAMIACEAE	8
1.2. <i>Rosmarinus officinalis</i>	9
1.3. CULTURA DE TECIDOS.....	11
1.4. GIBERELINAS	12
2. OBJETIVOS	13
2.1. OBJETIVO GERAL.....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5. CONCLUSÃO.....	19
6. REFERÊNCIAS.....	21

1. INTRODUÇÃO

1.1. FAMÍLIA LAMIACEAE

A família Lamiaceae possui espécies economicamente importantes, utilizadas na medicina popular e como condimentos. Nesta família há espécies cujo hábito varia do herbáceo ao arbóreo; os caules são freqüentemente quadrangulares em seções transversais (JUDD *et al.*, 2009). Segundo a descrição de Simpson (2006), suas folhas são simples, opostas e verticiladas. Possuem inflorescências e suas flores são bissexuais, a maioria zigomorfa, bracteada ou bracteolada. O fruto é esquizocarpo de, usualmente, noz, uma drupa ou baga.

Esta família apresenta distribuição cosmopolita (KRUPPA; RUSSOMANNO, 2008). A família compreende 251 gêneros com cerca de 6700 espécies distribuídas em todo o mundo, sendo o maior centro de dispersão a região do Mediterrâneo (SIMPSON, 2006). Já no Brasil, a sua distribuição ocorre em cerca de 350 espécies inseridas em 26 gêneros (SOUZA; LORENZI, 2005) sendo que muitas destas espécies são plantas medicinais e produtoras de óleos essenciais, utilizadas também como condimentos ou como flores ornamentais (BARROSO, 2002).

Dentre os gêneros introduzidos, vários podem ser cultivados para a utilização como condimentos, como *Ocimum ssp (alfavaca)*, *Mentha ssp (hortelã-pimenta)* ou na medicina popular, como *Origanum (manjeriço)*, *Melissa (erva-cidreira)* e *Rosmarinus (alecrim)*. Há também uma ampla variedade de gêneros que produzem óleo essencial de grande aplicação, como o *Pogostemum (patchuli)*, e a *Lavandula (alfazema)*. Em virtude disso a família possui uma significativa importância econômica.

Dentre as espécies mencionadas anteriormente destaca-se o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) devido sua vasta utilidade na medicina popular, culinária e indústria cosmética.

Castro *et al* (2001) define uma planta medicinal como qualquer vegetal que produza substâncias biologicamente ativas, em quantidade considerável, que podem ser utilizadas direta ou indiretamente como medicamentos.

Pesquisas realizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) mostraram que aproximadamente 80% da população de países em desenvolvimento utilizam a medicina

tradicional como recurso primário no atendimento da saúde, o que consiste no uso de extratos vegetais e seus princípios ativos (FARNSWORTH *et al*, 1991).

A principal forma de propagação da maioria das plantas medicinais é a assexuada, por meio de estaquias, porém este tipo de propagação nos remete a vários inconvenientes como o curto tempo de armazenamento dos materiais de propagação e o grande volume de material a ser manuseado. No caso do alecrim, o principal método de propagação também é o assexuado devido à dormência apresentada por suas sementes.

As sementes de cerca de um terço das espécies vegetais germinam imediatamente em condições favoráveis, mas as demais apresentam algum grau de dormência (KRAMER; KOZLOWSKI, 1972).

As plantas medicinais e aromáticas apresentam uma grande variabilidade na qualidade das sementes, incluindo a desuniformidade na germinação e dormência das sementes (BRANT *et al*, 2009). Assim, se faz cada vez mais necessário conhecer e determinar melhores condições de germinação e métodos que se mostrem capazes de otimizá-la. Para tal, vários trabalhos vêm sendo realizados para o estudo da germinação de plantas da família Lamiaceae. Bezerra *et al* (2006) em seu trabalho com *Egletes viscosa*, testou diferentes concentrações de ácido giberélico (GA₃) na germinação de sementes. Santos Neto *et al* (2009) utilizou ácido giberélico, nitrato de potássio (KNO₃), polietilenoglicol (PEG) para a testar a germinação de *Hyptis pectinata*. Sementes de *Lotus subbiflorus* foram cultivadas após o pré-resfriamento por 4 a 10 dias a temperatura de 7°C por Jacob-Junior *et al* (2004) e Meneguello *et al* (2002) aplicou em *Melissa officinalis* o pré-resfriamento por 7 dias a 10°C. Em todos esses trabalhos houve resposta positiva para a germinação das sementes.

