

UFFS- UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-LICENCIATURA

ANA CRISTINA MARTINS VAZ

**ASSEPSIA DE SEMENTES DE *OCIMUM BASILICUM* L. (MANJERICÃO-ROXO) E
INTRODUÇÃO *IN VITRO* DO CULTIVAR**

LARANJEIRAS DO SUL

2023

ANA CRISTINA MARTINS VAZ

**ASSEPSIA DE SEMENTES DE *OCIMUM BASILICUM* L. (MANJERICÃO-ROXO) E
INTRODUÇÃO *IN VITRO* DO CULTIVAR**

Trabalho apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientador: Dr. Roberson Dibax

LARANJEIRAS DO SUL

2023

ANA CRISTINA MARTINS VAZ

ASSEPSIA DE SEMENTES DE *Ocimum basilicum* L. (MANJERICÃO-ROXO) E INTRODUÇÃO IN VITRO DO CULTIVAR

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para a obtenção do grau de Licenciado(a) em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Fronteira Sul - *Campus* Laranjeiras do Sul.

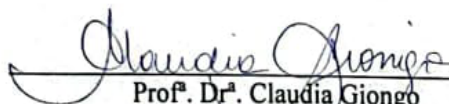
Orientador: Roberson Dibax

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 28/06/2023

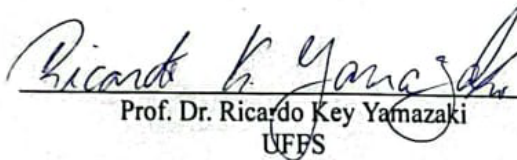
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Roberson Dibax
Orientador – UFFS



Prof.ª Dr.ª Claudia Giongo
UFFS



Prof. Dr. Ricardo Key Yamazaki
UFFS

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Vaz, Ana Cristina Martins

Assepsia de sementes de *Ocimum basilicum* L.
(manjerição-roxo) e introdução in vitro do cultivar /
Ana Cristina Martins Vaz. -- 2023.

15 f.

Orientador: Doutor Roberson Dibax

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Licenciatura em Ciências Biológicas, Laranjeiras do
Sul, PR, 2023.

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

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Rosana por ser o meu maior apoio e inspiração, pelo carinho e compreensão, aos meus irmãos Jakeline, Juliana e Jeferson por toda a ajuda e incentivo, principalmente nos momentos em que pensei em desistir, e a e meu pai Antônio.

Aos meus amigos por sempre estarem ao meu lado durante a realização desse trabalho e que mesmo de longe em alguns casos, sempre me apoiaram nos momentos de dificuldade.

Ao professor Roberson Dibax, pela orientação durante a realização desse trabalho, por todo o conhecimento compartilhado e apoio durante esse período.

Aos professores da Universidade Federal da Fronteira Sul, principalmente aos do curso de Ciências Biológicas pela paciência, conselhos e conhecimentos repassados, que auxiliaram muito no meu processo de aprendizagem.

E a todos que convivi durante a realização do curso, que participaram diretamente ou indiretamente da minha trajetória e que de alguma maneira impactaram na minha caminhada nessa instituição.

PROJETO ESCOLA: PRÁTICAS DE BIOTECNOLOGIA PARA ALUNOS NO ENSINO FUNDAMENTAL E MÉDIO

A biotecnologia vegetal é uma ferramenta que possui utilização e aplicabilidade de maneira diversa, podendo ser tanto no desenvolvimento sustentável como na obtenção de matéria prima utilizada em segmentos industriais e alimentícios, influenciando também na economia do país. A biotecnologia está cada vez mais presente nas discussões atuais, devido ao seu potencial de alterações genéticas, mudanças na natureza geradas e questões éticas que vão ao encontro aos princípios presentes na LDB para o processo formativo de alunos do ensino médio como podemos observar na: “compreensão dos fundamentos científicos e tecnológicos presentes na sociedade contemporânea, relacionando a teoria com a prática.”

O projeto escola desenvolvido na Universidade Federal da Fronteira Sul onde atuo como integrante, é um trabalho que surgiu de uma necessidade sinalizada principalmente pelas escolas do município de Laranjeiras do Sul, de transmitir aos alunos alguns princípios de Biotecnologia, da Cultura de Tecidos Vegetais e também de um primeiro contato com processos científicos, que até então seriam possíveis apenas ao adentrar em instituições de ensino superior.

