



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL  
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**DIENI CHRUSCIAK PIOVESAN BIRCK**

**INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE MANJERICÃO (*Ocimum basilicum L.*) E  
MICROPROPAGAÇÃO**

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2017**

**DIENI CHRUSCIAK PIOVESAN BIRCK**

**INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) E  
MICROPROPAGAÇÃO**

Trabalho de conclusão do curso apresentado ao curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção do título de engenheira Agrônoma.

Orientador: Prof. Dr. Roberson Dibax.

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2017**

**PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas**

Birck, Dieni Chrusciak Piovesan  
Introdução in vitro de manjeriço (*Ocimum basilicum*  
L.) e micropropagação/ Dieni Chrusciak Piovesan Birck.  
-- 2017.  
29 f.:il.

Orientador: Roberson Dibax.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Agronomia , Laranjeiras do Sul, PR, 2017.

1. Plantas medicinais. 2. Cultura de tecido in vitro.  
3. Propagação de plantas. I. Dibax, Roberson, orient.  
II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DIENI CHRUSCIK PIOVESAN BIRCK

INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) E  
MICROPROPAGAÇÃO

Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Professor Dr. Roberson Dibax.

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:  
21/06/2017.

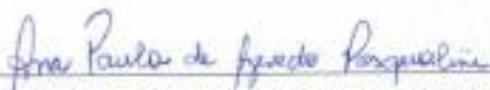
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Roberson Dibax – UFFS



Prof. Dr. Ricardo Yamazaki – UFFS



Doutoranda Ana Paula de Azevedo Pasqualini – UFPR

## Agradecimento

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como universitária, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

Aos meus familiares Rudi Lineu Piovesan (pai), Rosana Salete Piovesan (mãe), Débora Chrusciak Piovesan (irmã), por nunca terem deixado que eu desistisse, por serem e estarem sendo o meu suporte em qualquer situação, pelo incentivo durante toda essa jornada, bem como os demais familiares.

Ao meu esposo e companheiro de todas as horas Antonio Carlos Birck Junior por sempre me incentivar, apoiar e compreender todos os momentos de ausência, sempre acreditando em mim até mesmo quando eu não acreditava.

Em especial agradeço a você Augusto Piovesan Birck você é a razão de todo o sorriso, de toda a dedicação, tudo é por você meu filho.

Meus agradecimentos aos meus amigos Dalila Fabiane Kurpell, Danilo Lisboa, Isis Portolan, Mayra Carboni, companheiros de trabalho e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar na minha vida com certeza, não teria a mesma graça sem vocês. Claro não se esquecendo do meu colega Edenilson Zarowni todo esse trabalho não teria dado certo sem sua ajuda, muito obrigada.

Ao meu professor orientador Dr. Roberson Dibax, pela orientação, amizade, apoio, ensinamentos e principalmente confiança depositada em meu trabalho e desempenho acadêmico, permitindo me desenvolver intelectualmente.

Aos demais professores do corpo docente de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

## RESUMO:

A cultura do manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) apresenta uma diversidade de uso, podendo ser utilizado na culinária, contém óleos essenciais que podem ser utilizados na indústria, cosméticos e farmacêuticas. Neste contexto, estudos de cultura de tecidos e micropropagação são fundamentais para auxiliar o melhoramento vegetal desta espécie. Este é o primeiro projeto de micropropagação realizado na Universidade Federal da Fronteira Sul, e tem como objetivo estabelecer um protocolo de introdução e micropropagação *in vitro*. Esse trabalho foi dividido em três etapas sendo a primeira voltada à assepsia das sementes que foram submetidas a um pré tratamento com etanol 70%, seguido de tratamentos em soluções de hipoclorito de sódio com concentrações variando de 0 a 10%, que buscam obter o maior número de germinação. A segunda etapa foi feita cortes na região nodal e estes expostos em soluções com concentrações diferentes de 6-benzilaminopurina (BAP) de (0 a 1,5 mg) para regeneração do caule, na terceira etapa foram realizados cortes na região nodal, e expostos em soluções com concentrações diferentes de BAP (0 a 0,80 mg) para regeneração de caule. Para obter os resultados foram realizados Testes de Tukey a 1% de probabilidade. Os melhores resultados para assepsia das sementes foi com hipoclorito a 2,5% por 20 minutos é mais significativo para germinação. O BAP se mostrou eficiente para induzir o número de calos na concentração de 0,5 mg, porém não se mostrou interessante para brotos e desenvolvimento das plantas. Porém quando se repica as plantas e induzem elas novamente em concentrações diferentes para brotos e calos a concentração de 0,7 e 0,75 mg de BAP se destacam, onde somente para o desenvolvimento das plantas o melhor é não conter o BAP.

Palavras-chave: Plantas medicinais, cultura de tecidos *in vitro*, propagação de plantas

## Lista de figuras

Figura 1 - Placas com sementes de <i>Ocimum basilicum</i> L. incubadas em meio de cultivo MS em câmara de germinação tipo BOD .....	17
Figura 2 - Plantas de <i>Ocimum basilicum</i> L. após 30 dias submetidos a diferentes concentrações de BAP. ....	18
Figura 3 - Plantas de <i>Ocimum basilicum</i> L. após 30 dias submetidos a diferentes concentrações de BAP, pela segunda vez, pelo explante nodal. ....	19
Figura 4- Resultado de plantas germinadas de <i>Ocimum basilicum</i> L., após terem passado pelos tratamentos de assepsia com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, após 30 dias .....	21
Figura 5- Resultado para comparação de médias de número de brotos de <i>Ocimum basilicum</i> L. em diferentes concentrações de BAP após 30 dias .....	21
Figura 6- Resultado para comparação de médias de número de calos de <i>Ocimum basilicum</i> L. em diferentes concentrações de BAP após 30 dias .....	22
Figura 7- Resultado do comprimento das plantas de <i>Ocimum basilicum</i> L. em diferentes concentrações de BAP após 30 dias .....	23
Figura 8- Resultado do número de brotos de <i>Ocimum basilicum</i> L. em diferentes concentrações de BAP após 30 dias .....	24
Figura 9- Resultado de número de calos de <i>Ocimum basilicum</i> L. em diferentes concentrações de BAP após 30 dias.....	25
Figura 10 - Resultado do crescimento das plantas de <i>Ocimum basilicum</i> L. em diferentes concentrações de BAP após 30 dias .....	25

