

**MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO
DE *Ocimum selloi* Benth, UMA PLANTA
MEDICINAL**

LUCILA ELIZABETH FRAGOSO MONFORT

2010

LUCILA ELIZABETH FRAGOSO MONFORT

**MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DE *Ocimum selloi* Benth,
UMA PLANTA MEDICINAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof, Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Monfort, Lucila Elizabeth Fragoso.

Micropropagação e aclimatização de *Ocimum selloi* Benth, uma
planta medicinal / Lucila Elizabeth Fragoso Monfort. – Lavras :
UFLA, 2010.

85 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Bibliografia.

1. Cultura de tecido. 2. Atroveran. 3. Lamiaceae. 4. Chavicol. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.88387

LUCILA ELIZABETH FRAGOSO MONFORT

**MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DE *Ocimum selloi* Benth,
UMA PLANTA MEDICINAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2010

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci UFLA

Prof. Ricardo Monteiro Corrêa IFMG/BambuÍ

Pesq. Jorge Henrique Chagas UFLA

Prof, Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre comigo, iluminando os meus caminhos.

Aos meus amados pais, Osias Monfort e Elizabeth Fragoso; minhas irmãs, Lucinda Monfort e Karla Monfort e meu noivo, Vinícius Fadul, pelo apoio incondicional, amizade e carinho. Sem o amor de vocês eu não teria conseguido.

Ao professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pela orientação, confiança e amizade.

Aos componentes da banca examinadora, Ricardo Monteiro Corrêa, Suzan Kelly Vilela Bertolucci e Jorge Henrique Chagas, pela contribuição e dedicação.

Ao pesquisador Osmar Alves Lameira, pelos ensinamentos durante a graduação, pela amizade e confiança.

A Zélia Rossi, pela ajuda e amizade no decorrer de todo o trabalho.

A todos da Pensão da D. Cidinha, em especial aos amigos Felipe Lorenzoni e Rodrigo Reis, pela amizade.

À Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, pela oportunidade da realização do Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os colegas e funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais e do Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras, pela amizade.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL	i
GENERAL ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introdução Geral.....	2
2 Referencial Teórico.....	3
2.1 Plantas medicinais.....	3
2.1.1 Óleos essenciais	4
2.2 Descrição da espécie	5
2.2.1 Caracterização química.....	6
2.3 Cultura de tecidos vegetais	6
2.3.1 Micropropagação	7
2.3.2 Meios de cultura.....	10
3 Referências Bibliográficas	11
CAPÍTULO 2: Germinação de sementes e crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de atroveran submetidas a diferentes meios de cultivo.	14
1 Resumo	15
2 Abstract.....	16
3 Introdução	17
4 Material e Métodos	18
5 Resultados e Discussão	20
5.1 Germinação <i>in vitro</i>	20
5.2 Crescimento <i>in vitro</i>	24
6 Conclusão	29

7 Referências Bibliográficas.....	29
-----------------------------------	----

CAPÍTULO 3: Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de gemas axilares de *Ocimum selloi* Benth.....

1 Resumo	33
2 Abstract.....	34
3 Introdução	35
4 Material e Métodos	37
5 Resultados e Discussão	39
6 Conclusão	53
7 Referências Bibliográficas.....	54

CAPÍTULO 4: Cultivo *in vitro* de segmento apical e nodal de *Ocimum selloi* Benth.....

1 Resumo	58
2 Abstract.....	59
3 Introdução	60
4 Material e Métodos	61
5 Resultados e Discussão	63
6 Conclusão	70
7 Referências Bibliográficas.....	70

CAPÍTULO 5: Aclimatização de plântulas micropropagadas de *Ocimum selloi* Benth.....

1 Resumo	74
2 Abstract.....	75
3 Introdução	76
4 Material e Métodos	77
5 Resultados e Discussão	79

6 Conclusão	82
7 Referências Bibliográficas.....	83
Considerações Finais.....	85

RESUMO GERAL

MONFORT, Lucila Elizabeth Fragoso. **Micropropagação e aclimatização de *Ocimum selloi* Benth, uma planta medicinal**. 2010. 85 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estabelecer o protocolo de micropropagação de *Ocimum selloi*, tendo sido realizados quatro experimentos: 1) germinação e crescimento *in vitro*; 2) estabelecimento e desenvolvimento de gemas axilares *in vitro*; 3) cultivo *in vitro* de segmento apical e nodal e 4) aclimatização de plântulas micropropagadas. No experimento de germinação, observou-se que o maior número de sementes germinadas e o maior valor do índice de velocidade de germinação ocorreram na ausência da sacarose, porém, a sacarose mostrou ser essencial para o crescimento da planta. No estabelecimento e no desenvolvimento de gemas axilares, verificou-se que o meio MS/2, acrescido de 1,5% de sacarose, proporcionou melhor estabelecimento e o meio MS/4, suplementado com 1,5% de sacarose, promoveu melhor desenvolvimento de plântulas de *Ocimum selloi*. A ausência da sacarose inviabiliza o estabelecimento e o desenvolvimento da gema. Os primeiros e os segundos segmentos tiveram desenvolvimento semelhante com relação ao segmento apical, no qual se observou menor crescimento. O aumento da concentração do BAP inibiu o crescimento da brotação e o desenvolvimento de raízes. As diferentes concentrações de BAP foram eficientes na produção de brotações. A aclimatização de plântulas de *Ocimum selloi* recomenda-se o uso do substrato comercial Plantmax[®].

¹Orientador: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA

GENERAL ABSTRACT

MONFORT, Lucila Elizabeth Fragoso. **Micropropagation and acclimatization of *Ocimum selloi* Benth, a medicinal plant**. 2010. 85 p. Dissertation (Master in Agronomy in Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.¹

The realization of this work aimed to establish the micropropagation protocol of *Ocimum selloi*, four experiments were carried out: 1) germination and growth *in vitro*, 2) establishment and development of axillary bud *in vitro*, 3) *in vitro* culture of nodal segments and shoot tip and 4) acclimatization of plantlets. The germination experiment found that the largest number of germinated seeds and the highest value of the germination velocity index occurred in the absence of sucrose, but sucrose was shown to be essential for plant growth. The establishment and development of axillary bud has revealed that the MS/2 medium supplemented with 1.5% sucrose gave better establishment, and MS/4 medium supplemented with 1.5% sucrose gave better growth of *Ocimum selloi* plantlets. The absence of sucrose the establishment and development of the plantlets it is not possible. The first and second segments have similar development with respect to the apical, where there was less developed. The increase in concentration of BAP inhibited shoots and root growth. Different concentrations of BAP were effective in shoot proliferation. The acclimatization of *Ocimum selloi* plantlets recommends the use of commercial substrate Plantmax[®].

¹ Guidance: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos, desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizada pelo homem das cavernas, até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial utilizada pelo homem moderno.

O uso de plantas como fonte de produtos naturais biologicamente ativos tem se tornado crescente, tanto nos países em desenvolvimento, onde tem papel importante como recurso terapêutico e social, como nos países desenvolvidos, nos quais a indústria utiliza grandes quantidades destas no preparo de um largo espectro de derivados, desde extratos até substâncias isoladas (Mattos & Inecco, 2002). No Brasil, estima-se um aumento de 10% a 15% ao ano no uso da fitoterapia (Ramos et al., 2005).

Ocimum selloi Benth é um subarbusto perene, nativo das regiões sul e sudeste do Brasil, conhecido popularmente como alfavaquinha, elixir-paregórico ou atroveran. A espécie tem largo uso popular como antidiarreico, antiespasmódico, anti-inflamatório e tem ação comprovada como repelente de insetos (Lorenzi & Matos, 2002).

O estragol, também denominado chavicol, é um dos componentes principais do óleo essencial do *O. selloi*. Muitos estudos já foram realizados com essa espécie, contudo, não há relatos de trabalhos nos quais tenha sido estudada a possibilidade de aumentar a concentração do estragol no óleo extraído da planta usando a cultura de tecidos de plantas.