1.2. *Rosmarinus officinalis*

Rosmarinus officinalis é originário da Região Mediterrânea, popularmente conhecida como alecrim, rosmaryno, erva da graça, erva coroada, alecrinzeiro ou libanotis. Possui porte subarborescente lenhoso, ereto, pouco ramificado, de até 1,5 m de altura. Suas folhas são lineares, coriáceas e muito aromáticas, medindo 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura. Suas flores são azuladas, pequenas e de aroma forte e muito agradável (LORENZI; MATOS, 2002).



Figura 1 – A) Ramo de *Rosmarinus officinalis*; **B)** Arbusto com inflorescências de *Rosmarinus officinalis*.

FONTE: <http://dicasterapeuticas.blogspot.com/2011/09/os-incriveis-beneficios-do-alecrim.html> e <http://www.google.com.br/imgres?q=ALECRIM+flores>

É a planta aromática mais difundida no Mediterrâneo, pois além de existir em estado silvestre, é cultivado para diversos fins desde tempos remotos, como na Grécia antiga, onde era considerado um fortificante para o cérebro e a memória (GIACOMETTI, 1989).

Diversas farmacopéias citam o uso de alecrim e ele é amplamente utilizado na medicina popular e na fitoterapia como estimulante, aromático, antioxidante, antimicrobiana, antitumoral (SILVA *et al*, 2011), vasodilatador, diurético, antiespasmódicas (COSTA; DROSTE, 2010) hipotensor, analgésico, colerético/colagogo, sudorífico, possui propriedades anti-caspa, entre outros usos (LAINETTI; BRITO, 1979).

Silva *et al* (2008) testou o efeito antimicrobiano do extrato hidroalcoólico de alecrim sobre cepas de *Streptococcus mitis* IATCC9811, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Os resultados demonstraram a eficácia da atividade antimicrobiana do extrato do alecrim sobre as linhagens ensaiadas.

As atividades antioxidantes podem ser atribuídas a presença de rosmanol, diterpenos, rosmaridifenol e rosmariquinona. Já as propriedades antimicrobianas podem estar relacionadas com a presença de borneol, pinenos, cineol e cânfora (PORTE; GODOY, 2001).

1.3. CULTURA DE TECIDOS

A técnica de cultura de tecidos vegetais consiste no isolamento de explantes, que são pequenos fragmentos de tecido vegetal vivo, na desinfestação e subsequente cultivo asséptico por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado, objetivando-se obter uma nova planta idêntica a original, mantendo-se o genótipo idêntico àquele do ancestral comum (TORRES *et al*, 2000).

Existem inúmeros fatores que afetam a técnica de cultura de tecidos vegetais, dentre eles estão o genótipo da planta mãe, a fonte de explantes e a condição física adicionada ao meio em que a cultura foi estabelecida (CALDAS *et al*, 1998). Variedades de uma mesma espécie podem responder de maneira distinta ao cultivo (MANTELL *et al*, 1994). Na escolha do explante, devem-se utilizar tecidos jovens e em crescimento, pois os tecidos em senescência já perderam grande parte de seus nutrientes. Os meios de cultura, por sua vez, devem conter os sais minerais, nitrogênio, uma fonte de carbono, vitaminas e reguladores de crescimento. Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. Não há uma formulação padrão, mas o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com suas modificações e diluições, tem sido utilizado com sucesso para diversas espécies (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A água é o principal componente do meio de cultura. Porém, pode ser uma fonte potencial de impurezas, afetando o crescimento dos tecidos. Assim, o ideal é utilizar água destilada e, se possível, deionizada. Muitas vezes substitui-se esses dois processos pela bi-destilação (CALDAS *et al*, 1998). Segundo Torres *et al* (2000), o movimento de moléculas entre e dentro das células, além do fornecimento de elementos nutritivos para as plantas a partir do meio de cultura, necessita da água como veículo.

A germinação *in vitro* é uma das técnicas realizadas na cultura de tecidos vegetais. Kerbauy (2008) define germinação como um conjunto de etapas e processos associados à fase inicial do desenvolvimento de uma estrutura reprodutiva, seja sementes, esporos ou gemas. A germinação a partir de sementes constitui um dos fatores responsáveis pela abundância das espécies (VASQUES-YANES; OROZCO-SEGOVIA, 1993), uma vez que há recombinação de genes entre indivíduos diferentes.