Esse projeto já atendeu cerca de 100 alunos da rede estadual de ensino desde os anos finais do ensino fundamental ao ensino médio, através de visitas a instituição e eventos como o UFFS de portas abertas. As atividades realizadas foram desde uma introdução expositiva realizada pelos alunos através de apresentações teóricas, relatando quais são as principais aplicabilidades e técnicas utilizadas, seguido de uma demonstração prática dos processos utilizados na micropropagação, desde a realização do meio de cultura, processos de semeadura tanto em placa de Petri como em tubos de ensaio, e uma exposição das plantas de estudos dessa área presentes nas câmaras de germinação do laboratório didático da instituição.

Para o processo formativo do professor esse primeiro contato com os alunos, proporcionado por essas atividades é muito enriquecido, pois coloca-se em prática os conhecimentos teóricos adquiridos na formação de um licenciado, além de haver um enriquecimento do conhecimento dos alunos há uma troca com quem está realizando a aula, gerando um ganho de experiência para o futuro profissional.

SUMÁRIO

Resumo.....	7
INTRODUÇÃO.....	8
METODOLOGIA.....	9
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
CONCLUSÃO.....	12
Referências	13

Assepsia de sementes de *Ocimum basilicum* L. (manjerição-roxo) e introdução *in vitro* do cultivar

Seed asepsis of *Ocimum basilicum* L. (purple basil) and *in vitro* introduction of the cultivar

Asepsia de semillas de *Ocimum basilicum* L. (albahaca morada) e introducción *in vitro* del cultivar

Ana Cristina Martins Vaz

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-3363-7529>

Universidade Federal da Fronteira Sul, Brasil

E-mail: anacristina.m.vaz@gmail.com

Roberson Dibax

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-3665-9077>

Universidade Federal da Fronteira Sul, Brasil

E-mail: roberson.dibax@uffs.edu.br

Resumo

Ocimum basilicum L. (Lamiaceae) o manjerição,   uma planta aromática com grande importância, usada em diversos segmentos devido seu óleo essencial, teor de linalol e antocianina. Na Biotecnologia, a cultura de células e tecidos vegetais utilizado na micropropagação, é importante para o melhoramento genético dessa espécie. A pesquisa objetivou o estabelecimento de um protocolo de micropropagação *in vitro* para o manjerição-roxo, as sementes foram imersas em pré-tratamento de álcool 70% durante 3 minutos, após foram utilizadas as concentrações de hipoclorito de sódio de 1%, 2%, 4% e 6% durante 20 minutos, e água destilada para tratamento controle, para determinação da influência na taxa de germinação e contaminação. A introdução *in vitro* foi realizada com tratamento de 6% de hipoclorito de sódio. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os valores de contaminação não foram significativos, pois sua ocorrência foi restrita ao tratamento controle (66,6%). Para a variável de sementes germinadas o teste de comparação de m dias demonstrou que a maior taxa ocorreu no tratamento controle (89,67%), porém devido a contaminação este tratamento não é indicado. O melhor tratamento para a desinfecção das sementes foi a concentração de 6% de hipoclorito de sódio, onde 28,17% das sementes germinaram após 28 dias, as demais concentrações não apresentaram diferenç  estatística entre si, apresentando a maior média de 5,67%. Na introdução *in vitro* a taxa de germinação foi de 65,71% sem contaminações, com altura média de 4,3 cm (porç o a rea) e 2 cm (raiz).

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*, micropropagação de plantas, plantas medicinais.

Abstract

Ocimum basilicum L. (Lamiaceae) the basil, is an aromatic plant with great importance, used in several segments due to its essential oil, linalool and anthocyanin content. In biotechnology, the culture of cells and plant tissue used in micropropagation is important for the genetic improvement of this species. The research aimed to establish an *in vitro* micropropagation protocol for purple basil, the seeds were immersed in 70% alcohol pre-treatment for 3 minutes, then sodium hypochlorite concentrations of 1%, 2%, 4% and 6% were used for 20 minutes, and distilled water for control treatment, to determine the influence on germination rate and contamination. *In vitro* introduction was performed with 6% sodium hypochlorite treatment. For

statistical analysis, Tukey's test was used at 5% probability level. The contamination values were not significant, since its occurrence was restricted to the control treatment (66.6%). For the germinated seeds variable the mean comparison test showed that the highest rate occurred in the control treatment (89.67%), but due to contamination this treatment is not indicated. The best treatment for the disinfection of the seeds was with a concentration of 6% of sodium hypochlorite, where 28.17% of the seeds germinated after 28 days, the other concentrations showed no statistical difference between them, presenting the highest average of 5.67%. In the *in vitro* introduction the germination rate was 65.71% without contamination, with an average height of 4.3 cm (aerial portion) and 2 cm (root).