A cultura de tecidos é uma ferramenta que possibilita esse estudo, podendo-se fazer variações na formulação do meio de cultura e verificar qual elemento químico pode influenciar na composição do óleo essencial. Além

disso, tem como vantagem a produção em larga escala, mantendo as características do óleo essencial.

Assim, são necessários estudos para aperfeiçoar a produção de óleo essencial de boa qualidade. Mas, para isso, torna-se necessária a elaboração de um protocolo de micropropagação de *atroveran*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas medicinais

Das 250.000 espécies de vegetais superiores, estima-se que de 35 a 70.000 espécies tenham sido utilizadas como medicinais por uma ou por outra civilização, em determinada época (Farnsworth & Soejarto, 1991).

As plantas produzem substâncias destinadas ao seu crescimento, a exemplo dos polissacarídeos, açúcares e proteínas, os quais são considerados compostos do metabolismo primário. Compostos especiais, também denominados de metabólitos secundários, são sintetizados por diferentes rotas metabólicas, produzindo uma imensa diversidade de estruturas químicas dentro da classe dos alcaloides, flavonoides, cumarinas, terpenoides e outras. Os metabólitos secundários exercem importantes papéis de proteção contra microrganismos, herbívoros, intempéries ambientais, além de interferirem em processos simbióticos e atração de polinizadores (Briskin, 2000).

Para a obtenção de drogas vegetais de qualidade desejável, a produção de plantas medicinais deve ser controlada, desde o plantio até a colheita (Martins et al., 1995). Na obtenção da matéria-prima, as técnicas de cultivo da espécie selecionada devem atender ao objetivo de aumentar a produção de biomassa por área, sem comprometer o valor terapêutico da planta (Castro et al., 2004).

Diversos estudos têm sido realizados, na tentativa de se obter fármacos em plantas com potencial fitoterápico, acompanhado de um significativo aumento nos investimentos em pesquisa (Mógor, 2007).

2.1.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais das plantas são misturas complexas de constituintes voláteis que conferem aromas e sabores característicos. À temperatura ambiente, os óleos essenciais apresentam-se como líquidos oleosos de alta volatilidade, o que os diferencia dos óleos fixos. De maneira geral os óleos essenciais são instáveis, especialmente na presença de luz, calor, umidade, ar e metais (Simões et al., 1999).

A composição química dos óleos essenciais é bastante complexa, incluindo especialmente terpenos e fenilpropanoides, caracterizados por diversas funções, dentre alcoóis, cetonas, aldeídos, éteres, óxidos, ésteres e lactonas. É comum encontrar óleos essenciais contendo mais de 200 constituintes, sendo um predominante e os demais aparecendo como elementos traço. Esses componentes, mesmo representando apenas traços, têm importância fundamental no aroma. É importante destacar que plantas de uma mesma espécie, quando cultivadas em diferentes partes do mundo, apresentam óleos essenciais, via de regra, com a mesma composição qualitativa, porém, diferindo nas proporções dos seus constituintes, o que certamente terá efeito sobre seu aroma (Robbers, et al., 1996).

A quantidade e a qualidade do óleo essencial encontrado na planta dependem da época do ano em que foi realizada a coleta, bem como da espécie em questão.

2.2 Descrição da espécie

O gênero *Ocimum*, pertence à família Lamiaceae, compreende 160 espécies que se distribuem amplamente no mundo, nas regiões tropicais e subtropicais. Uma grande diversidade de espécies desse gênero é encontrada no Brasil. Os óleos essenciais de várias espécies do gênero *Ocimum* são empregados nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de perfumaria (Martins et al., 1997).

O *Ocimum selloi* Benth (Figura 1) é uma espécie herbácea, perene, de até 1,20 cm de altura, que floresce durante o ano todo. Apresenta caule quadrangular característico, folhas pecioladas, opostas, ovada, com margem serrilhada, ápice acuminado e base atenuada, medindo até 5 cm de comprimento por até 2,5 cm de largura. A inflorescência é uma espiga terminal com flores roxas (Lorenzi & Matos, 2002).

O. selloi é conhecido, popularmente, como atoveran, alfavaca (Mohry, 1973), anis-do-campo, erva-doce-silvestre, alfavaca-do-mato, hortelã-brava (Marquesini, 1996) e o seu cultivo é fácil e rápido, podendo a propagação ser obtida por estaquia. Tem ação comprovada como repelente de insetos (Paula et al., 2003). Estudos etnobotânicos realizados com o *O. selloi* revelaram que esta planta é utilizada na medicina popular com várias finalidades. Por via oral, é usada como digestivo e para tratar gastrites, vômitos, tosses, bronquites e outras condições. É empregado também topicamente, para aliviar dores nas pernas (Paneesa, 1997). Além do uso medicinal, algumas espécies do gênero *Ocimum* são utilizadas também como tempero no Brasil (Teske & Trentini, 1995). É uma planta cultivada nos jardins e hortas domésticas, pela sua utilidade condimentar e medicinal.



FIGURA 1 A) Planta de *Ocimum selloi* Benth. B) Destaque da inflorescência da planta.

2.2.1 Caracterização química

Algumas espécies de *Ocimum* apresentam, como componentes principais, linalol, estragol e eugenol e, como componentes secundários, o-cimeno, cineol e cinamato de metila, entre outros (Alonso, 1998).

2.3 Cultura de tecidos vegetais

A possibilidade de crescerem células, tecidos e órgãos em um simples meio de cultura com nutrientes, semelhante à cultura de microrganismos em tubos ou placas de Petri, vem despertando o interesse de pesquisadores (Taiz & Zeiger, 2004).

De acordo com Torres et al. (1998), os primeiros trabalhos com cultura de tecido vegetal datam do início do século passado, quando Haberlandt, em

1902, tentou o cultivo, sem êxito, de células de tecidos somáticos de várias espécies de plantas em solução nutritiva.

A cultura de tecidos vegetais pode ser definida como um conjunto de técnicas utilizadas para favorecer o crescimento de um grande número de células em um ambiente estéril e controlado. Baseia-se na teoria da totipotência, segundo a qual as células têm a capacidade de regenerar organismos inteiros, idênticos à matriz doadora.

González et al. (2002) ressaltam a importância do tipo de explante utilizado e sua subsequente manipulação. Dessa forma, a micropropagação pode ser conduzida por multiplicação por meio de proliferação de gemas axilares, multiplicação mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta e multiplicação via embriogênese somática.

Quanto à fonte do explante, haverá maior sucesso se forem utilizados tecidos jovens, os quais têm maior competência organogênica. Na composição mineral do meio de cultura, os componentes decisivos são os hormônios. Finalmente, as condições ambientais influenciam notavelmente a organogênese *in vitro*, sendo a luz o fator ambiental mais relevante (Peres, 2002).

2.3.1 Micropropagação

O maior impacto da cultura de tecidos está na área de multiplicação de plantas, conhecida como micropropagação ou propagação clonal, porque os indivíduos produzidos são geneticamente idênticos. Além de proporcionar um meio de produzir cópias idênticas de uma planta, a micropropagação também proporciona meios para a obtenção de plantas isentas de doenças. Isso se deve, em parte, à descontaminação dos explantes, às condições estéreis empregadas e, principalmente, ao uso da técnica de meristemas e ápices vegetativos (Raven et al., 2001).

A micropropagação permite que uma planta de interesses desejáveis possa ser multiplicada por vários subcultivos, havendo a possibilidade de que uma nova cultivar esteja disponível mais rapidamente para uso comercial (Pasqual, 2000).