## Sumário

1. Introdução .....	8
2. Objetivos .....	9
2.1 Objetivo geral .....	9
2.2 Objetivos específicos .....	10
3. Justificativa .....	10
4. Referencial teórico .....	10
4.1 Descrição botânica e importância .....	10
4.2 Cultivo de <i>Ocimum basilicum</i> L. ....	11
4.3 Importância econômica e industrial dos óleos essenciais .....	12
4.4 Cultura de tecidos .....	13
4.5 Uso dos reguladores de crescimento no cultivo in vitro .....	15
5. Material e métodos .....	16
5.1 Local e realização dos experimentos .....	16
5.2 Condições gerais de cultura in vitro .....	16
5.3 Desinfestação das sementes .....	17
5.4 Primeiro experimento com concentrações de BAP .....	17
5.5 Nova repicagem de segmentos nodais e concentrações de BAP .....	19
6. Resultado e discussões .....	20
6.1 Assepsia .....	20
6.2 Primeiro experimento com concentração de BAP .....	21
6.3 Nova repicagem de segmentos nodais e concentrações de BAP .....	23
7. Conclusões .....	26
8. Referências .....	27

## 1.Introdução

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) pertence à família Lamiaceae, sendo uma planta aromática, rica em óleos essenciais. Suas propriedades medicinais estão consagradas pelo uso popular desde os tempos antigos e também suas folhas são utilizadas na culinária por serem saborosas e decorativas. O seu óleo essencial tem vários princípios ativos atuando no preparo de perfumes, cosméticos, repelentes de insetos, possui ação anestésica local em medicação odontológica, e também usado para tratamentos para tosses, resfriados, expectorantes dentre outras (RIBEIRO et al., 2007).

Rosado (2009) explica que apesar do manjeriço ter uma facilidade de se obter muda pelo método convencional por meio de sementes e estacas, a busca por características de interesse trazem a micropropagação como um meio efetivo para a multiplicação rápida, onde se busca uniformidade de progênie, sendo essa característica essencial em plantas medicinais e aromáticas.

A cultura de tecidos é definida como o conjunto de técnicas capazes de tornar possível o cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais mediante a utilização de substratos nutritivos e cultivo em um ambiente controlado. Este tipo de cultura necessita de condições assépticas para seu cultivo após isolamento dos explantes oriundos da planta-mãe. A assepsia adequada do explante e do ambiente promoverá o desenvolvimento adequado minimizando as chances de contaminação (BRANDÃO, 2014). Para que esse objetivo seja alcançado é preciso criar um protocolo para que a cultura desejada possa ser implantada *in vitro*, isso inclui obtenção das plantas matrizes, desinfecção, estudos a cerca dos meios de cultura adequados, procedimentos de manipulações que garantirão melhores resultados no desenvolvimento dos protocolos.

Nesse ambiente, as células, tecidos e órgãos podem se multiplicar ou continuar a crescer de modo não organizado ou se regenerar em uma planta inteira. O uso das técnicas de cultura de tecidos-vegetais permite reduzir o tempo de produção de cultivares, auxilia no melhoramento genético

convencional e pode ser considerada uma ferramenta biotecnológica para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas de interesse comercial ou farmacológico (BRANDÃO, 2014).

Handa (2005) explica que a cultura de tecidos consiste num conjunto de técnicas nas quais um explante é isolado e cultivado sob condições de plena assepsia, em um meio nutritivo artificial. Assim, diversas partes da planta como gemas, meristemas apicais, embriões, segmentos de caule, extremidade de raízes e outras, podem ser cultivadas *in vitro* em meio nutritivo apropriado em ambiente asséptico.

Em relação a desinfestação das sementes Calvete (2012) afirma que para a limpeza clonal *in vitro*, os propágulos devem ser oriundos de meristemas multiplicados pela técnica de micropropagação, para isso é feita a coleta do material vegetal, desinfestação e inoculação dos explantes em meio próprio para a regeneração das partes aéreas, com posterior multiplicação, enraizamento e aclimatização. A fase de multiplicação se caracteriza pela proliferação de brotos axilares ou adventícios em número variável, conforme o genótipo utilizado, determinando a capacidade deste em formar folhas e novos meristemas. Durante essa etapa, vários cuidados são necessários para manter a homogeneidade do cultivo, devendo ser levados em conta o número e os intervalos dos subcultivos, a taxa de multiplicação e a estabilidade genética do material, evitando a variação somaclonal.

Este trabalho é o primeiro de cultivo *in vitro* e micropropagação sendo realizado na Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus- Laranjeiras do Sul, tendo como objetivo abrir várias oportunidades de estudo nesta área.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Estabelecimento de um protocolo de introdução e micropropagação *in vitro* de plantas de *Ocimum basilicum* L.

## **2.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver um protocolo de assepsia para as sementes de manjeriço
- Comparar a reação com diferentes concentrações de BAP
- Comparar a quantidade de calos e brotos que a planta regenerou durante o cultivo *in vitro*
- Comparar a indução de calos formados a partir de segmentos nodais de *Ocimum basilicum* L.

## **3. Justificativa**

O *Ocimum basilicum* L. vem se destacando através do seus óleos essenciais nas áreas fármacos, cosméticos e perfumarias. Este experimento pode auxiliar outros futuros trabalhos em melhoramento de plantas, podendo ser utilizado os melhores resultados.

## **4. Referencial teórico**

### **4.1 Descrição botânica e importância**

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) pertencente à família *Lamiaceae* tem sido alvo de muitas pesquisas em razão das características importantes que incluem desde sua utilização na área alimentar até na de fármacos, cosméticos e perfumaria (RABELO et al., 2003).

A espécie possui caule ereto ramificado, e atinge cerca de 0,5 a 1 metro de altura. Suas folhas são delicadas, ovaladas, pubescentes e de verde brilhante. As inflorescências são do tipo espiga e compostas por flores brancas, lilás, verdes ou avermelhadas. Sua polinização é cruzada e os frutos são do tipo aquênio, de coloração preto-azulada (LORENZI e MATOS, 2002).

Compreende espécies de ervas e subarbustos dispersos das regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, Américas Central e do Sul, sendo a África considerada o principal centro de diversidade deste gênero (PATON, 1992).