Keywords: *in vitro* culture, medicinal plants, plant micropropagation.

Resumen

Ocimum basilicum L. (Lamiaceae) la albahaca, es una planta aromática de gran importancia, utilizada en varios segmentos debido a su contenido de aceite esencial, linalol y antocianinas. En biotecnología, el cultivo de células y tejidos vegetales utilizados en micropropagación es importante para el mejoramiento genético de esta especie. La investigación tuvo como objetivo establecer un protocolo de micropropagación *in vitro* para la albahaca morada, las semillas se sumergieron en pretratamiento de alcohol al 70% durante 3 minutos, luego se utilizaron concentraciones de hipoclorito de sodio de 1% 2% 4% y 6% durante 20 minutos, y agua destilada para el tratamiento de control, para determinar la influencia en la tasa de germinación y contaminación. La introducción *in vitro* se realizó con un tratamiento de hipoclorito de sodio al 6%. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de probabilidad del 5%. Los valores de contaminación no fueron significativos, pues su ocurrencia se restringió al tratamiento control (66,6%). Para la variable semillas germinadas, la prueba de comparación de medias mostró que la tasa más alta se produjo en el tratamiento de control (89,67%), pero debido a la contaminación este tratamiento no está indicado. El mejor tratamiento para la desinfección de las semillas fue con la concentración de 6% de hipoclorito de sodio, donde 28,17% de las semillas germinaron después de 28 días. Las demás concentraciones no presentaron diferencia estadística entre sí, presentando la media más alta de 5,67%. En la introducción *in vitro* el porcentaje de germinación fue del 65,71% sin contaminación, con una altura media de 4,3 cm (parte aérea) y 2 cm (raíz).

Palabras clave: cultivo *in vitro*, micropropagación vegetal, plantas medicinales.

1. INTRODUÇÃO

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), pertencente à família Lamiaceae é uma planta aromática, com quantidades significativas de óleos essenciais, com uso popular medicinal passado de geração para geração desde tempos antigos, como o uso na fitoterapia para tratamentos de infecções bacterianas, problemas nas vias respiratórias e para melhorar a digestão de alimentos (DE FARIAS RIBEIRO, *et al.*, 2007); (VIEIRA *et al.*, 2012). É uma planta de porte herbáceo, originária do Sudoeste Asiático e por conta das propriedades do seu óleo essencial representa grande importância nos segmentos industriais, alimentício, cosmético e farmacêutico (VELOSO, *et al.*, 2014). Esta espécie também apresenta alta valorização internacional, devido ao teor de linalol presente em seu óleo essencial (BLANK, *et al.*, 2004).

O Manjeriço-roxo possui como característica marcante a presença da coloração roxa, devido a impregnação da antocianina na camada epidérmica das células de suas flores, caule e principalmente em suas folhas, sendo dessa forma uma fonte rica em antocianinas totais, podendo ser utilizado para fins medicinais e alimentícios (PHIPPEN, SIMON., 1998).

A propagação da espécie pode ser realizada de forma sexuada ou assexuada, sendo a primeira normalmente a mais utilizada (SILVA, *et al.*, 2012); (BARBOSA.,2015), esta tem limitações pelo tamanho diminuto das sementes e germinação desuniforme, sendo uma alternativa o uso de mudas (BLANK, *et al.*, 2014). A propagação vegetativa é uma alternativa que vem sendo amplamente utilizada no melhoramento de espécies de importância econômica, como o manjericão (EHLERT *et al.*, 2004).