A micropropagação de uma espécie pode ser dividida em cinco etapas que são a seleção e a preparação da planta matriz, o estabelecimento, a multiplicação, o enraizamento e a aclimatização. A primeira, que compreende a seleção e a preparação da planta matriz, é aquela na qual se faz a escolha da planta que vai ser utilizada como doadora de explante. Para isso, a planta tem que ter as características desejadas e estar bem nutrida e sadia. A segunda é o estabelecimento *in vitro* de plantas, o que se inicia com a seleção dos explantes mais adequados.

Diversos explantes podem ser utilizados para iniciar a propagação *in vitro* de uma planta. Na seleção desses devem ser considerados aspectos, como o nível de diferenciação do tecido utilizado (Grattapaglia & Machado, 1998). A terceira etapa é a multiplicação da planta. Para isso se faz uso de reguladores de crescimento. A quarta etapa é o alongamento e o enraizamento da planta e, por fim, tem-se a aclimatização, que é a transferência da planta do ambiente *in vitro* para a casa de vegetação.

França et al. (1995) desenvolveram a micropropagação a partir de segmentos nodais de *Eclipta Alba* e estabeleceram um protocolo eficiente para produção em escala. Esse tipo de propagação promove o desenvolvimento de estruturas morfológicamente pré-existentes e a exposição de segmentos nodais a concentrações adequadas de reguladores de crescimento e nutrientes estimula a quebra de dormência das gemas axilares, promovendo rápida multiplicação de novas plantas.

Amaral (2007), estudando alguns fatores que influenciam a organogênese, bem como a regeneração *in vitro* de alfavaca (*Ocimum selloi*),

visando fornecer subsídios à transformação genética, analisou o efeito de concentrações de sacarose e sais no cultivo *in vitro* de segmentos caulinares nodais desta espécie. Este autor constatou que a concentração de 100% de sais do meio MS, combinada com a concentração 2% de sacarose, foi a melhor em sua propagação *in vitro*, em razão de se ter obtido brotos mais longos e com raízes grandes, resultando em maior peso do material vegetal. Estudando o efeito de concentrações de ANA e BAP e da posição dos explantes na indução de organogênese *in vitro* em segmentos caulinares internodais, o mesmo autor verificou que o primeiro, o segundo e o terceiro segmentos caulinares internodais apresentaram, em meio de cultivo complementado com 1,00 mg L⁻¹ de ANA e 0,25 mg L⁻¹ de BAP, frequências de calogênese de 60%, 50% e 60%, respectivamente. O primeiro, o segundo e o terceiro segmentos caulinares internodais apresentaram, respectivamente, frequência de organogênese de 93,33%, 73,33% e 73,33%, média de órgãos produzidos de 2,80, 1,80 e 1,80 e eficiência de organogênese de 2,60, 1,32 e 1,32, em meio de cultivo suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de ANA e 1,0 mg L⁻¹ de BAP.

Como vantagens da micropropagação citam-se a produção de plantas livres de doenças, de plantas enraizadas prontas para a plantação e crescimento e de milhares de plantas, enquanto que, por meio das técnicas convencionais, se obtêm apenas entre dezenas a centenas de plantas no mesmo período de tempo. É um bom método de multiplicar plantas que não produzam sementes ou que apenas produzam em quantidades pouco lucrativas.

Como desvantagens, ressalta-se que a micropropagação é um processo muito dispendioso e que pode ter um custo laboral superior a 70%, requerendo mão-de-obra especializada; a contaminação do explante ocasiona perda do material e há dificuldade em encontrar meio adequado para a espécie desejada.

2.3.2 Meios de cultura

Os minerais incluídos na maioria dos meios utilizados hoje foram definidos por White em 1951 e utilizados, durante anos, como meio básico para a cultura de uma grande variedade de tecidos de diferentes espécies. O meio MS de Murashige & Skoog (1962) foi desenvolvido a partir de testes de suplementação do meio de White com extratos de folha de fumo, sendo utilizado na cultura de diversas espécies (Caldas et al., 1998). O meio MS foi uma das primeiras formulações melhoradas utilizadas em cultura de tecidos de plantas, apresentando altos níveis de nitrato, potássio e amônio.

Meios de cultura são combinações de sais minerais (macro e micronutrientes), carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento. Podem ser sólidos (adicionando-se ágar ou outro agente para solidificação) ou líquidos, de acordo com o protocolo para o sistema de cultivo. Os meios nutritivos utilizados para as culturas fornecem as substâncias essenciais para o desenvolvimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão do desenvolvimento *in vitro* (Torres, 1998). A constituição do meio é baseada nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender em necessidades específicas.

Segundo Caldas et al. (1998), a sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, sendo fundamental para um ótimo crescimento do explante. Ferreira et al. (1998) ressaltam que os resultados com diferentes vitaminas parecem ser muito particulares para cada espécie e, talvez, para diferentes cultivares da mesma espécie, dependendo do tipo de explante. A tiamina destaca-se pelo efeito benéfico para a maioria das culturas. Dentre os componentes do meio de cultura, a água é utilizada em maior quantidade, razão pela qual deve apresentar ótima qualidade. Impurezas presentes na água podem vir a afetar o desenvolvimento do explante *in vitro*, portanto, deve-se destilar e deionizar a água a ser empregada no preparo do meio de cultura. Por fim, um

componente crucial para o meio nutritivo são os reguladores de crescimento (Santos, 2003).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina:** bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: Isis, 1998. p. 350-354.

AMARAL, C. L. F.; CASALI, V. W. D.; ALMEIDA, O. da S.; OTONI, W. C.; BRASILEIRO, B. P.; BRITO, A. C. Indução de organogênese em alfavaca (*Ocimum selloi* Benth) cultivados *in vitro*. **Diálogos e Ciência**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 12, p. 1-8, dez. 2007.

BRISKIN, D. Medicinal Plant and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 124, n. 2, p. 507-514, Aug. 2000.

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, 1998. v. 1, p. 87-132.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais:** metabólitos secundários. Viçosa, MG: UFV, 2004. 113 p.

FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTO, D. D. Global importance of medicinal plants. In: AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. (Ed.). **Conservation of medicinal plants**. New York: Cambridge University, 1991. p. 25-51.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v. 1. p. 21-43.

FRANÇA, S. C.; BERTONI, B. W.; PEREIRA, A. M. S. Antihepatotoxic agent in micropropagated plantlets of *Eclipta alba*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 40, n. 3, p. 297-299, Mar. 1995.

GONZÁLEZ, E. R.; ANDRADE, A. de.; BERTOLO, A. L. Transformação genética do eucalipto. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, n. 26, p. 18-22, maio/jun. 2002.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas**. Brasília: ABCTP, 1998. p. 610-612.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 254 p.

MARQUESINI, N. R. Plantas usadas como medicinais pelos índios do Pará e Santa Catarina, Sul do Brasil: família asteraceae. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14., 1996, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 1996.

MARTINS, E. R.; CASALI, V. W. D.; BARBOSA, L. C. A.; CARAZZA, F. Essential oil in the taxonomy of *ocimum selloi* Benth. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 29-32, Jan. 1997.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 1995. 220 p.

MATTOS, S. H.; INNECO, R. Idade ideal de corte da *Mentha arvensis* L. como produtora de óleo essencial e mentol para o Estado do Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 5, n. 1, p. 15-18, fev. 2002.

MÓGOR, G.; LIMA, G. P. P.; MÓGOR, A. F. Efeito de poliaminas exógenas no crescimento inicial *in vitro* e nos teores de fenóis, poliaminas e atividade da peroxidase em *Aloe vera* (L.) Burm. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 3, p. 37-47, fev. 2007.

MOHRY, L. Metil-chavicol, cis e trans-Anetol no óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 3/4, p. 401-412, jul. 1973.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A. Rivesed medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-479, July 1962.

PANEESA, S. **Plantas que curam: cheiro de mato**. São Paulo: IBRASA, 1997.

PASQUAL, M. **Propagação de plantas ornamentais**. Lavras: UFLA. 2000. 80 p.

PAULA, J. P.; GOMES-CARNEIRO, M. R.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 88, p. 253-260, Feb. 2003.

PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 25, p. 44-48, mar./abr. 2002.

RAMOS, S. J.; FERNANDES, L. A.; MARQUES, C. C. L.; SILVA, D. D.; PALMEIRA, C. M.; MARTINS, E. R. Produção de matéria seca e óleo essencial de menta sob diferentes doses de fósforo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 1, p. 9-12, jan. 2005.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHOHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Media: Williams & Wilkins, 1996. p. 1-14.

SANTOS, E. K. dos. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 415-444.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFSC, 1999. 82 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. **Compêndio de fitoterapia**. Curitiba: Herbarium, 1995. 56 p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v. 1, 509 p.

CAPÍTULO 2

GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CRESCIMENTO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS DE ATROVERAN SUBMETIDAS A DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

1 RESUMO

Ocimum selloi Benth - Lamiaceae, conhecida popularmente como atroveran e elixir-paregórico é uma espécie medicinal nativa do Brasil. Objetivou-se a germinação e o crescimento *in vitro* de plântulas de atroveran em diferentes concentrações de sacarose e do meio MS. O experimento foi em fatorial 4 x 3, sendo 4 concentrações do meio de cultura MS (0, MS, MS/2 e MS/4) e 3 concentrações de sacarose (0,0%, 1,5% e 3,0%), totalizando 12 tratamentos. Diariamente, avaliaram-se o índice de velocidade de germinação e a percentagem de germinação. Aos 30 dias, avaliaram-se a altura, a biomassa fresca e seca da parte aérea, o número e a biomassa fresca e seca de raízes. A maior porcentagem de sementes germinadas e o maior valor do índice de velocidade de germinação foram observados na ausência da sacarose. O meio MS/2, acrescido de 1,5% de sacarose, é o mais indicado para a germinação de sementes e crescimento de plântulas.

Palavras-chave: *Ocimum selloi*, Lamiaceae, MS, sacarose.

2 ABSTRACT

Ocimum selloi Benth - Lamiaceae, popularly known as atroveran and elixir-paregórico is a Brazilian medicinal plant. The goal of this work was to evaluate the germination and growth *in vitro* of atroveran plantlets in different sucrose and MS concentrations. The experiment was in factorial 4 x 3, being 4 culture medium MS concentration (0, MS, MS/2 and MS/4) and 3 concentrations of sucrose (0.0; 1.5 and 3.0%) totalizing 12 treatments. Daily was evaluated germination velocity index and seed germination percentage. After 30 days were evaluated height, fresh and dry biomass of the aerial part, number, fresh and dry biomass of roots. The higher number of germinated seeds and germination velocity index had been observed in the absence of sucrose. The MS/2 medium supplemented with 1.5% sucrose is more indicated for seeds germination and plantlet growth.

Key words: *Ocimum selloi*, Lamiaceae, MS, sucrose.

3 INTRODUÇÃO

A germinação de sementes de algumas espécies medicinais pode aumentar muito quando são utilizados métodos de cultura de tecidos, principalmente quando as sementes apresentam dormência, endosperma reduzido ou grande infestação de microrganismos (Fay, 1992).

O atoveran (*Ocimum selloi* Benth), pertencente à família Lamiaceae, é uma planta anual herbácea, nativa das regiões sudeste e sul do Brasil, também conhecida como elixir paregórico, anis e alfavaquinha (Martins, 1998). Em estudos etnobotânicos realizados com *O. selloi* constatou-se que a planta é utilizada, por via oral, na medicina popular, em distúrbios digestivos e para o tratamento de inflamações, como gastrite e bronquite (Vieira & Simon, 2000).

Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese, por meio de propriedades osmóticas (George, 1996). 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.

Mercier & Nievola (2003) consideram que a germinação de sementes *in vitro* é ótima opção para se conseguir plantas assépticas e, a partir delas, iniciar-se a cultura de explantes, como folhas e segmentos nodais, entre outras.

Segundo Souza (2007), dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação do meio com sacarose. Porém, pode ser que, ao se adicionar sacarose ao meio de cultura, consiga-se manter a plântula *in vitro* por um período de tempo maior.

Plantas micropropagadas apresentaram a mesma produtividade em fitomassa e o mesmo perfil químico das matrizes doadoras de explantes (Pereira et al., 1994). Em trabalho realizado por Nogueira et al. (2004) com murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), espécie medicinal do Cerrado, foi demonstrado que os meios de cultura mais eficientes para a germinação *in vitro* de sementes e embriões são o MS e WPM 50%, sem sacarose, apresentando 60% e 100% de germinação, respectivamente. Pereira et al. (2006), ao estudarem a germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*), constataram que concentrações de sacarose acima e 1,5% inibiram a germinação de embriões dessa espécie.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de promover a germinação e o crescimento *in vitro* de plântulas de atroveran, em diferentes concentrações de sacarose e variações do meio MS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. As sementes foram coletadas de plantas adultas de atroveran, cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da mesma instituição.

A exsicata da espécie está depositada no herbário ESAL, do Departamento de Biologia da UFLA, sob o registro nº 7474.

Para a assepsia, as sementes foram lavadas com água corrente e sabão neutro. Depois, foram imersas em solução de hipoclorito de sódio comercial, na concentração de 70%, por 15 minutos sob agitação. Após este processo, elas

foram colocadas na câmara de fluxo laminar e lavadas cinco vezes em água destilada e autoclavada.

Depois da assepsia, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio com 10 mL de meio de cultura em diferentes concentrações de sais e sacarose, sendo uma semente por tubo. O meio de cultura foi solidificado com 0,6% de ágar, tendo o pH do meio sido ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e, em seguida, autoclavado a 120°C e 1 atm, por 20 minutos. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro, sob intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, à temperatura de $26 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

O experimento foi em fatorial 4 x 3, sendo 4 as variações do meio de cultura MS (0, MS, MS/2 e MS/4) e 3 concentrações de sacarose (0,0%, 1,5% e 3,0%), totalizando 12 tratamentos. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cinco tubos por repetição.

Diariamente, avaliou-se o índice de velocidade de germinação (IVG) segundo a fórmula de Maguire (1962) e a percentagem de germinação foi calculada com base no número de plântulas normais (Brasil, 1992).

Aos 30 dias, avaliaram-se a altura da parte aérea (cm), a biomassa fresca da parte aérea (mg), a biomassa seca da parte aérea (mg), o número de raízes, a biomassa fresca de raiz (mg) e a biomassa seca de raiz (mg).

A altura da parte aérea foi determinada com o auxílio de uma régua; a medição foi feita da base da planta até a gema apical. Para a determinação da biomassa fresca, as brotações e as raízes foram mensuradas em balança de precisão, logo após a sua remoção de dentro do tubo de ensaio. Para a determinação da biomassa seca, as brotações e raízes foram colocadas em sacos de papel kraft e acondicionados em estufa de circulação forçada de ar, a 60°C , por cinco dias. Após esse período, o material vegetal foi mensurado em balança de precisão.

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA, pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando-se o software Sisvar[®], versão 5.0 (Ferreira, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Germinação *in vitro*

A interação não foi significativa para a germinação de sementes. As sementes começaram a germinar a partir do terceiro dia após a inoculação, tendo seu término no décimo nono dia. Os efeitos da sacarose foram significativos para a germinação das sementes. A maior germinação foi observada na ausência da sacarose (75%), seguida das concentrações de 3,0% e 1,5%, que não se diferenciaram entre si (Figura 1).