Conforme pesquisas realizadas pelo IAC (2000), no Brasil o manjerição é comumente cultivado principalmente por pequenos produtores para a comercialização de suas folhas verdes e aromáticas, usadas frescas ou secas como aromatizante ou como condimento. Porém com os avanços farmacológicos e industriais seu uso vai além do *in natura* sendo amplamente utilizado para obtenção de óleo essencial, importante na indústria de perfumaria e na aromatização de alimentos e bebidas, e   esta característica que permite sua classificação aromática conforme as espécies utilizadas.

O interesse econ mico relacionado a componentes aromáticos de plantas direciona a atenção para a seleção de espécies comercialmente cultivadas, considerando quantidade e qualidade das substâncias voláteis (PAVIANI, 2004), e por este motivo as técnicas de propagação em escala e qualidade superiores vêm se tornando essencial a sua demanda.

Por ser atualmente de grande interesse econ mico, sua identificação botânica tem se tornado iminente tendo em vista que o g nero *Ocimum* da família *Lamiaceae*, compreende aproximadamente 60 espécies e há certa dificuldade em classificá-las devido à ocorrência de polinização cruzada, que facilitam hibridações, resultando, dessa maneira, um grande número de subespécies, variedades e formas (BLANK et al., 2004).

Segundo Simon (1990), às características morfológicas da planta, permitem ao manjeriço uma nomenclatura conforme o porte, formato da copa, tamanho e coloração da folhagem, sendo que dentre as espécies de maior importância encontram-se *Ocimum gratissimum* (manjeriço-doce), *Ocimum basilicum* (manjeriço branco), *Ocimum tenuiflorum*, e o *Ocimum selloi* Benth (elixir paregórico), que são produtores de óleos essenciais para produção de fármacos, perfumes e cosméticos (MATOS, 1998).

#### **4.2 Cultivo de *Ocimum basilicum* L.**

O cultivo do manjeriço em grandes áreas para a extração de óleo essencial ou para produção de folhas desidratadas para os mercados de plantas condimentares ou medicinais requer os protocolos essenciais agrícolas como qualquer outra planta, sendo necessário as correções de solo e

fertilizações necessárias, bem como a associação de práticas de manejo que garantam boa produtividade ao fim a que se destina (IAC, 2000).

As formas de propagação são as mais variadas (sementes, estacas, micropropagação, cultura de tecidos), sendo que as formadas em laboratório tem como principal característica, sua sanidade e vigor, devido as condições proporcionadas nesse sistema (CALDAS, 1998).

Recomendações técnicas do IAC (2000) estabelece que o plantio das mudas deve ser feito em setembro, no início da primavera, logo após as primeiras chuvas, (sendo que algumas variedades são sensíveis a doenças foliares e do sistema radicular e não se adaptam bem em locais de clima frio). A densidade de plantas por hectare pode variar em função do sistema de cultivo adotado, considerando-se que, cultivos intensivos com colheita mecânica irão requerer espaçamentos adequados ao tráfego de máquinas.

Vale frisar ainda que, a espécie é exigente em água e tratos culturais, necessitando fertilizações freqüentes quando se deseja cortes sucessivos da planta (IAC, 2000).

#### ***4.3 Importância econômica e industrial dos óleos essenciais***

As substâncias ativas das plantas medicinais são compostas pelo metabolismo primário e secundário, sendo o metabolismo primário responsável pela produção de substâncias indispensáveis à planta que se formam através do processo fotossintético, enquanto que o metabolismo secundário, responsável pela formação de substâncias, denominadas princípios ativos ou compostos secundários, são os óleos essenciais (ou essências naturais), resinas, alcalóides, flavonóides, taninos, princípios amargos, entre outros (CASTRO et al., 2001).

Verlet (1993) explica que “os óleos essenciais têm papel na atração de agentes polinizadores, de defesa contra herbívoros, como reguladores da taxa de decomposição da matéria orgânica no solo e como agentes antimicrobianos. Industrialmente, podem ser utilizados como antioxidantes ou aromatizantes dos alimentos, entre outros usos”.

Os óleos essenciais são formados principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos voláteis de forma cíclica e acíclica que por sua vez originam odor característico e auxiliam nas interações entre plantas, insetos e outros organismos, estando estes componentes presentes em quantidades variadas em diversos órgãos vegetais, sendo comumente encontrados nas folhas e flores, em estruturas denominadas canais secretores e pêlos glandulares (HARBONE, 2004).

Os empregos de óleos essenciais na indústria farmacêutica, são diversos desde suas propriedades assépticas, digestivas, sedativas e analgésicas abrangendo ainda farmocosméticos como bases para sabonetes, cremes, perfumes \_ e na indústria de alimentos como aditivos de aroma e sabor (GERMER, 1989).

Os países em desenvolvimento têm sido as principais fontes de óleos brutos, devido à política de diversificação da produção, no sentido de diminuir as importações e incrementar as exportações, procurando equilibrar a balança comercial (VERLET, 1993).

O principal desafio para sua produção reside no fato de se desenvolverem ou se adaptarem linhagens genéticas com características agrônomicas satisfatórias e desejável composição química (CASTRO, et al. 2001).

O preço do óleo essencial de manjeriço doce no mercado internacional atinge valor próximo a U\$ 110,00/L, sugerindo que a implantação da cultura do manjeriço doce para obtenção de óleo essencial poderá ser uma alternativa promissora para pequenos produtores rurais (BLANK et al., 2004)

#### **4.4 Cultura de tecidos**

A cultura de tecidos é ferramenta técnica para propagação de plantas e vem sendo utilizada com sucesso em várias espécies, sendo que o cultivo *in vitro* é um procedimento relevante na propagação de diferentes espécies (LEDO et al., 2007), contudo o nível de conhecimento sobre essa técnica exige o máximo de cuidados para que as plântulas originadas no processo sejam as de melhor qualidade para o efetivo transplante.

Dentre as aplicações da cultura de tecidos vegetais, a micropropagação é a técnica de maior impacto e de resultados mais concretos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Segundo Bastos et al. (2007), a técnica abrange diferentes etapas que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até seu enraizamento, culminando com a aclimatização da microplanta.