Aplicações da Biotecnologia estão cada vez mais difundidas, isso se dá pelo seu caráter multidisciplinar, e possibilidades de estudo e aplicabilidade em diversas áreas, como alimentação, agricultura e preservação de biodiversidade (MARTINS & DE CARVALHO, 2012). Dentre as áreas de aplicação está a cultura de células e tecidos vegetais, técnica utilizada para a micropropagação, uma alternativa para reprodução comercial de dada espécie, como por exemplo cultivares medicinais, para uso em indústria farmacêutica (MORAIS, *et al.*, 2012). Estudos anteriores têm investigado a transformação genética e expressão gênica no contexto da biossíntese de óleos essenciais no *Ocimum basilicum* L. Além disso o emprego da tecnologia CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) tem sido empregada com o intuito de obter plantas de manjericão com modificações específicas em seu genoma (NAVET & TIAN,2020).

Para se definir um protocolo de micropropagação para determinada espécie, primeiramente é necessário estabelecê-la *in vitro*, onde entre os fatores envolvidos é necessário observar a qualidade de explantes ou de sementes a serem utilizadas, o meio de cultura, contaminação, reguladores, concentração de sacarose, iluminação, entre outros (ZHANG, *et al.*, 2003); (HARTMANN & KESTER.,2011); (REBOUÇAS., 2009). A partir dessas técnicas é possível a obtenção de mudas de qualidade, contribuindo também para a preservação e propagação de espécies vegetais (ASSIS, *et al.*, 2012).

A assepsia de sementes é uma medida considerada simples, barata e de fácil realização e que apresenta grande eficácia no controle de patógenos que podem interferir negativamente no desenvolvimento da plântula. Para o cultivo pode-se extrair partes da planta e colocá-las em meio nutritivo e asséptico, permitindo a produção e desenvolvimento de plantas isentas de contaminantes (PINHEIRO, *et al.*, 2016). Dentre os produtos, o hipoclorito de sódio (NaClO) é comumente mais utilizado na assepsia com diferentes concentrações e períodos, visando uma desinfecção superficial do material vegetal e ambiente para controle de agentes contaminantes (COUTINHO, *et al.*,2000).

O *Ocimum basilicum* L. tem sido de crescente interesse para diversas áreas como por exemplo de indústrias, podendo destacar entre elas os cosméticos, fármacos, produtos alimentícios e perfumarias, um dos fatores para essa procura é principalmente por conta do seu óleo essencial. O experimento e pesquisa desenvolvidos vêm ao encontro de uma necessidade para novos estudos na área de melhoramento de plantas, podendo servir como auxílio para novos trabalhos a serem realizados nesse campo.

O trabalho teve como objetivo o estabelecimento de um protocolo de assepsia de sementes e introdução *in vitro* para de manjericão-roxo mediante o estudo da influência do uso de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio para desinfecção das sementes, e sua influência na taxa de germinação e contaminação.

2. METODOLOGIA

Local e realização do experimento

O estudo foi desenvolvido no período entre abril e junho de 2023, nos laboratórios didáticos da Universidade Federal da Fronteira Sul, localizados no campus Laranjeiras do Sul-PR. As sementes de manjericão-roxo *Ocimum basilicum* L. (nome

popular: Alfavaca Basilicão Vermelho) utilizadas no experimento foram da empresa Isla Multi®, responsável pela comercialização das mesmas, os cartões de sementes foram dos lotes: 151060-001, safra 19/19 e 155119-001 safra 19/19.

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 $\mu\text{mol/m/s}$, fotoperíodo de 16h e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. As sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) acrescido de 20g/l de sacarose, 100 mg.l de mio-inositol a 8 g/l e 8g/l de ágar. Foram utilizadas placas de Petri de 6,5 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura, contendo 15 ml de meio de cultura e vedadas com filme PVC para a realização da etapa de assepsia e tubos de ensaio com 10 ml de meio de cultura vedados com papel alumínio e filme PVC para a introdução *in vitro*. Todos os meios de cultura tiveram o pH ajustado em 5,8 e foram autoclavados durante 20 min a 120°C . Os meios foram vertidos nas placas e colocados sob temperatura ambiente durante uma semana, para garantir que não desenvolveriam contaminações.

Para a desinfestação das sementes comerciais Isla Multi®, primeiramente foram separadas em 5 grupos, onde a testemunha foi imersa em água destilada, e nos demais tratamentos foi realizado um pré-tratamento em álcool 70% durante 3 minutos e em seguida um tratamento com Hipoclorito durante 20 minutos e triplo enxágue com água destilada esterilizada em autoclave. Toda a manipulação do experimento foi realizada em câmara de fluxo laminar horizontal.