Há alguns fatores ambientais que podem interferir na germinação das sementes das espécies vegetais, como a disponibilidade de água, oxigênio, temperatura e luz

adequada (LABOURIAU, 1983). Porém, alguns fatores endógenos, como a maturidade e a dormência, também são importantes na determinação da capacidade de germinação dessas sementes (MALAVASI, 1988).

Segundo Alves *et al* (2000), existem sementes que mesmo viáveis não germinam, embora as condições de água, gases (O₂) e temperatura estejam aparentemente adequadas. Essas sementes são denominadas dormentes e precisam de tratamento especial para germinar.

Para Bewley e Black (1985), a dormência é um fenômeno intrínseco da semente, funcionando como mecanismo natural de resistência aos fatores adversos do meio, podendo manifestar-se de duas formas distintas: dormência imposta pela casca e dormência embrionária.

A dormência pode ser causada por mecanismos inibitórios que envolvem processos metabólicos e o controle do desenvolvimento na semente. Tratamentos com giberelinas podem quebrar a dormência, que é controlada no embrião, mas há também interação com os tecidos adjacentes (KERBAUY, 2008).

Na maioria das vezes, a dormência se mostra vantajosa para a sobrevivência das espécies em condições naturais, uma vez que este fenômeno permite que a germinação ocorra somente quando as condições se mostrarem favoráveis e distribui o período de germinação ao longo do tempo. Porém, em atividades de cultivo *in vitro*, a dormência pode ser prejudicial, pois há o anseio na obtenção de grandes porcentagens de germinações e formação de plântulas em um curto espaço de tempo (MELO *et al*, 1998). Assim, se faz necessário a utilização de métodos pré-germinativos que permitam a superação da dormência das sementes, tornando possível a máxima germinação do lote (JACOB-JUNIOR *et al*, 2004).

1.4. GIBERELINAS

Os reguladores de crescimento, dentre várias funções, controlam o metabolismo e as respostas das sementes ao meio ambiente. Estes compõem os fatores intrínsecos que controlam a germinação através da mediação de processos fisiológicos da germinação e transformando sinais ambientais específicos, como luminosidade, quantidade de água e gás carbônico. Isso produz modificações na fisiologia da semente através de controle da expressão gênica ou por alterações na permeabilidade da membrana. Entre os reguladores de crescimento pode-se destacar as giberelinas. Estas

controlam a germinação, o crescimento através do alongamento celular (LEITE; HELBLING, 2007), e são, também, associadas a promoção do crescimento do caule e a sua aplicação em plantas intactas pode induzir significativo crescimento da parte aérea (TAIZ; ZEIGER, 2008).

As giberelinas foram distinguidas na década de 1950 e foram caracterizadas várias giberelinas que são baseadas em um esqueleto *em-giberelano* (TAIZ; ZEIGER, 2008).

De acordo com Taiz e Zeiger (2008), no processo de germinação as giberelinas podem ser requeridas nas etapas de ativação do crescimento vegetativo do embrião, o enfraquecimento da camada do endosperma que envolve o embrião e restringe seu crescimento, assim como a mobilização das reservas energéticas do endosperma. Esses fitorreguladores possuem, então, efeito sobre a quebra de dormência de muitas sementes (LEITE; HELBLING, 2007).

Kerbauy (2008) propõe duas principais funções para as giberelinas: são necessárias para a transposição da barreira mecânica conferida pelas camadas da casca, uma vez que as giberelinas enfraquecem os tecidos ao redor da radícula e aumento do potencial de crescimento do embrião, incluindo o controle de crescimento do eixo embrionário e dos tecidos caulinares e radiculares.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do regulador de crescimento GA_3 e de baixas temperaturas na germinação *in vitro* de sementes de *R. officinalis*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a influência da embebição de sementes de alecrim em diferentes concentrações de GA_3 na germinação *in vitro*;
- Verificar a influência do pré-resfriamento das sementes de alecrim sobre a germinação *in vitro*;

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal do Espírito Santo, localizado no Centro de Ciências Agrárias em Alegre, Espírito Santo.

As sementes utilizadas foram adquiridas comercialmente.