Estas técnicas são muito importantes, tanto na propagação de plantas saudáveis como na propagação de clones que tem alto valor comercial para os diferentes setores industriais destacando-se a vantagem da obtenção de uma grande quantidade de plantas de elevada qualidade num período de tempo bastante reduzido (ULISSES, 2010).

Neste processo são isolados pequenos fragmentos do tecido vivo de um organismo, chamados explantes, os quais são cultivados sob condições assépticas em um meio de cultura específico por períodos indeterminados. Estes explantes podem ser de diferentes tamanhos, grandes como plântulas e órgãos ou pequenos como células ou protoplastos (BATAGIN, 2008).

Conforme Tavares (2001), nos últimos anos, houve um aumento no interesse da utilização da técnica de micropropagação em plantas aromáticas e medicinais, o que acabou por proporcionar uma produção em larga escala.

Segundo Sharp et al.(1979) já atentava para o fato desta técnica exigir condições de manuseio assépticas, que muitas vezes são alcançadas com o uso de substâncias germicidas encontradas na planta doadora de explantes, nos próprios explantes, ou ainda, na escolha de uma planta-matriz de boa qualidade sanitária.

Apesar de existirem diversas substâncias de ação germicida, percebe-se que a maior dificuldade nessa etapa reside em se obter tecido descontaminado sem conduzi-lo à morte quando isolado (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

No caso da espécie *Ocimum basilicum* L., o grande interesse da indústria, não está só nas propriedades medicinais desta planta, mas sim em seu valor como planta aromática produtora de óleo essencial muito utilizado na indústria de fármacos e perfumaria (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

#### **4.5 Uso dos reguladores de crescimento no cultivo *in vitro***

França (2004) destaca que a micropropagação objetiva a obtenção de mudas com qualidades agronômicas desejáveis, indexadas, livre de patógenos e, com elevado padrão genético para síntese de metabólitos secundários e/ou produção de óleos essenciais para o emprego na indústria farmacêutica. Sendo assim, os reguladores apresentam um potencial que viabiliza esses requisitos.

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. No desenvolvimento dos meios nutritivos para a cultura de tecidos, houve desde o início uma procura de meios definidos, de composição conhecida e controlada. Assim, torna-se possível a reprodução dos resultados em qualquer época ou lugar (CALDAS, et al 1998).

Sendo assim, não se pode fragmentar a idéia de que os fitormônios são um componente essencial ao meio de cultivo escolhido. Segundo Castro et al. (2005), um fitormônio é um composto orgânico, não nutriente, de ocorrência natural, produzido na planta, que em baixas concentrações promove, inibe ou modifica processos morfológicos e fisiológicos do vegetal. Considerando sua importância a adição de hormônios fitorreguladores em meios nutritivos tem o objetivo principal de suprir possíveis deficiências de teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz. Simultaneamente, a adição de fitorreguladores estimula certa resposta como alongamento ou multiplicação da parte aérea (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Conforme Taiz & Zeiger, (2004), as citocininas se destacam nos processos de divisão e diferenciação celular em calos na presença de auxina, promovendo a formação de gemas ou raízes a partir de calos em cultura, entre outros. Assim sendo, pode-se afirmar que, as citocininas são essenciais para métodos de cultura de tecidos e para a biotecnologia.

O tipo de citocinina, assim como sua concentração são fatores fundamentais para o bom desempenho da multiplicação *in vitro*. GRATTAPAGLIA & MACHADO, (1998), ressaltam que citocininas como a 6-

benzilaminopurina (BAP) é muito eficaz em promover a multiplicação de espécies clonais.

Batista et al (2001) estudando a indução de superbrotamento nas gemas cotiledonares de gergelim (*Sesamum indicum* L.), pode constatar que houve um maior desenvolvimento dos explantes em que o meio de cultura foi suplementado com maiores concentrações de BAP.

Na análise da expressão do potencial de organogênese realizada por Silva et al. (2001) em explantes da canela sassafrás (*Ocotea odorífera*), utilizando-se o BAP, observou-se maiores valores de neoformação de gemas de segmentos nodais na presença do hormônio o que por ora reforça a tese de que seu uso em conjunto com o substrato torna viável a produção de *Ocimum basilicum* em sistemas de micropropagação *in vitro*.

## **5. Material e métodos**

### **5.1 Local e realização dos experimentos**

O presente trabalho foi desenvolvido no período entre outubro a abril 2016/2017, nos laboratórios didáticos do campus da Universidade Federal da Fronteira Sul, localizado em Laranjeiras do Sul, Paraná.

As sementes de manjeriço (*Ocimum basilicum*) utilizadas foram da empresa Isla Multi empresa responsável pela comercialização de sementes.

### **5.2 Condições gerais de cultura *in vitro***

Todas as culturas *in vitro* respectivas a cada experimento foram mantidas em câmara de germinação BOD, sob luz fluorescente branca fria com densidade de fluxo fotossintético de 40  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ , fotoperíodo de 16 h e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

As culturas foram realizadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro e 2 cm de altura, contendo 30 mL de meio de cultura e vedadas com filme PVC.

Todos os meios de cultura terão o pH ajustado em 5,8 e foram autoclavados durante 20 min a 120°C.

### **5.3 Desinfestação das sementes**

Para a desinfestação das sementes comerciais Isla Multi, primeiramente foi realizado um pré-tratamento em etanol 70% durante 2 minutos e em seguida um tratamento com hipoclorito de sódio durante 20 minutos e triplo enxágüe com água deionizada autoclavada, sob capela de fluxo laminar.

**Figura 1 - Placas com sementes de *Ocimum basilicum* L. incubadas em meio de cultivo MS em câmara de germinação tipo BOD**



Fonte: Elaborada pelo autor

Os tratamentos de desinfestação comparados foram os seguintes:

- T1. Testemunha (sem hipoclorito de sódio),
- T2. 2,5% de hipoclorito de sódio,
- T3. 5% de hipoclorito de sódio,
- T4. 7,5 % de hipoclorito de sódio
- T5. 10% de hipoclorito de sódio.