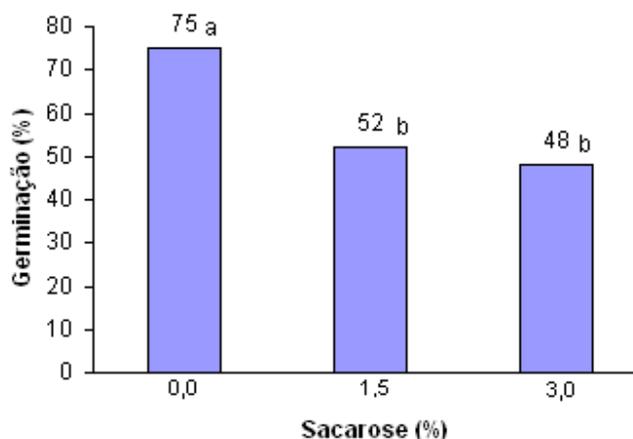


FIGURA 1 Valores médios para a porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de *Ocimum selloi* suplementadas com diferentes concentrações de sacarose. UFLA, Lavras, MG, 2010. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Segundo Premecz et al. (1978), elevadas pressões osmóticas reduzem o crescimento e afetam o metabolismo celular. Portanto, a diminuição do potencial osmótico promovido pela redução das concentrações de sacarose proporciona as maiores taxas de germinação. Em trabalho realizado por Reis et al. (2008), foi demonstrado que a concentração dos sais do meio MS e a porcentagem de sacarose influenciaram significativamente a germinação de sementes de *Melissa officinalis*.

A interação não foi significativa para o índice de velocidade de germinação. O maior IVG foi observado na ausência da sacarose (94%), seguido das concentrações de 3,0% e 1,5%, que não se diferenciaram entre si (Figura 2). Com a diminuição do potencial osmótico, devido à ausência de sacarose, as

sementes tiveram maior absorção de água, o que favoreceu a velocidade de germinação.

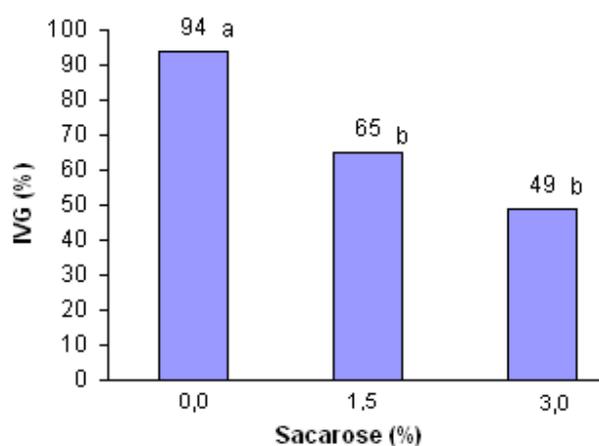


FIGURA 2 Valores médios do índice de velocidade de germinação (IVG) *in vitro* de sementes de *Ocimum selloi*, suplementada com diferentes concentrações de sacarose. UFLA, Lavras, MG, 2010. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Azevedo (2003) obteve maiores porcentagens de germinação *in vitro* em sementes de copaíba (*Copaiba langsdorffii*) em meio de cultura MS, na ausência de sacarose. Resultados semelhantes também foram obtidos em sementes de *Annona glabra* (Decchetti, 2000).

Para a concentração de sais do MS, o índice de velocidade de germinação foi maior na ausência dos sais (89%); os demais tratamentos não apresentaram diferença estatística (Figura 3). É sabido que o meio nutritivo MS

contém 14 sais na sua composição e é o mais concentrado, o que pode ter afetado a velocidade de germinação das sementes de *Ocimum selloi*, devido à pressão osmótica do meio, fato este observado nos resultados do presente trabalho.

Tanto para a germinação quanto para o IVG, os melhores resultados foram observados na ausência de sacarose e sais do meio MS, porém, para a manutenção da plântula *in vitro*, o uso do carboidrato e dos sais mostrou ser necessário no meio de cultura.

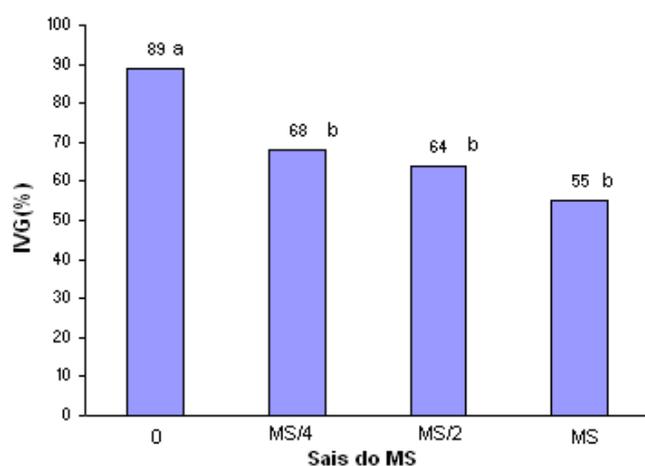


FIGURA 3 Valores médios do índice de velocidade de germinação (IVG) *in vitro* de sementes de *Ocimum selloi* em diferentes variações de sais do meio MS. UFLA, Lavras, MG, 2010. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Reis et al. (2008) observaram que o IVG foi maior para o tratamento constituído do meio MS/4, seguido do MS/2, tendo o meio MS sido o que apresentou menor IVG.

5.2 Crescimento *in vitro*

No crescimento da plântula *in vitro*, a altura da parte aérea apresentou interação significativa. Na ausência de sacarose, o meio MS e suas diluições de MS/2 e MS/4 apresentaram os melhores resultados, não havendo diferença entre esses tratamentos. Já para 1,5% de sacarose, a maior altura foi observada em MS/2 e MS/4. A concentração de 3,0% de sacarose não teve influência significativa para as variações do meio MS. Para 0 de MS, as concentrações de sacarose não apresentaram diferença significativa. No MS/4 e MS, a ausência de sacarose proporcionou melhor resposta. Já o MS/2 apresentou maior altura da plântula, tanto na ausência quanto no uso de 1,5% de sacarose (Tabela 1).

Os dados mostraram que a ausência de sacarose apresentou resultados positivos para o desenvolvimento da altura da plântula no período de trinta dias. Porém, para um maior espaço de tempo, a presença do carboidrato mostrou ser necessária para a manutenção da plântula *in vitro*. A utilização de 3,0% de sacarose apresentou efeito negativo no crescimento da plântula. Dessa forma, recomenda-se a concentração de 1,5% de sacarose.

TABELA 1 Valores médios da altura da parte aérea (cm) na interação da variação de sais do meio MS e da concentração de sacarose, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

MS	Sacarose (%)		
	0,0	1,5	3,0
0	0,43 a B	0,38 a B	0,39 a A
MS/4	1,34 a A	1,04 b A	0,69 c A
MS/2	1,14 a A	1,01 a A	0,57 b A
MS	1,12 a A	0,64 b B	0,49 b A

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna.

Reis et al. (2008) observaram que, no meio MS, as plântulas de *Melissa officinalis* apresentaram maior comprimento da parte aérea, seguido do meio MS/2, tendo no meio MS/4 o menor comprimento.

O número de raízes apresentou interação significativa. Na ausência de sacarose, o meio MS e suas diluições de MS/2 e MS/4 apresentaram os piores resultados, não havendo diferença entre esses tratamentos. O melhor desenvolvimento das raízes foi observado na ausência dos sais. O uso de 1,5% de sacarose não apresentou influência significativa com relação aos meios testados. Na utilização de 3,0% sacarose, o melhor resultado foi observado no meio MS/4, seguido dos demais meios utilizados. Os meios MS e MS/4 não sofreram influência significativa para as concentrações de sacarose testadas. A ausência de MS e de sacarose apresentou maior incremento na produção de raízes. Isso pode ter ocorrido devido ao estímulo que a plântula teve em suprir as suas necessidades nutricionais, pois quanto maior o número de raízes, mais chances de encontrar os nutrientes. Já para o MS/2, tanto a ausência quanto a

concentração de 1,5% de sacarose tiveram melhor efeito, seguidas da concentração de 3,0% de sacarose (Tabela 2).