Os tratamentos de desinfestação comparados foram os seguintes:

T1. Controle- Água destilada (sem álcool 70% e hipoclorito de sódio),

T2. 1 % de hipoclorito de sódio,

T3. 2 % de hipoclorito de sódio,

T4. 4 % de hipoclorito de sódio

T5. 6 % de hipoclorito de sódio

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos de 5 repetições com 6 sementes por unidade experimental. Após 28 dias de cultivo foram realizadas as avaliações de acordo com as seguintes variáveis: porcentagem de germinação e contaminações fúngicas e bacterianas.

Para as análises estatísticas foi utilizado o software SISVAR® desenvolvido por Ferreira (2006). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Introdução *in vitro*

Na introdução *in vitro* foram utilizados 70 tubos de ensaio de 1,5 cm de diâmetro e 15 cm de altura. O meio de cultura e as condições de crescimento foram as mesmas descritas anteriormente. A desinfestação das sementes foi realizada por imersão em álcool 70% durante 3 minutos, após utilizou-se o tratamento de 6% de hipoclorito de sódio em todas as sementes, durante o período de 20 minutos, seguido de um triplo enxágue em água destilada autoclavada. Em seguida, foi isolada 1 semente por tubo de ensaio e incubadas. Após 28 dias foram analisadas as variáveis de taxa de germinação e contaminação e realizada uma medição do tamanho médio da raiz e parte aérea das plântulas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o resultado da análise de variância (ANOVA), não foi observada interação significativa para a porcentagem de contaminação. Em todos os tratamentos comparados não foram observadas contaminações exceto no tratamento controle. Em decorrência disso não foi possível analisar estatisticamente essa variável. A porcentagem de contaminação observada no tratamento controle foi de 66,6%. Um dos maiores desafios e também um fator determinante para o estabelecimento de um protocolo de micropropagação está na adequação de uma metodologia para a etapa de assepsia, para a obtenção de um explante saudável e sem contaminações bacterianas e fúngicas para estabelecimento *in vitro*, da espécie, além da dificuldade no controle de micro-organismos endofíticos (ZIGIOTTO, 2007); (LATTUADA, *et al.*, 2019).

Para a variável de sementes germinadas, a análise de variância demonstrou interação significativa para essa variável e o teste de comparação de médias ao nível de significância de 0,05 % demonstrou diferenças estatísticas entre os tratamentos comparados, a maior porcentagem de germinação foi observada no tratamento controle onde 89,67% das sementes germinaram, porém devido a contaminação este tratamento não é indicado.

O melhor tratamento para a desinfecção das sementes foi observado utilizando a concentração de 6% de hipoclorito de sódio, onde 28,17% das sementes germinaram após 28 dias. As demais concentrações não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram a maior taxa de germinação representada pela porcentagem de 5,67% (Figura 1). Resultados diferentes foram observados no estudo de Birck (2017), onde foram realizadas desinfecções por hipoclorito de sódio nas concentrações de 0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10%, semeado em meio MS, obteve resultados de taxa de germinação positivas para o tratamento de 2,5% sendo este o mais eficaz para a espécie de *Ocimum basilicum* L. com uma taxa de 25 %, e o menor índice foi observado no tratamento controle, sem concentração de NaClO. Já no estudo de Arruda *et al.* (2012) com a realização da assepsia com hipoclorito de sódio nas concentrações de 1% a 10% foi observado que não houve diferenças significativas para variável de germinação do manjeriço.

A taxa de germinação para os tratamentos de assepsia observados no estudo, foram baixas nos tratamentos de 1%, 2% e 4%, entre os possíveis fatores podemos citar estudos recentes que apontam uma baixa taxa de germinação *in vitro* para membros da família Lamiaceae, como foi observado no estudo do alecrim, que obteve 0,67% de germinação (COSTA & DROSTE, 2010). Porém tanto a germinação quanto o desenvolvimento do embrião dependem de fatores ambientais e endógenos da semente, como por exemplo a variação da umidade, onde sementes da família Lamiaceae são classificadas como ortodoxas, isto é, podem ser armazenadas sob condições de baixa umidade, por conta disso sua durabilidade tende a ser maior em condição de armazenagem (MOROZESK *et al.*, 2014).