### **5.4 Primeiro experimento com concentrações de BAP**

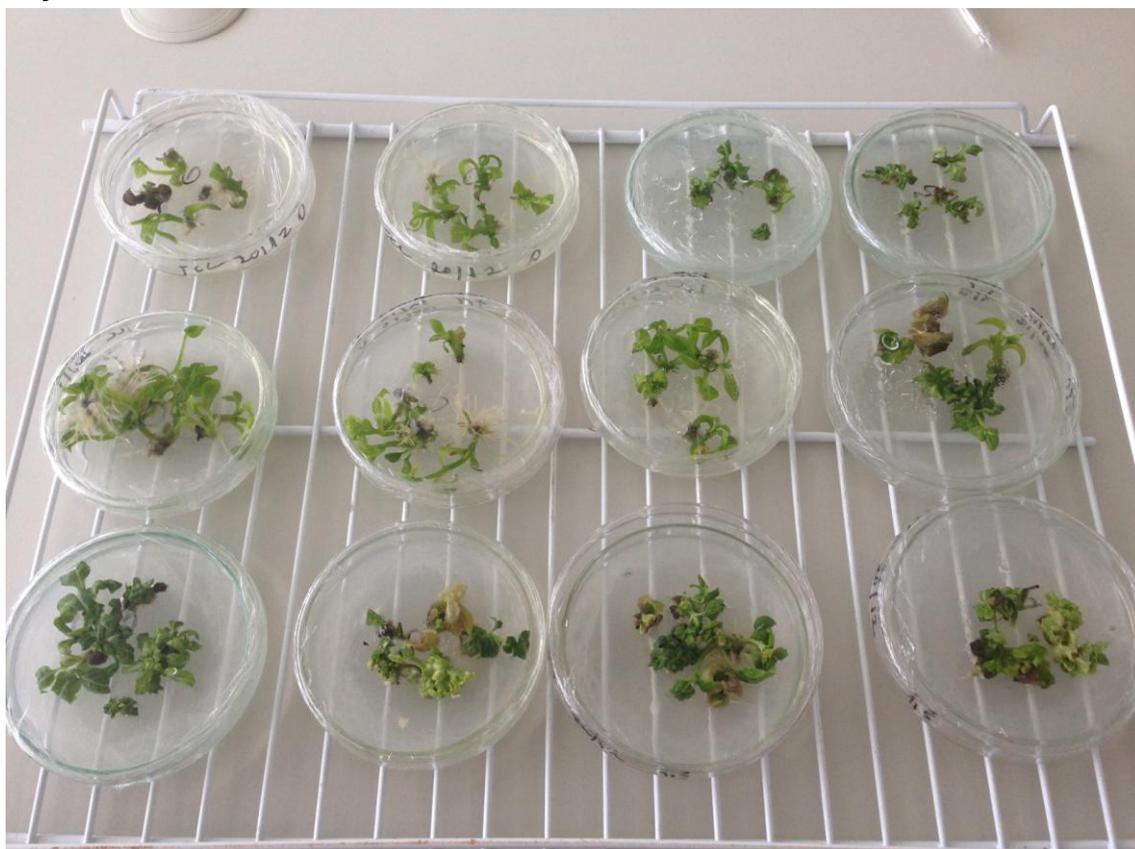
Após os procedimentos de desinfestação, as sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) acrescidos de 30g/l de

sacarose mio-inositol a 100 mg/l e ágar a 10 g/l com pH regulado em 5,8 antes de ser autoclavados a 120°C por 20 minutos e incubados em câmara de germinação tipo BOD.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 7 repetições e 12 sementes por unidade experimental. Após 30 dias de cultivo, foi feito o corte na região nodal, e colocando esta em diferentes soluções de BAP para regeneração do caule. Que foram:

- T1. 0 testemunha,
- T2. 0,25 mg de concentrações de BAP,
- T3. 0,5 mg de concentrações de BAP ,
- T4. 0,75 mg de concentrações de BAP,
- T5. 1,0 mg de concentrações de BAP ,
- T6. 1,5 mg de concentração de BAP.

**Figura 2 - Plantas de *Ocimum basilicum* L. após 30 dias submetidos a diferentes concentrações de BAP.**



Fonte: Elaborada pelo autor

### 5.5 Nova repicagem de segmentos nodais e concentrações de BAP

Após trinta dias foram realizada as avaliações das concentrações, levando em consideração o número de plantas desenvolvidas, o número de brotos, calos e comprimento individual de casa planta. Logo após foram feitos cortes na região nodal e submetidos em novas concentrações de BAP.:

- T1. testemunha (0)
- T2. 0,6 mg de concentrações de BAP,
- T3. 0,7 mg de concentrações de BAP,
- T4. 0,75 mg de concentrações de BAP,
- T5. 0,8 mg de concentrações de BAP .

Após trinta dias foram realizadas novas análises observando o numero de brotos, calos e comprimento individual de cada planta.

**Figura 3 - Plantas de *Ocimum basilicum* L. após 30 dias submetidos a diferentes concentrações de BAP, pela segunda vez, pelo explante nodal.**



Fonte: elaborada pelo autor

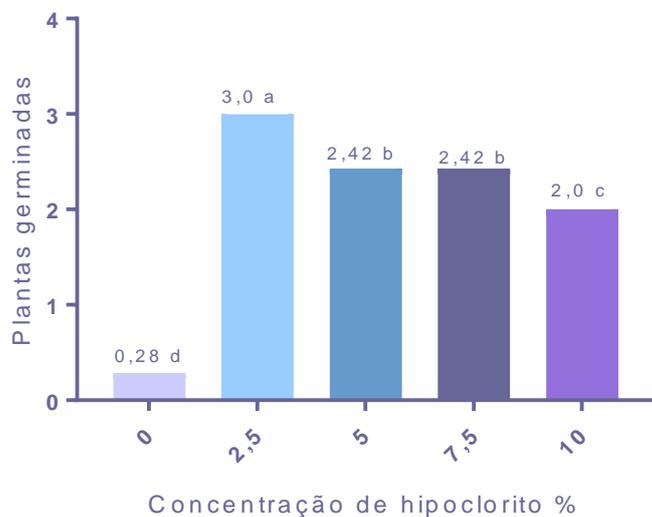
Para as análises estatísticas foi utilizado o sistema SISVAR desenvolvido por Ferreira (2006), que analisou as interações entre os tratamentos e a resposta da planta. Os resultados para os tratamentos foram atestados através da ANOVA e do teste de Tukey a 1% de probabilidade.