Após abertura dos envelopes, as sementes foram submetidas aos seguintes tratamentos:

T0 – sem regulador de crescimento;

T1 – embebição em água destilada estéril por 18 horas;

T2 – embebição em 100 mg.L⁻¹ GA₃ por 18 horas;

T3 – embebição em 200 mg.L⁻¹ GA₃ por 18 horas;

T4 – pré-resfriamento a 5°C por sete dias;

T5 – pré-resfriamento a 5°C por sete dias e embebição em água destilada estéril por 18 horas;

T6 – pré-resfriamento a 5°C por sete dias e embebição em 100 mg.L⁻¹ GA₃ por 18 horas;

T7 – pré-resfriamento a 5°C por sete dias e embebição em 200 mg.L⁻¹ GA₃ por 18 horas.

As sementes foram, então, imediatamente submetidas a um processo de desinfestação superficial com solução de álcool 70% acrescido de uma gota de Tween 20 por dois minutos. Em seguida foram lavadas em água destilada por três vezes, imersas em solução de hipoclorito de sódio comercial 50% com adição de uma gota de Tween 20 por 10 minutos e lavadas em água destilada por três vezes.

Após os tratamentos, as sementes foram inoculadas em frascos contendo 40 mL de meio sólido Murashige e Skoog (1962), suplementado com 3% de sacarose e 7g.L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,8±0,1.

Esses frascos foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura de 25° C, luz branca homogênea do tipo luz do dia (tubos fluorescentes), com fluência de 1,6W/m² e fotoperíodo de 16 horas de claro.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com parcelas em fatorial de 3x1, tendo o fator concentração de GA₃ em três níveis (0, 100 e 200 mg.L⁻¹) e o fator temperatura em um nível (5°C). Foram realizadas 10 repetições por tratamento,

sendo a repetição constituída por um frasco contendo 10 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento.

Foi considerada como germinação a emissão de radícula. A contagem das sementes germinadas foi realizada diariamente, durante 30 dias, para a avaliação da porcentagem de germinação e Índice e Velocidade de Germinação (IVG).

Para o cálculo do IVG, foi utilizada a fórmula proposta por Popinigis (1977).

$$IVG = \frac{E_1 + E_2 + \dots + E_n}{N_1 + N_2 + \dots + N_n}$$

Sendo:

E1, E2, ..., En = nº de plântulas emergidas, computadas na primeira, segunda, ..., última contagem

N1, N2, ..., Nn = nº de dias de semeadura à primeira, segunda, ..., última contagem.

Os dados referentes aos tratamentos foram submetidos a análise de variância seguida de teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade, por meio do software “ASSISTAT” versão 7.6 beta (SILVA, 2009).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação *in vitro* de sementes de *R. officinalis* iniciou-se a partir do sexto dia após a inoculação, sendo esta marcada pela protrusão da radícula, como mostrado na figura 2. O tratamento com a aplicação de 5°C por 7 dias + 200 mg.L⁻¹ de GA₃ por 18 horas foi eliminado em virtude da completa contaminação por fungos. Estes microrganismos podem interferir negativamente, pois eles competem pelos nutrientes presentes no meio e também podem produzir toxinas que prejudicam o processo de regeneração (COSTA; DROSTE, 2010). Por este motivo, as análises estatísticas para este tratamento não foram realizadas, uma vez que este evento interferiu diretamente na germinação.



Figura 2 - Sementes germinadas de *Rosmarinus officinalis* após 30 dias de cultivo.

A porcentagem de germinação das sementes de *R. officinalis* em função dos diferentes tratamentos pré-germinativos está descrita na Tabela 1. Foi observado que, apesar da baixa germinação, houve diferença estatística entre os pré-tratamentos.

Os tratamentos onde foram aplicados concentrações de 100 mg.L^{-1} de GA_3 por 18 horas e 5°C por 7 dias + 100 mg.L^{-1} de GA_3 por 18 horas foram o mais eficientes na germinação de *R. officinalis*, possibilitando a maior porcentagem de germinação. O tratamento com 5°C por 7 dias + 100 mg.L^{-1} de GA_3 por 18 horas, foi estatisticamente semelhante ao tratamento com 100 mg.L^{-1} de GA_3 por 18 horas e aos demais tratamentos. Os tratamentos onde não foram aplicados nenhum regulador de crescimento, Água destilada por 18 horas, 200 mg.L^{-1} de GA_3 por 18 horas, 5°C por 7 dias, 5°C por 7 dias + água destilada por 18 horas e 5°C por 7 dias + 100 mg.L^{-1} de GA_3 por 18 horas foram estatisticamente semelhantes. Os tratamentos com concentração de 200 mg.L^{-1} de GA_3 por 18 horas e 5°C por 7 dias + água destilada por 18 horas foram ineficientes na germinação de alecrim, uma vez que a porcentagem de germinação foi de 0%.