TABELA 2 Valores médios do número de raízes na interação da variação de sais do meio MS e da concentração de sacarose, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

MS	Sacarose (%)		
	0	1,5	3
0	7 a A	4 b A	3 b B
MS/4	5 a B	5 a A	6 a A
MS/2	5 a B	6 a A	3 b B
MS	4 a B	4 a A	2 a B

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna.

Na Figura 4, observa-se que, na ausência dos sais do MS, a plântula apresentou menor biomassa fresca e seca da parte aérea. Na ausência de nutrientes, a plântula tem seu desenvolvimento comprometido, pois a reserva da semente foi apenas suficiente para o seu desenvolvimento inicial.

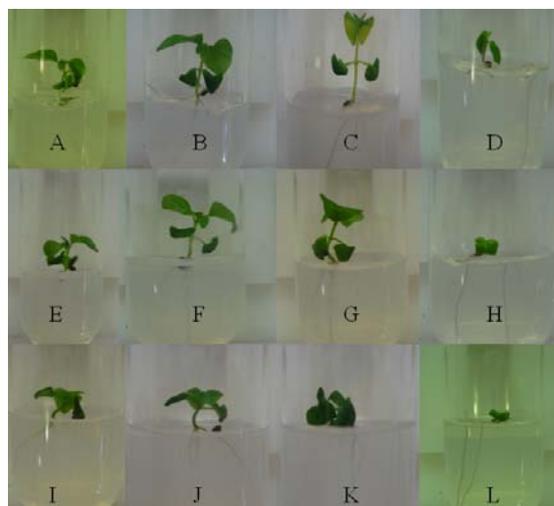


FIGURA 4 Plântulas de *Ocimum selloi* originadas de sementes germinadas *in vitro* em diferentes meios de cultivo, aos 30 dias. A) MS + 0% de sacarose. B) MS/2 + 0% de sacarose. C) MS/4 + 0% de sacarose. D) 0 MS + 0% de sacarose. E) MS + 1,5% de sacarose. F) MS/2 + 1,5% de sacarose. G) MS/4 + 1,5% de sacarose. H) 0 MS + 1,5% de sacarose. I) MS + 3% de sacarose. J) MS/2 + 3% de sacarose. K) MS/4 + 3% de sacarose. L) 0 MS + 3% de sacarose. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Para as variáveis de biomassa fresca e seca de parte aérea e de raiz, os fatores testados foram significativos apenas quando analisados separadamente.

Para a biomassa fresca e seca da parte aérea, a ausência de MS foi o pior tratamento. Os demais tratamentos não diferenciaram entre si, tendo sido esses os que apresentaram maior incremento de biomassa. Mesmo não havendo diferença entre esses tratamentos, recomenda-se o uso do MS/2, tanto pela economia de material quanto pelo tempo de manutenção da plântula *in vitro*, pois, com menores concentrações de sais, a transferência da plântula para outro

tubo com o meio de cultura será realizada em um espaço de tempo menor. Já para biomassa fresca e seca de raízes, a ausência de sais do meio MS possibilitou maior formação de raízes, sendo este o tratamento que apresentou maior valor (Tabela 3).

TABELA 3 Valores médios, biomassa fresca da parte aérea (BFPA), biomassa seca da parte aérea (BSPA), biomassa fresca de raiz (BFR) e biomassa seca de raiz (BSR), em diferentes variações de sais do meio MS, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

MS	BFPA (mg)	BSPA (mg)	BFR (mg)	BSR (mg)
0	8,0 b	1,7 b	6,0 a	0,9 a
MS/4	25,0 a	3,2 a	3,0 b	0,6 b
MS/2	26,0 a	3,1 a	3,0 b	0,6 b
MS	23,0 a	2,9 a	2,0 c	0,4 c

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna.

Para o desenvolvimento da biomassa fresca de parte aérea e de raízes, a concentração de 3,0% de sacarose foi a que apresentou pior resposta. As concentrações de 0,0% e 1,5% não diferenciaram entre si, sendo esses os tratamentos com maior incremento de biomassa fresca. Com relação à biomassa seca da parte aérea e de raízes, a melhor resposta foi observada no tratamento que utilizou 1,5% de sacarose, seguido das concentrações de 0,0% e 3,0%, que não tiveram diferença significativa (Tabela 4).

TABELA 4 Valores médios da biomassa fresca da parte aérea (BFPA), biomassa seca da parte aérea (BSPA), biomassa fresca de raiz (BFR) e biomassa seca de raiz (BSR) em diferentes concentrações de sacarose, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Sacarose (%)	BFPA (mg)	BSPA (mg)	BFR (mg)	BSR (mg)
0,0	25,0 a	2,5 b	3,5 a	0,5 b
1,5	22,0 a	3,2 a	3,8 a	0,8 a
3,0	15,0 b	2,5 b	2,8 b	0,6 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna.

6 CONCLUSÃO

A diminuição do potencial osmótico, ou seja, a ausência de sacarose induziu uma maior porcentagem de sementes germinadas e maior valor do índice de velocidade de germinação.

O meio MS/2 acrescido de 1,5% de sacarose é o mais indicado para a germinação e o crescimento de sementes de atoveran.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, K. de S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaiba langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA, 1992. 365 p.

DECCETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FAY, M. F. Conservation of rare and endangered plant using *in vitro* methods. **In Vitro Cellular and Developmental Biology:** plant. Columbia, v. 28, n. 1, p. 1-4, Jan. 1992.

FERREIRA, D. F. SISVAR: sistema de análise de variância versão 5.0. Lavras: Departamento de Ciências Exatas, 2007.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture:** the technology. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MARTINS, E. R. Estudos em *Ocimum selloi* Benth: isoenzimas, morfologia e óleo essencial. In: MING, L. C.; SCHEFFER, M. C.; CORRÊA JÚNIOR, C.; BARROS, I. B. I.; MATTOS, J. K. A. (Coord.). **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares:** avanços na pesquisa agronômica. Botucatu: UNESP, 1998. p. 97-126.

MERCIER, H.; NIEVOLA, G. B. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: BAJAJ, Y. P. S. (Org.). **Biotechnology in agriculture and forestry**, Berlin: Springer Verlag, 1997. v. 4, p. 43-57.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H. de; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, set./out. 2004.

PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, T. M. S.; COSTA, F. H. S.; PEREIRA, M. A. A. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 251-256, mar./abr. 2006.

PEREIRA, A. M. S.; MORO, J. R.; CERDEIRA, R. M. M.; FRANÇA, S. C. Micropropagation of *Maytenus aquilolia*. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal plants**, Birmingham, v. 2, n. 3, p. 11-18, July 1994.

PREMECZ, G.; RUZICKSKA, P.; OLAH, T.; FARKAS, G. L. Effect of osmotic stress on protein and nucleic acid synthesis in isolated tobacco protoplasts. **Planta**, Berlin, v. 141, n. 2, p. 33-36, Mar. 1978.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes in vitro e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Ceres**, Viçosa, MG, v. 55, n. 3, p. 160-167, 2008.

SOUZA, A. V. de; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CORRÊA, R. M.; COSTA, L. C. de B.; DYER, W. E. *In vitro* propagation of *Lychnophora pinaster* (Asteraceae): a threatened endemic medicinal plant. **Hortscience**, Alexandria, v. 42, n. 7, p. 1665-1669, Dec. 2007.

VIEIRA, R. F.; SIMON, J. E. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. **Economic Botany**, Bronx, v. 54, n. 2, p. 207-216, Apr./June 2000.

CAPÍTULO 3

ESTABELECIMIENTO E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE GEMAS AXILARES DE *Ocimum selloi* Benth.