## **6. Resultado e discussões**

### **6.1 Assepsia**

Com relação aos resultados referentes ao experimento de assepsia e germinação de sementes de *Ocimum basilicum* L., a análise revelou diferenças estaticamente significativas entre os tratamentos. O melhor resultado foi obtido com a concentração de 2,5 de hipoclorito de sódio no qual 25 % de plantas tiveram sua germinação e não apresentaram contaminações fungicas e bacterianas (Figura 4). Sendo que os tratamentos com concentração de 5 e 7,5% de hipoclorito também se mostraram satisfatório, diferente da testemunha onde obteve uma baixa germinação (5%). Resultado diferente foram observados no trabalho de Arruda et al. (2012) onde não obteve diferenças significativas com a assepsia com hipoclorito em concentrações de 1 a 10% para germinação de *Ocimum basilicum* L.

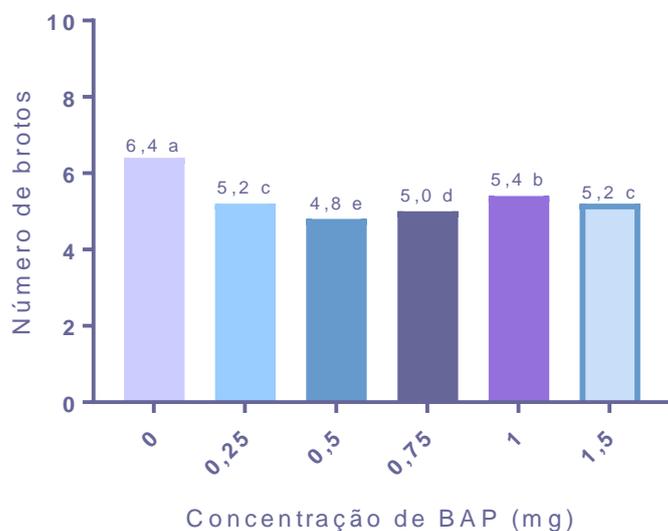
**Figura 4- Resultado de plantas germinadas de *Ocimum basilicum* L., após terem passado pelos tratamentos de assepsia com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, após 30 dias**



## **6.2 Primeiro experimento com concentração de BAP**

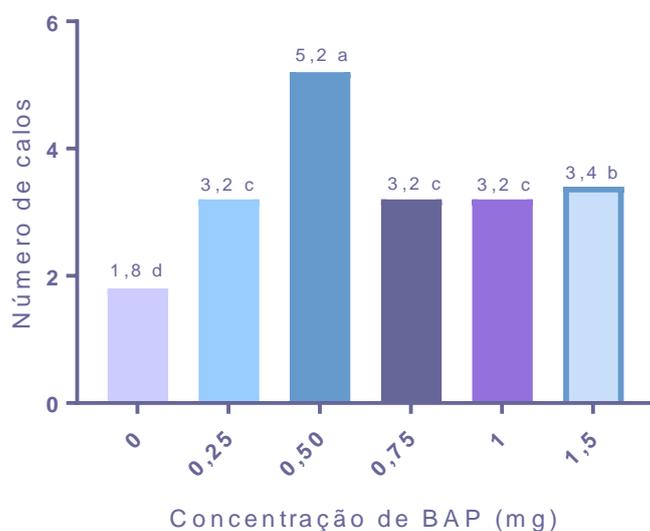
Em relação ao número de brotos o tratamento que se destacou foi a testemunha que apresentou diferença estatística em número de brotos em relação às concentrações de BAP como mostra a figura 6. Resultado diferente foi encontrado no trabalho de Monfort (2013), onde o número de brotações foi maior com a presença de BAP na espécie *Ocimum basilicum*.

**Figura 5- Resultado para comparação de médias de número de brotos de *Ocimum basilicum* L. em diferentes concentrações de BAP após 30 dias**



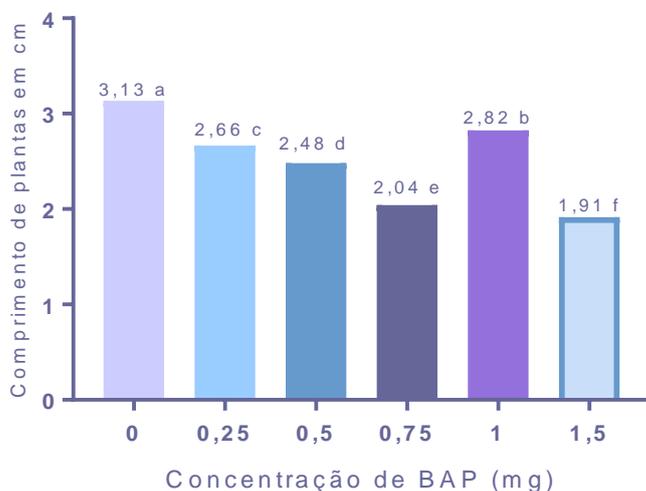
Verifica-se que a concentração de BAP diferenciou o número de calos, onde a concentração de 0,5 mg/l de BAP foi a que obteve os melhores resultados estatisticamente, e sem a presença de BAP os tratamentos apresentaram resultados menos satisfatórios em relação as concentrações de BAP de acordo com a figura 7. Este resultado condiz com o trabalho de OLIVEIRA (2014) que mostra que BAP induziu a produção de calos, em *Physalis angulata* L.

**Figura 6- Resultado para comparação de médias de número de calos de *Ocimum basilicum* L. em diferentes concentrações de BAP após 30 dias**



Foram observados que em relação ao comprimento das plantas, na ausência de BAP foi a onde ocorreu a maior altura. sendo que nas análises estatísticas mostra que a diferença de tamanho entre as plantas é significativa. A maior concentração de BAP, 1,5 mg/l, apresentaram plantas menores, como podem ser observados na figura 8. Resultado coincide com o trabalho de Monfert et al (2012) observou nas plantas de *Ocimum basilicum* que a maior altura das plantas ocorreu na ausência de BAP em todos os segmentos, e que a maior concentração de BAP tende a reduzir as brotações.