Em trabalho semelhante ao realizado no presente estudo, Aoyama *et al* (1996) obtiveram resultado de 89,33% de germinação com a embebição de sementes de lavanda (*Lavandula angustifolia* Miller) na concentração de 100 mg.L^{-1} de GA_3 por 18 horas. Neste mesmo trabalho os autores também demonstraram eficiência de germinação utilizando a dose de 200 mg.L^{-1} , o que não foi observado no presente

estudo, uma vez que a porcentagem de germinação de sementes de alecrim na dose de 200 mg.L⁻¹ por 18 horas foi de 0%, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Porcentagem de germinação de *Rosmarinus officinalis* em diferentes tratamentos pré-germinativos

TRATAMENTO	MÉDIAS (%)
Sem regulador de crescimento	0.25000 b
Água destilada por 18 horas	0.12500 b
100 mg.L ⁻¹ de GA ₃ por 18 horas	1.12500 a
200 mg.L ⁻¹ de GA ₃ por 18 horas	0.00000 b
5°C por 7 dias	0.37500 b
5°C por 7 dias + água destilada por 18 horas	0.00000 b
5°C por 7 dias + 100 mg.L ⁻¹ de GA ₃ por 18 horas	0.50000 ab

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Bezerra *et al* (2006) demonstraram que as sementes embebidas em GA₃ apresentaram maiores porcentagens de germinação. Pauletti *et al* (2007) em seu trabalho de superação de dormência de sementes de poejo do campo (Lamiaceae) observaram a ação favorável de 250 mg.L⁻¹ de GA₃ e 0,2% de Nitrato de Potássio na germinação. Ehlert (2000) estudando o efeito de GA₃ em *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae) verificou que a giberelina proporcionou aumento na porcentagem de germinação.

Quanto a dormência de sementes, Alves *et al* (2000) asseguram que para que possa haver a superação é necessário que haja um balanço fisiológico no eixo embrionário. A utilização de fitohormônios no balanço hormonal é uma técnica amplamente utilizada para a superação da dormência. Para tanto, há ressaltos no uso de giberelinas (BEWLEY; BLACK, 1985; METIVIER, 1986).

As giberelinas atuam no alongamento de caules e adicionalmente controlam alguns aspectos da germinação, dentre elas a mobilização das reservas do endosperma. Em cereais, as giberelinas atuam na função digestiva da camada de aleurona. Há produção de várias enzimas hidrolíticas, como amilases, que digerem as reservas do endosperma formando açúcares, aminoácidos e ácidos nucleicos. Estes produtos são transportados na semente para as regiões de crescimento do embrião estimulando, assim o alongamento celular. Desta forma a radícula se torna capaz de romper o tegumento ocorrendo a germinação (TAIZ; ZEIGER, 2008).

A não germinação de sementes no tratamento com concentrações de 200 mg.L⁻¹ de GA₃ por 18 horas poderia ser atribuída ao efeito fitotóxico causada por maiores concentrações do regulador de crescimento (POMPELLI, 2006). Bonin *et al* (2010) em seu estudo com Bromeliaceae também observaram que ao aumentar as doses de ácido giberélico, parâmetros como a germinação decaíram, ocorrendo, também, a não germinação nas doses mais elevadas.

Em relação ao IVG, foram observadas diferenças entre os tratamentos pré-germinativos de sementes de alecrim (Tabela 2).

Tabela 2 – Índice de Velocidade de Germinação de sementes de *Rosmarinus officinalis* nos diferentes pré-tratamentos.