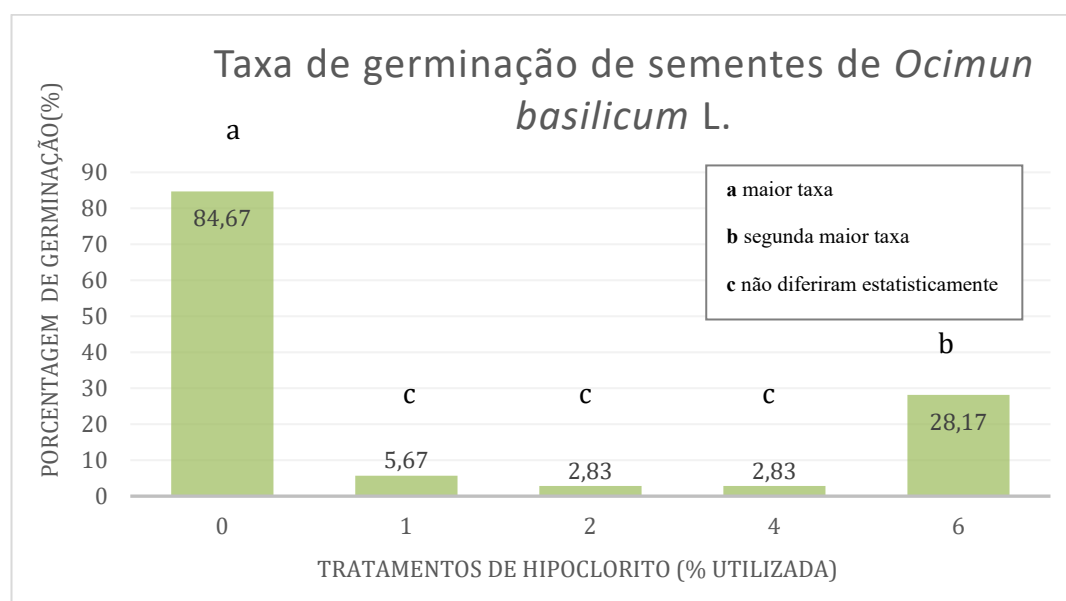
De acordo com Silva *et al.* 2011 a embalagem de polietileno, como a hermética aluminizada que armazenava as sementes de *Ocimum basilicum* desse presente estudo, interferem na interação com o meio externo dificultando trocas gasosas, e quando colocada sob alta temperatura aumenta a liberação de água, aumentando a umidade da embalagem e levando a deterioração da semente. Dessa forma é imprescindível o armazenamento correto das sementes, sem exposição a temperaturas elevadas e a umidade, que irão influenciar diretamente na redução do potencial fisiológico e consequentemente na germinação (GRAHAM, 2008).

O protocolo de assepsia com hipoclorito de sódio (NaClO) tende a ser variável, sendo considerados aspectos tais como a espécie a ser estudada e característica fisiológicas da semente. Na pesquisa de Barberini *et al.* (2023) as sementes de *Ocimum basilicum* L. foram embebidas por 20 minutos na concentração de 2,5 % de NaClO, seguido de um triplo enxágue com água esterilizada e colocadas para germinação em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 8g/L de ágar, por duas semanas. A concentração é similar ao estudo de Ekmekci & Aasim (2014) onde as sementes foram imersas em concentração de 2,5 % de hipoclorito de sódio durante 10 minutos, posteriormente lavadas em água destilada estéril durante 3x5 minutos, e cultivadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) com 3,0 % de sacarose e 0,65%

de ágar por 14 dias. Ou também em concentrações maiores como no estudo de Oliveira 2020, onde foi utilizada uma concentração de 30% de hipoclorito de sódio por 20 minutos. Porém, podemos observar também o uso de diferentes produtos para a esterilização de materiais vegetais a serem estabelecidos *in vitro*, como vemos no estudo de Gopi *et al.* 2016 em que há a utilização do cloreto de mercúrio a 0,1% durante 5 minutos seguido de um triplo enxágue em água esterilizada. Cada espécie responde de uma maneira, para os diferentes tratamentos de assepsia, podendo ocorrer tanto a inibição ou indução para a germinação.