1 RESUMO

Ocimum selloi Benth – Lamiaceae, é um subarbusto perene, nativo das regiões sul e sudeste do Brasil, conhecido popularmente como atroveran. Este trabalho foi realizado com o objetivo de estabelecer e desenvolver gemas axilares de atroveran em condições *in vitro*. Para a realização do experimento 1 foram utilizadas gemas axilares de plantas adultas de atroveran. Para o experimento 2, plântulas de atroveran estabelecidas *in vitro* serviram como doadoras de gemas axilares. Para ambos os experimentos, foram utilizados fatorial 3 x 3, sendo 3 concentrações do meio de cultura MS (MS, MS/2 e MS/4) e 3 concentrações de sacarose (0,0%, 1,5% e 3,0%). Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições. Aos 30 dias, avaliaram-se número, altura, biomassa fresca e seca das brotações e número, comprimento, biomassa fresca e seca de raízes. O uso de sacarose foi essencial para o estabelecimento e o crescimento das gemas axilares. Para o estabelecimento e o crescimento, recomenda-se a concentração de 1,5% de sacarose. O MS/2 mostrou ser o mais indicado para o estabelecimento e o MS/4, para o crescimento de gemas axilares de *O. selloi*.

Palavras-chave: Planta medicinal, cultura de tecidos, sacarose, atroveran.

2 ABSTRACT

Ocimum selloi Benth - Lamiaceae, is shrub perennial plant, native of the regions south and southeastern of Brazil, known popularly as atroveran. The aim of this work was establish and develop axillary bud of atroveran *in vitro*. To carried out the first experiment shoot tips of full grown plants were used as explants. The second experiment atroveran plantlets were used as donors explants. For both experiments were used factorial 3 x 3, being the 3 concentration of culture medium MS (MS, MS/2 and MS/4) and 3 concentrations of sucrose (0.0; 1.5 and 3.0%). Was used the completely randomized design with 5 repetitions. After 30 days were evaluated the number and height shoots, fresh and dry biomass of shoots, number and length of roots, fresh and dry biomass of roots. The sucrose is essential for the establishment and growth of axillary buds of *O. selloi in vitro*. For the establishment and growth recommend the concentration of 1.5% of sucrose. The MS/2 medium show be the most indicated for establishment and MS/4 for growth of *O. selloi* shoots.

Key words: medicinal plant, tissue culture, sucrose, atroveran.

3 INTRODUÇÃO

O gênero *Ocimum* contém cerca de 30 espécies nativas dos trópicos e subtropicais, algumas delas também encontradas em regiões temperadas (Vieira & Simon, 2000). *Ocimum selloi* Benth, conhecida popularmente como atroveran, é uma planta medicinal, herbácea nativa do Brasil, pertence à família Lamiaceae. Tem largo uso popular, como antidiarreico, antiespasmódico e anti-inflamatório (Lorenzi & Matos, 2002).

A micropropagação é a aplicação de maior impacto para a cultura de tecidos vegetais, servindo a programas de introdução, armazenamento e intercâmbio de germoplasma, contribuindo para prevenir perda de variabilidade genética. Além de rápida multiplicação, a micropropagação pode ser realizada durante o ano todo, em grande quantidade, sem problemas de sazonalidade (George et al., 2008).

Estudos da propagação *in vitro* de plantas medicinais vêm sendo realizados com o objetivo de estabelecer parâmetros aperfeiçoados para a obtenção de plantas com excelente qualidade fitossanitária, identidade genética, caracterização bioquímica e alta produção de metabólitos secundários (Murch et al., 2004).

Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. Não há uma formulação padrão, mas o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), com suas modificações e diluições, tem sido utilizado com sucesso para diversas espécies. Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese, por meio de propriedades osmóticas (George et al., 2008). Segundo Preece (1995), a diminuição de sais e reguladores de crescimento nos meios de cultura é uma

tendência mundial e muitas pesquisas estão sendo realizadas com esta finalidade.

O meio de cultura deve suprir tecidos e órgãos com nutrientes necessários ao crescimento e, basicamente, fornecendo macro e micronutrientes e um carboidrato para substituir o carbono que a planta fixa da atmosfera, pela fotossíntese. Para promover maior crescimento, normalmente, incluem-se certos componentes orgânicos, como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento (Pasqual, 2001).

A concentração de sacarose é um fator determinante no crescimento, pois, em concentrações elevadas, podem inibir a síntese de clorofila, provocando o não desenvolvimento da capacidade fotoautotrófica e, ainda, provocar crescimento reduzido e morte de mudas durante a fase de aclimatização (Caldas et al., 1990).

Em trabalho realizado por Couto et al. (2004), com multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp., observou-se efeito da concentração de sais do meio MS na multiplicação dos explantes. O maior número médio de brotações por explante foi obtido no meio MS/2, enquanto o maior comprimento médio de brotações foi no meio MS com concentração original de sais.

Nicoloso et al. (2003), comparando fontes de carbono, observaram que a sacarose, na concentração de 3,0%, foi a melhor fonte de carboidratos para a altura, número de brotações, número total de segmentos nodais por planta, de *Pfaffia glomerata*, demonstrando que esse carboidrato é o mais apropriado ao cultivo *in vitro*.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estabelecer e desenvolver gemas axilares de atroveran em condições *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Experimento 1: Estabelecimento de gemas axilares de *O. selloi* in vitro

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. Plantas adultas de *O. selloi*, do Horto de Plantas Medicinais da UFLA, serviram como doadoras de gemas axilares.

A exsicata da espécie está depositada no herbário ESAL, do Departamento de Biologia da UFLA, sob o registro nº 7474.

Os segmentos foram cortados com o auxílio de uma lâmina e lavados abundantemente com água corrente e sabão neutro. Em seguida, foram imersos em solução de hipoclorito de sódio comercial a 50% e mantidos sob agitação constante, por 15 minutos. Em seguida, os segmentos foram lavados cinco vezes em água destilada e autoclavada, sob capela de fluxo laminar.

Após a assepsia, os segmentos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS em diferentes variações dos sais, suplementado com diferentes concentrações de sacarose.

O meio de cultura foi solidificado com 0,6% de ágar, o pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e, em seguida, autoclavado a 120°C e 1 atm, por 20 minutos. Após a inoculação, os tubos foram fechados com tampas plásticas e vedados com parafilme. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro, sob intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, à temperatura de $26 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

O experimento foi em fatorial 3 x 3, sendo 3 as variações do MS (MS, MS/2 e MS/4) e 3 concentrações de sacarose (0,0%, 1,5% e 3,0%), totalizando 9 tratamentos. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo dez tubos por repetição e uma gema axilar por tubo.

Aos 30 dias, avaliaram-se número de brotações, altura das brotações (cm), biomassa fresca das brotações (mg), biomassa seca das brotações (mg), número de raiz, comprimento de raiz (cm), biomassa fresca de raiz (mg) e biomassa seca de raiz (mg).

A altura da brotação e o comprimento de raiz foram determinados com o auxílio de uma régua. Para a altura, a medição foi feita da base da brotação até a gema apical. Para a determinação da biomassa fresca, as brotações e as raízes foram mensuradas em balança de precisão, logo após a sua remoção de dentro do tubo de ensaio. Para a determinação da biomassa seca, as brotações e as raízes foram colocadas em sacos de papel kraft e acondicionadas em estufa de circulação forçada de ar, a 60°C, por 5 dias. Após esse período, o material vegetal foi mensurado em balança de precisão.

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando-se o software Sisvar[®], versão 5.0 (Ferreira, 2007).

Experimento 2: Desenvolvimento de gemas axilares de *O. selloi* *in vitro*

Plantas de atroveran estabelecidas *in vitro* serviram como doadoras de gemas axilares. Os segmentos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS em diferentes variações dos sais, suplementado com diferentes concentrações de sacarose.

O meio de cultura foi solidificado com 0,6% de ágar, o pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e, em seguida, autoclavado a 120°C e 1 atm, por 20 minutos. Após a inoculação, os tubos foram fechados com tampas plásticas e vedados com parafilme. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro sob intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a temperatura de $26 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

O experimento foi em fatorial 3 x 3, sendo 3 as variações do MS (MS, MS/2 e MS/4) e 3 concentrações de sacarose (0,0%, 1,5% e 3,0%), totalizando 9 tratamentos. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições, sendo 10 tubos por repetição e uma gema axilar por tubo.