TRATAMENTOS	MÉDIAS
Sem regulador de crescimento	0.00737 b
Água destilada por 18 horas	0.00250 b
100 mg.L ⁻¹ por 18 horas	0.05612 a
200 mg.L ⁻¹ por 18 horas	0.00000 b
5°C por 7 dias	0.00818 b
5°C por 7 dias + água destilada por 18 horas	0.00000 b
5°C por 7 dias + 100 mg.L ⁻¹ por 18 horas	0.04337 ab

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

As maiores médias de IVG foram obtidas nos tratamentos que foram aplicados as concentrações de 100 mg.L⁻¹ de GA₃ por 18 horas e 5°C por 7 dias + 100 mg.L⁻¹ de GA₃ por 18 horas, indicando serem os tratamentos que germinaram mais rápido. Os tratamentos onde não foi aplicado nenhum regulador de crescimento, Água destilada por 18 horas, 5°C por 7 dias, e 5°C por 7 dias + 100 mg.L⁻¹ de GA₃ por 18 horas foram semelhantes estatisticamente aos tratamentos 200 mg.L⁻¹ de GA₃ por 18 horas e 5°C por 7 dias + água destilada por 18 horas, os quais foram os menos responsivos.

O Índice de Velocidade de Germinação (IVG) é um índice calculado a partir da contagem de sementes germinadas e seu objetivo é estabelecer diferenças na germinação de diferentes acessos, grupos ou lotes dessas sementes (BRASILEIRO *et al*, 2008).

Brant *et al* (2009) observaram efeito significativo na aplicação de GA₃, para o IVG nos tratamentos onde foram aplicados concentrações de 250 mg.L⁻¹ do regulador

de crescimento. Bonin *et al* (2010) não encontraram nenhuma significância estatística para o parâmetro IVG, uma vez que seus resultados foram semelhantes estatisticamente para todos os tratamentos aplicados às sementes de *Alcantarea imperialis*.

Os baixos valores de IVG nos tratamentos com o pré-resfriamento podem ser atribuídos, segundo Metiver (1986), a possibilidade de redução na atividade das amilases, reduzindo, conseqüentemente a germinação das sementes.

Os parâmetros analisados neste trabalho apresentaram resultados muito inferiores a trabalhos semelhantes com espécies pertencentes a mesma família. Porém este é um padrão que também foi observado por Costa e Droste (2010). Os autores testaram protocolos de desinfestação em alecrim e observaram uma porcentagem de 0,67% de germinação, sem adição de reguladores de crescimento. Assim, mostra-se cada vez mais a necessidade de estudos para a determinação de um protocolo de germinação *in vitro*, onde possa ser elucidado um método eficiente de superação da dormência encontrada nestas sementes.

Especificamente para *Rosmarinus oddicinalis*, há um número restrito de trabalhos publicados, e poucas publicações são dedicadas a sua propagação *in vitro*. Misra e Chaturvedi (1984), no entanto, apresenta um protocolo pouco detalhado e adaptado a genótipo e ambientes europeus. Komali e Shetti (1998) e Caruso *et al* (2000), assim como Misra e Chaturvedi, não abordam a germinação, e sim a micropropagação a partir de indivíduos coletados em campo e sua subsequente cultura de calos.

Portanto, não foram encontrados trabalhos publicados sobre a quebra de dormência e estabelecimento de cultivos *in vitro* de alecrim. Assim trabalhos de base são indispensáveis para a obtenção de um protocolo detalhado e específico.

5. CONCLUSÃO

Os tratamento pré-germinativo de sementes de *R. officinalis* com ácido giberélico se mostraram mais eficientes nas concentrações de 100 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹ adicionado a exposição a baixas temperaturas. Estes tratamentos proporcionaram as maiores porcentagens de germinação e maior IVG em relação aos demais tratamentos. Porém tratamento que envolveram a resfriamento a 5°C durante sete dias e embebição em 100 mg.L⁻¹ de GA₃ também foi estatisticamente semelhante aos demais tratamentos. Os

tratamentos que utilizaram doses de 200 mg.L^{-1} e resfriamento a 5°C por sete dias e embebição em água destilada por 18 horas foram ineficientes na germinação e IVG.

As porcentagens de germinação e IVG se mostraram extremamente baixos quando comparados a trabalhos semelhantes com outras espécies da mesma família e devido ao padrão de baixa germinação, se faz necessário mais estudos acerca da espécie.