Na etapa de introdução *in vitro*, das 70 amostras foram observadas 46 sementes germinadas e 24 não germinadas, representando uma taxa de 65,71% germinadas e 34,29% de não germinadas respectivamente. A altura média das plântulas germinadas observada foi de 4,3 cm na parte aérea e 2 cm na porção radicular. Nos tubos de ensaio, não foram observadas contaminações fúngicas e bacterianas. Na pesquisa realizada por Sousa *et al.* 2019, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (25mm x 125mm) contendo 10 ml de meio de cultura, com testagem de diferentes meios MS (MS = concentração total, MS/2 = meia força e MS/4 = um quarto da força total) e concentrações de sacarose, que não apresentaram diferença significativa para a germinação, porém para o desenvolvimento inicial da planta as concentrações de sacarose e MS foram significativas, sendo com o valor de 30g e o MS força total os fatores que influenciaram a formação de plântulas de maior altura.

Figura 2: Resultado da porcentagem de germinação das sementes de *Ocimum basilicum* L. após o tratamento de assepsia e diferentes concentrações de hipoclorito de sódio após 28 dias.



Fonte: Elaborado pelos autores.

4. CONCLUSÃO

O tratamento de hipoclorito de sódio em todas as concentrações estudadas foram efetivas para a não ocorrência de contaminações, tanto por fungos quanto por bactérias. Porém a taxa de germinação foi diferenciada entre os tratamentos comparados;

O tratamento controle apresentou a maior taxa de germinação, porém devido a contaminação esse tratamento não é indicado. O tratamento de 6% de hipoclorito de sódio demonstrou a maior taxa de germinação entre os demais tratamentos,

utilizados nessa pesquisa, demonstrando possuir a maior taxa de resposta para a germinação de sementes de *Ocimum basilicum* L. Porém a taxa geral de germinação observada em todos os tratamentos com hipoclorito de sódio (NaClO) foram baixas.

Este trabalho poderá servir de base para o desenvolvimento de um protocolo completo de micropropagação de manjeriço-roxo, e com os resultados apresentados há a possibilidade da continuidade de estudos para o cultivo *in vitro* de *Ocimum basilicum*, L. tanto quanto também para a realização de novas pesquisas.

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.
- ASSIS, K.C de., PEREIRA, F.D., CABRAL, J.S.R., SILVA, F.G., SILVA, J.W., & SANTOS, S.C. In vitro cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: effects of salt concentration and culture medium volume. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 34, p. 77-83, 2012.
- BARBERINI, S., FORTI, C., LAURA, M., CIORBA, R., MASCARELLO, C., GIOVANNINI, A., RUFFONI, B., & SAVONA, M. An Optimized Protocol for In Vitro Regeneration of *Ocimum basilicum* cv. FT Italiko. **Horticulturae**, v. 9, n. 3, p. 407, 2023.
- BARBOSA, C.M. Ensaio de competição de sementes entre três cultivares de manjeriço. 2015.
- BIRCK, D. C. P. Introdução *in vitro* de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e micropropagação. 2017.
- BLANK, A. F., DE CARVALHO FILHO, J.L.S., NETO, A.L.S., ALVES, P.B., BLANK, M.de F., MANN, R.S., & MENDONÇA, M.de C. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjeriço e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 113-116, 2004.
- BLANK, A. F., BLANK, M.F. A., CARVALHO FILHO, J. L. S., SANTOS NETO, A. L., & LIMA, V.F.A. Produção de mudas de manjeriço com diferentes tipos de substratos e recipientes. 2014.
- COSTA, D.T.; DROSTE, A. Efeito da esterilização sobre o estabelecimento da cultura *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* Linn. (Lamiaceae). Pesquisas Botânica, São Leopoldo n 61, p. 315-324, 2010.
- COUTINHO, W.M.; PEREIRA, L.A.A. SILVA, O.F.; PENA, R.C.M.; MAGALHÃES, F.H.L. Efeitos de hipoclorito de sódio na germinação de conídios de alguns fungos transmitidos por semente. Revista Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 25, n. 3, p. 552555, 2000.
- DE FARIAS RIBEIRO, M., DONINI, L.P., SOUZA, J.A., GUISSO, A.P, MOURA, I.F., BOBROWSKI, V.L., & VIÉGAS, J. Influência de diferentes concentrações de sais de MS e açúcares no cultivo *in vitro* de manjeriço roxo (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 57-59, 2007.
- EHLERT, P. A. D., LUZ, J. M. Q., & INNECCO, R. Propagação vegetativa da alfavaca-cravo utilizando diferentes tipos de estacas e substratos. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 10-13, 2004.
- EKMEKCI, H., & AASIM, M. In vitro plant regeneration of Turkish Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). **JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 24, n. 6, 2014.
- GRAHAM, I.A. Seed storage oil mobilization. Annual Review of Plant Biology. v. 59, p.115-142, 2008.
- GOPI, C., SEKHAR, Y. N., & PONMURUGAN, P. In vitro multiplication of *Ocimum gratissimum* L. through direct regeneration. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 9, 2006.
- HARTMANN, H. T., KESTER, D. E., DAVIES JR., F. T., & GENEVE, R. L. (2011) Plant propagation: principles and practices. 8th ed. New Jersey: PrenticeHall, 2011. 915p.
- LATTUADA, D. S., GUASSO, L.Z., DE OLIVEIRA, K.M., SILVA, V.M., & DE SOUZA, P.V.D. Tipos de explantes para estabelecimento *in vitro* de orégano e hortelã. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 25, n. 3, p. 91-103, 2019.
- MARTINS, C.R., & DE CARVALHO, A.C.P.P. Avanços da cultura de tecidos na micropropagação de plantas. 2012.
- MORAIS, T. P., LUZ, J.M.Q., SILVA, S.M., RESENDE, R.F., & SILVA, A.S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 110-121, 2012.
- MOROZESK, M., BONOMO, M.M., DUARTE, I.D., ZANI, L.B., & CORTE, V.B. Longevidade de sementes nativas da Floresta Atlântica. Natureza on line, v. 12, n. 4, p.185-194, 2014.
- NAVET, N. & TIAN, M. Efficient targeted mutagenesis in allotetraploid sweet basil by CRISPR/Cas9. **Plant Direct**, v 4, n. 6, 2020.
- OLIVEIRA, R. C. Cultivo *in vitro* e *ex vitro* de cultivares de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). 2020.
- PHIPPEN, W. B., & SIMON, J. E. Anthocyanins in basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1734-1738, 1998.
- PINHEIRO, C. G., LAZAROTTO, M., MUNIZ, M. F. B., REDIN, C.G., & DOS SANTOS, M.V. Efeito da assepsia superficial na germinação e incidência de fungos em sementes de espécies florestais. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 87, p. 253-260, 2016.
- REBOUÇAS, F. S. Cultivo *in vitro* de Plantas Mediciniais: *Ocimum basilicum* L. *Cissus sicyoides* L. 2013.