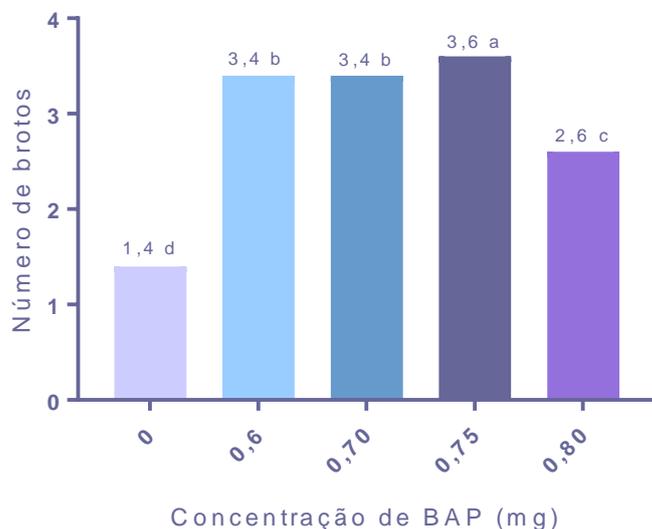
**Figura 7- Resultado do comprimento das plantas de *Ocimum basilicum* L. em diferentes concentrações de BAP após 30 dias**



### **6.3 Nova repicagem de segmentos nodais e concentrações de BAP**

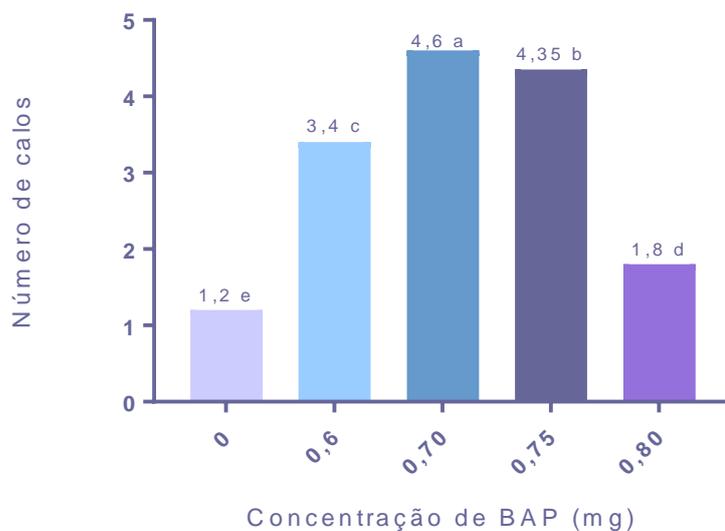
Com os explantes novamente repicados, utilizando suas partes nodais, são submetidos a mais vinte oito dias em concentrações diferentes de BAP. Após este procedimento pode-se observar que o menor número de brotos ocorreu sem a concentração de BAP, destacando-se as concentrações de BAP de 0,75 mg/l, onde se obteve o maior número de brotos, como demonstrado na figura 9. Semelhante ao trabalho de Dode, et al. (2003) que utilizou *Ocimum basilicum* L., onde as maiores concentrações de BAP induziram aumento no número de explantes com brotos.

Figura 8- Resultado do número de brotos de *Ocimum basilicum* L. em diferentes concentrações de BAP após 30 dias



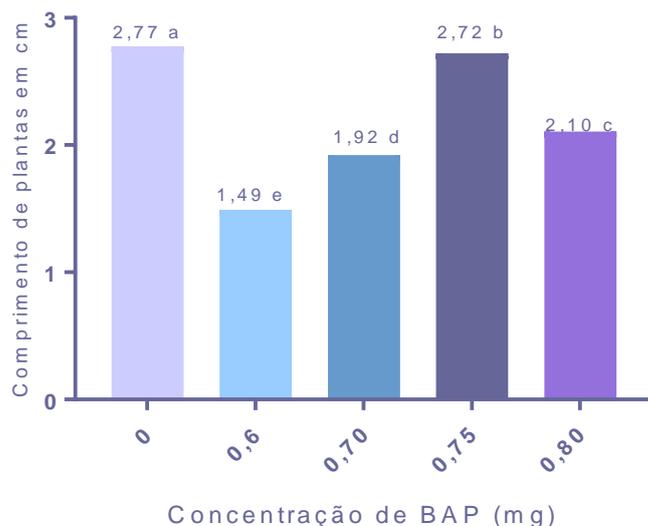
Com relação ao número de calos em diferentes concentrações de BAP, os resultados obtidos demonstram que a concentração de 0,70 mg/l de BAP foi o tratamento mais eficiente apresentando maior número de calos. Todos os resultados apresentaram diferença estatística sendo que a testemunha foi o tratamento que apresentou menor número de calos, estes resultados estão expressos na figura abaixo, de acordo com o trabalho de Rosado (2008) utilizando *Ocimum basilicum* L., que a utilização do BAP foi expressiva na indução e maior desenvolvimento dos calos.

**Figura 9- Resultado de número de calos de *Ocimum basilicum* L. em diferentes concentrações de BAP após 30 dias**



Quando foram analisados as médias de crescimento das plantas de *Ocimum basilicum* L. em diferentes concentrações de BAP, os resultados demonstram que a testemunha foi o tratamento que apresentou maior média de comprimento das plantas, sendo que todos os tratamentos diferiram estaticamente entre si. O menor comprimento de plantas foi observado tratamento na concentração de 0,6 mg/l de BAP. Este resultado harmoniza-se com o de Rosado (2009), que para plantas com maior comprimento e mais vigorosas foram obtidas em segmentos nodais cultivados em meio de MS desprovidos de reguladores.

**Figura 10 - Resultado do crescimento das plantas de *Ocimum basilicum* L. em diferentes concentrações de BAP após 30 dias**



## 7. Conclusões

A desinfestação de sementes do *Ocimum basilicum* L. com hipoclorito a 2,5% por 20 minutos é eficiente para germinação.

O BAP se mostrou eficiente para induzir o número de calos na concentração de 0,5 mg/l, porém não se mostrou interessante para brotos e desenvolvimento no comprimento das plantas. Porém quando se replica as plantas e induzem elas novamente em concentrações diferentes para brotos e calos a concentração de 0,7 e 0,75 mg/l de BAP se destacam, quanto mais brotos tiver maior será o número de células diferenciadas. E o BAP como esperado inibe o crescimento das plantas.