6. REFERÊNCIAS

- ALVES, M.C.S.; MEDEIROS-FILHO, S.; ANDRADE-NETO, M.; TEÓFILO, E. M. *Superação da dormência em sementes de Bauhinia monandra britt. e Bauhinia unguolata L. - caesalpinoideae. Revista Brasileira de Sementes*, v. 22, nº 2, p.139-144, 2000
- AOYAMA, E.M.; ONO, E.O.; FURLAN, M.R. *Estudo da Germinação de Sementes de Lavanda (Lavandula angustifolia Miller). Sci. agric.* v.53, n.2-3, p. 267-272. 1996
- BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**. Berlim e New York: Springer Verlag. P. 367. 1985
- BEZERRA, A.M.E.; MEDEIROS FILHO, S.; BRUNO, R.L.A. MOMENTÉ, V.G. *Efeito da Pré-embebição e Aplicação de Ácido Giberélico na Germinação de Sementes de Macela. Revista Brasileira de Sementes*, v. 28, n 3, p.185-190, 2006
- BONIN, M.P.; PEDROSO-DE-MORAES, C.; MARTINI, G.A.; VERDOLINI-BENEDITO, P.; SOUZA-LEAL, T. *Avaliação dos tratamentos pré-germinativos em diferentes concentrações de GA₃ na germinação de Alcantarea imperialis (Vell.) Harms. Scientia Plena* 6, 051201, 2010
- BRASILEIRO, M.S.; CARVALHO, M.A.; KARIA, C.T. *Correlação entre Peso de Sementes e Vigor e Velocidade de Germinação em Stylosanthes guianensis (Aubl.)Sw. IX Simpósio Nacional Cerrado*. 2008
- BRANT, R.S.; ALBUQUERQUE, C.J.B.; OLIVEIRA, J.A.; SANTOS, C.M. *Germinação e Vigor de Tanchagem e de Melissa. Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia*. v. 2, n. 2 mai/ago, 2009
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E.; *Meios nutritivos*. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH. v. 1, p. 87-132. 1998
- CARUSO, J. L.; CALLAHAN, J.; DECHANT, C.; JAYASIMHULU, K.; WINGET, G. D. *Carnosic acid in green callus and regenerated shoots of Rosmarinus officinalis. Plant Cell Reports*. v. 19, p. 500-503. 2000
- CASTRO, H.C.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. Visconde do Rio Branco, MG: Editora Suprema. 2001
- COSTA, D.T.; DROSTE, A. *Efeito da esterilização sobre o estabelecimento da cultura in vitro de Rosmarinus officinalis Linn. (Lamiaceae). PESQUISAS, BOTÂNICA*. n 61, p. 315-324 São Leopoldo: Instituto Anchieta de Pesquisas, 2010

- EHLERT, P.A.D. *Aspectos agronômicos de alfavaca-cravo (Ocimum gratissimum L.)*. 2000. 44f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000
- FARNSWORTH, N.R.; SOEJARTO, D.D. *Global importance of medicinal plants*. In: AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. (Ed.). **Conservation of medicinal plants**. Cambridge: Cambridge University Press. p. 25-51. 1991
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. *Micropropagação*. IN: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa Spi/Embrapa-Cnph. v. 1, p. 183-260. 1998
- GIACOMETTI, D. C. **Ervas condimentares e especiarias**. São Paulo: Nobel, p. 158, 1989
- JACOB JUNIOR, E.A.; MENEGHELLO, G.E.; MELO, P.T.B.S.; MAIA, M.S. *Tratamentos para superação de dormência em sementes de cornichão anual*. **Rev. bras. sementes** v. 26, n. 2, Pelotas. dezembro. 2004
- JUDD W.A.; CAMPBELL C.S.; KELOGG E.A.; STEVEN P.F. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. São Paulo: Artmed. 2009
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 2008.
- KOMALI, A. S.; SHETTY, K.. *Comparison of the growth pattern and rosmarinic acid production in rosemary (Rosmarinus officinalis) shoots and genetically transformed callus cultures*. **Food Biotechnology**. v.12, p. 27-41. 1998
- KRAMER, P. J.; KOZLOWSKI, T. **Fisiologia das árvores**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1972
- KRUPPA, C.P.; RUSSOMANNO O.M.R. *Ocorrência de fungos em sementes de plantas medicinais aromáticas e condimentares da família Lamiaceae*. **Tropical Plant Pathology**. v. 33, n. 1, p. 072-075. 2008
- LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Washington, Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos. 1983
- LAINETTI R, BRITO N.R.S. **A cura pelas ervas e plantas medicinais brasileiras**. Rio de Janeiro: Tecnoprint. 1979.
- LEITE, V.C.A., HEBLING, S.A. *Efeito do ácido giberélico (GA_3) e da luz na germinação in vitro de sementes de *Cattleya warnerii* T. Moore*. **Natureza on line** 5(2): 55-62. [on line] <http://www.naturezaonline.com.br>
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas Medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. p. 223. 2002.