SILVA, I. M., GUSMÃO, S.A.L., BARROS, A.C.A., GOMES, R.F., SILVA, J.P., & PEREIRA, J.K.B. Enraizamento de manjeriço em diferentes substratos e doses de cinzas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 188-191, 2012.

SILVA, K. B., ALVES, E. U., GONÇALVES, P. E., BRUNO, R.L.A., & DE FRANÇA, P.R.C. Armazenamento de sementes de *Erythrina velutina* Willd. **Revista Árvore**, v. 35, p. 809-816, 2011.

SOUSA, E. S., RÊGO, M. M., NASCIMENTO, K. S., GUEDES, J. F. S., CARVALHO, M. G., & RÊGO, E. R. CONCENTRAÇÕES DE SAIS E SACAROSE NO DESENVOLVIMENTO DE MAJERICÃO in vitro. **Revista Craibeiras de Agroecologia**, v. 4, n. 2, 2019.

VELOSO, R. A., CASTRO, H.G., BARBOSA, L.C.A., CARDOSO, D.P., CHAGAS JÚNIOR, A.F., & SCHEIDT, G.N. Teor e composição do óleo essencial de quatro acessos e duas cultivares de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). **Revista brasileira de plantas mediciniais**, v. 16, p. 364-371, 2014.

VIEIRA, M.C., CARLESSO, A., HEREDIA ZÁRATE, N.A., GONÇALVES, W.L.F., TABALDI, L.A., MELGAREJO, E. **Consórcio de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e alface sob dois arranjos de plantas**. Rev. Bras. Pl. Med., Botuatu, v.14, n.esp., p.169-174, 2012.

ZHANG, L., TIEFENG, X., XIAOFEN, S., HANMING, T., & KEXUAN, T. Factors influencing shoot regeneration from cotyledons of tetraploid *Isatis indigotica* Fort. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 39, p. 459-462, 2003.

ZIGIOTTO, D. C. Compostos fenólicos e atividade antioxidante em *Salvia officinalis* L. micropropagada. 2007.