## 8. Referências

- ARRUDA, E. S. et al. **Teste de germinação de sementes de manjeriço inoculadas com microrganismos diferentes (EM)**. Cadernos de Agroecologia- INSS 2236-7934. Vol 7, Nº 2, Dez 2012.
- BASTOS, L.P. et al. **Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*)**. Revista Brasileira de Biociências, v.5, supl.2, p.1122-1124, 2007.
- BATAGIN, K. D. **Análises anátomo-fisiológicas de folhas de pupunheiras cultivadas *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo* visando otimizar o protocolo de aclimatização**. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2008.
- BATISTA, R.C.; CARVALHO, J.M.F.C.; ALMEIDA, F. de A.C.; MATA M.E.R.M.C. Micropropagação *in vitro* de três cultivares de gergelim. Revista de Oleaginosas e Fibras. v.5, n.3, p. 397-404, 2001
- BLANK, A. F.; et al. **Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjeriço e alfavaca**. Horticultura Brasileira, Brasília, v. 22, n.1, p. 113-116, jan./mar. 2004.
- BRANDÃO, W. R. O.; **Avaliação de Processo de Desinfestação de Explantes Foliares *in vitro* de Híbridos de Morango para Aquisição de Protocolo**, 2014. Disponível no site: <[http://www.fepeg.unimontes.br/sites/default/files/resumos/arquivo\\_pdf\\_anais/resumo\\_expandido\\_morang\\_o\\_ii\\_corrigeo.pdf](http://www.fepeg.unimontes.br/sites/default/files/resumos/arquivo_pdf_anais/resumo_expandido_morang_o_ii_corrigeo.pdf)>. Acesso em: 16/04/2017
- CALDAS, L. S.; et al. **Meios Nutritivos**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ, 1998. v.1 p.87-132.
- CALVETE, E. O.; **Desempenho *in vitro* e agrônômico de cultivares micropropagadas de morangueiro em vários subcultivos**. Revista Brasileira de Fruticultura, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-29452009000400005](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452009000400005)>. Acesso em 15/04/2017.
- CASTRO, H. G. de; et al. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. Visconde do Rio Branco:Suprema, 2001. 104 p
- DODE, L. B. et al. . ***In vitro* propagation of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae)**. Acta Scientiarum. Biological Sciences. Maringa v25, no.2, p. 435-437.2003
- FERREIRA, B. F. Sisvar - sistema de análise de variância. 2006.
- FRANÇA, S. de C. **Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas**. In: SIMÕES, C.M.O. (coord.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora. da UFSC. p.123- 146. 2004
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. et al. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPQ, 1998. V.1, p.99-169.
- GERMER, S. P. M. **Extração do óleo essencial de cravo-da-índia em leito fixo com dióxido de carbono líquido subcrítico**. 1989. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas,Campinas, 1989.
- HANDA, L.; Cultura *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aa/v35n1/v35n1a04.pdf>>. Acesso em 26/04/2017
- HARBONE, J. B. Chemical signals in the ecosystem. Annals of Botany, v.60, n.4, p.39-57,2004. (Supplement)

Instituto Agronômico de Campinas (IAC), **O manjeriço** - Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Horticultura, 2000. Revista eletrônica disponível em:  
[http://www.iac.sp.gov.br/imagem\\_informacoestecnologicas/40.pdf](http://www.iac.sp.gov.br/imagem_informacoestecnologicas/40.pdf) Acesso em: 28/04/2017

LEDO, A.S. et al. **Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de cultivo *in vitro***. Ciência e Agrotecnologia, v.5, n.4, p.989-993, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. 3.ed. Fortaleza: UFC. 1998. 220 p.

MONFORT, L. E. F. et al. **Efeito do BAP no cultivo *in vitro* de *Ocimum selloi* Benth.** Ver. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.14, n.3, p.458-463,2012. Universidade Federal de Lavras.

MONFORT, L. E. F. **Crescimento e produção de constituintes voláteis de *Ocimum basilicum* e *Mentha arvensis* por cultura de tecidos**. Lavras: UFLA, 2013. 131p.:Il.

OLIVEIRA, J. A.R. de. **Multiplificação *in vitro* e estaquia de *Physalis angulata* L.** Universidade de Cruz Alta. Mestrado Profissional em Desenvolvimento. Cruz Alta- Rs, 2014.

PATON, A. **A synopsis of *Ocimum* L. (Labiatae) in Africa**. Kew Bul. v. 47, p. 403-435,1992.

PAVIANI, L. C. **Extração com CO<sub>2</sub> a altas pressões e fracionamento do óleo essencial de capim-limão utilizando peneiras moleculares**. 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim, RS.

RABELO, M.; et al. **Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae)**. Brazilian Journal Medical and Biological Research, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 521-524, May/Dec. 2003

RIBEIRO, F. M. et al. **Influência de Diferentes Concentrações de Sais de MS e Açúcares no Cultivo *In Vitro* de Manjeriço Roxo (*Ocimum basilicum* L.)**. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 57-59, jul. 2007.

ROSADO, L. D. S. et al. **ASPECTOS DO CULTIVO IN VITRO DO MANJERICÃO CV. MARIA BONITA (*Ocimum basilicum* L.)** Plant Cell Cult. Micropropag., Lavras, v.5, n.2, p. 71-78, 2009.

ROSADO, L. D. S. et al. **AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANA E BAP NO DESENVOLVIMENTO IN VITRO DO MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.)**. Hortic. bras., v. 26, n. 2 (Suplemento - CD Rom), jul-ago. 2008.

SHARP, W.R. et al. **Plant cell and tissue culture: principles and applications**. Columbus: The Ohio State University, 1979. 892p.

SILVA, J.M.O.D. da. **Cultura de embriões imaturos e organogênese**. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v. 4, n. 20, p. 44-48, 2001.

SIMON, J. E.; et al.. **Basil: a source of essential oils**. In: JANICK, J.; SIMON, J. E. (Ed.). *Advances in new crops*. Portland: Timber, 1990. p. 484-489.

TAVARES, E.S. **Estudos preliminares da cultura de tecidos de manjeriço**. Monografia de Conclusão de Curso em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.2001.

ULISSES. C. et al. **Clonagem Vegetal**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, vol. 7, p.86-91, 2010.

VERLET, N. **Essential oils: supply, demand and price determination**. Acta Horticulture, Bélgica, n. 344, p. 9-16, 1993.