- MALAVASI, M.M. *Germinação de Sementes*. In: PINA RODRIGUES, F.C.M. (Coord.). **Manual de Análise de Sementes Florestais**. Campinas, Fundação Cargill. 1988
- MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. **Princípios de Biotecnologia em Plantas: Uma Introdução a Engenharia Genética em Plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. p. 101-181. 1994
- MELO, J.T.; SILVA, J.A.; TORRES, R.A.A.; SILVEIRA, C.E.S.; CALDAS, L.S. *Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do cerrado*. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. (Ed.) **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA/CPAC. p.195-235. 1998
- MENEGUELLO, G. E.; SCHNEIDER, S. M. H.; LUCCA FILHO, O. A. *Veracidade da germinação indicada nas embalagens de sementes de espécies medicinais*. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.24, n.1, p. 4. 2002
- METIVIER, J.R. *Citocininas e giberelinas*. In: FERRI, M.G. (ed.). **Fisiologia vegetal**. 2.ed. São Paulo: EDUSP. v.2, p.93- 162. 1986
- MISRA, P. ; CHATURVEDI, H. C. *Micropropagation of Rosmarinus officinalis L.* **Plant Cell Tissue and Organ Culture** v. 3, p. 163-168. 1984
- MURASHIGE, T.; Skoog, F. *A resied medium for rapid growth and bioassays with tabacotissue cultures*. **Physiol. Plant**. 1962.
- PAULETTI, G.F.; BARROSO, C.M.; BARROS, I.B.I. *Estudo da Germinação de Sementes de Poejo do Campo (Cunila galioides Benth.)*. **Rev. Bras. Agroecologia**, v.2, n.1, fev. 2007
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasilia: AGIPLAN. p. 289. 1977
- POMPELLI, M.F. *Germinação de Dickia encholirioides var encholirioides (Bromeliaceae, Pitcairnioideae)*. **Floresta e Ambiente**. v. 13, p 1-9. 2006
- PORTE, A.; GODOY, R. L. O. *Alecrim (Rosmarinus officinalis L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial*. **B. CEPPA.Curitiba**. v. 19, n. 2. p. 193-210, jul/dez. 2001
- SILVA, A.M.O.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; CARVALHO, E.B.T; LIMA, A.; NOVOA, A.V.; MANCINI-FILHO, J. *Efeito do extrato aquoso de alecrim (Rosmarinus officinalis L.) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos*. **Rev. Nutr.**, Campinas, 24(1):121-130, jan./fev., 2011
- SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. de. *Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance*. In: **WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.
- SILVA, M.S.A.; SILVA, R.M.A.; HIGINO, J.S.; PEREIRA, M.S.V.; CARVALHO, A.A.T. *Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de Rosmarinus*

officinalis Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 18(2): 236-240, Abr./Jun. 2008

SIMPSON, M.G. *Plant Systematic*. Amsterdam: Elsevier. 2006

SANTOS NETO, A.L.; MEDEIROS FILHO, S.; BLANK, A.F.; SANTOS, V.R.; ARAÚJO, E. *Influência do Peso da Semente e Promotores Químicos na Qualidade Fisiológica de Sementes de Sambacaitá*. **Revista Caatinga**. v. 22, n. 1, p. 187-192, jan/mar. 2009

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**. p. 640. 2005

STENZEL, N.M.C.; MURATA, I.M.; NEVES, C.S.V.J.N. *Superação da Dormência em Sementes de Atemóia e Fruta-do Conde*. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 2, p. 305-308. agosto. 2003

TAIZ, L. ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed. 2008.

TORRES, A.C., CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*; 1 v. DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento. 1998.

TORRES, A.A.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRIGIDO, M.M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília:Embrapa Hortaliças, 2000.

VAZQUEZ-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. *Patterns of seed longevity and germination in the rainforest*. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v. 24, p. 69-87. 1993