Aos 30 dias, avaliaram-se número de brotações, altura das brotações (cm), biomassa fresca das brotações (mg), biomassa seca das brotações (mg), número de raiz, comprimento de raiz (cm), biomassa fresca de raiz (mg) e biomassa seca de raiz (mg).

A altura da brotação e o comprimento de raiz foram determinados com o auxílio de uma régua. Para a altura, a medição foi feita da base da brotação até a gema apical. Para a determinação da biomassa fresca, as brotações e as raízes foram mensuradas em balança de precisão, logo após a sua remoção de dentro do tubo de ensaio. Para a determinação da biomassa seca, as brotações e as raízes foram colocadas em sacos de papel kraft e acondicionadas em estufa de circulação forçada de ar, a 60°C, por 5 dias. Após esse período, o material vegetal foi mensurado em balança de precisão.

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando-se o software Sisvar[®], versão 5.0 (Ferreira, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1: Estabelecimento de gemas axilares de *O. selloi in vitro*

No estabelecimento *in vitro* das gemas axilares, apenas 9,87% dos tubos apresentaram contaminação por fungos. Esse resultado indica a eficiência do processo de assepsia.

A interação foi significativa para o comprimento de raízes. Para esta variável, os meios MS/4 e MS/2 não apresentaram diferença estatística na ausência de sacarose, sendo esses os melhores tratamentos. Na concentração de 1,5% de sacarose, observou-se que o meio MS/2 apresentou maior comprimento, seguido do MS/4 e MS, respectivamente. Para a concentração de 3,0% de sacarose, o MS/4 obteve melhor resultado. A maior concentração de sais do meio MS na sua composição original não estimulou o desenvolvimento das raízes em busca de nutrientes ou, até mesmo, pode ter exercido um efeito fitotóxico para o crescimento da raiz. O meio MS é considerado um meio de cultura com altas concentrações de sais. No presente estudo, constatou-se que a diminuição da concentração desses sais favoreceu o desenvolvimento das raízes. Isso também contribuiu para o custo de produção das mudas, pois a redução do uso de nutrientes na composição do meio gera economia de recursos para a micropropagação. Para MS e MS/4, o uso de 1,5% e 3,0% de sacarose apresentou as melhores respostas; já para o MS/2, observou-se que 1,5% de sacarose foi maior para o comprimento das raízes (Tabela 1).

A utilização de sacarose na composição do meio de cultura mostrou ser fundamental para o enraizamento *in vitro* de gemas axilares de *O. selloi*. Isso pode estar ocorrendo devido ao fato de o gasto energético da plântula na produção de raízes ser elevado.

TABELA 1 Valores médios do comprimento de raízes (cm) de *Ocimum selloi* na interação do meio de cultura e da concentração de sacarose, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Meio de cultura	Sacarose (%)		
	0,0	1,5	3,0
MS/4	0,10 b A	1,02 a B	1,25 a A
MS/2	0,04 c A	1,66 a A	0,85 b B
MS	0,00 b B	0,24 a C	0,48 a B

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna.

Em trabalho realizado por Dantas et al. (2000), foi demonstrado que concentrações de sais no meio MS, reduzidas a 1/2, 1/3 ou 1/4, possibilitaram melhor enraizamento *in vitro* de amoreira-preta, cultivar Caignangue.

No estabelecimento *in vitro* de gemas axilares de atroveran, a interação foi significativa para a biomassa fresca de raiz. Na ausência de sacarose, os meios MS/4 e MS/2 proporcionaram melhor resposta. Para 1,5% de sacarose, o meio mais eficiente foi o MS/4. A utilização de 3,0% de sacarose não apresentou influência significativa nas variações do meio MS. Observou-se que, para os meios MS/4 e MS/2, a concentração de 1,5% proporcionou maior biomassa fresca de raiz. Com relação ao MS, as concentrações de 1,5% e 3,0% tiveram melhor efeito, não diferenciando entre si (Tabela 2).

TABELA 2 Valores médios da biomassa fresca de raiz (mg) de *Ocimum selloi* na interação do meio de cultura e da concentração de sacarose, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Meio de cultura	Sacarose (%)		
	0,0	1,5	3,0
MS/4	0,60 b A	24,20 a A	4,64 b A
MS/2	0,05 c A	11,60 a B	2,18 b A
MS	0,00 b B	0,29 a C	1,00 a A

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna.

De acordo com Nicoloso et al. (2001), plantas de *Pfaffia glomerata* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS suplementado com 3,0% de sacarose, dentro de um período de 35 ± 5 dias após a inoculação, apresentaram excelente desenvolvimento do sistema radicular, bem como da parte aérea.

A interação foi significativa para a biomassa seca de raiz. Tanto a ausência quanto a concentração de 1,5% de sacarose induziram maior produção de biomassa seca nos meios MS/4 e MS/2. A utilização de 3,0% de sacarose não apresentou diferença significativa nas variações do meio MS. Observou-se que, para os meios MS/4 e MS, as concentrações de 1,5% e 3,0% tiveram melhor efeito, não se diferenciando entre si. Com relação ao MS/2, a concentração de 1,5% proporcionou melhor resposta (Tabela 3).

TABELA 3 Valores médios da biomassa seca de raiz (mg) de *Ocimum selloi* na interação do meio de cultura e da concentração de sacarose, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Meio de cultura	Sacarose (%)		
	0,0	1,5	3,0
MS/4	0,020 b A	0,720 a A	0,420 a A
MS/2	0,004 b A	1,100 a A	0,320 b A
MS	0,000 b B	0,038 a B	0,192 a A

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna.

O aumento da produção de biomassa da raiz para a cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) foi crescente até 4,5% de sacarose (Calvete, 1998). Já para a samambaia-espada (*Nephrolepis exaltata* L. Schott) propagada *in vitro*, o aumento de sacarose tendeu a apresentar os piores rendimentos (Guimarães et al., 1999).

Quanto às respostas em relação à variação isolada das diluições do meio MS, não houve diferença estatisticamente significativa para número, altura e biomassa fresca e seca das brotações. Para o número de raízes, o meio MS completo apresentou efeito negativo no desenvolvimento do tecido radicular (Tabela 4).

TABELA 4 Valores médios de número de brotações, altura da brotação, biomassa fresca de brotação (BFB), biomassa seca de brotação (BSB) e número de raízes de *Ocimum selloi*, nas diferentes variações de sais do meio de cultura MS, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Meio de cultura	Nº de brotações	Altura da brotação (cm)	BFB (mg)	BSB (mg)	Nº de raízes
MS/4	2,00 a	0,66 a	44,00 a	5,60 a	2,00 a
MS/2	2,00 a	0,67 a	52,00 a	7,50 a	2,00 a
MS	2,00 a	0,51 a	41,00 a	6,10 a	1,00 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Pessoa et al. (2004) verificaram que, em cultivares de samambaia (*Nephrolepis exaltata*), não houve diferença quanto ao número de brotos sob diferentes concentrações de sais do meio MS (25%, 50% e 100%).

Em amoreira-preta (*Rubus* sp.) cultivar Ébano, o número de brotos foi estimulado pelo aumento da concentração de sais do MS e maior número de brotos foi observado em meio MS com 150% dos sais (Villa et al., 2005).

Os efeitos negativos causados por concentrações maiores do meio MS, provavelmente, devem-se a uma elevação ainda maior do que a normalmente presente na composição original, tornando-se inadequada ao processo morfogênico (Pasqual et al., 2002).

A ausência de sacarose proporcionou efeito negativo para número, altura, biomassa fresca e seca da brotação e número de raízes. Para número de brotações e raízes, as concentrações de 1,5% e 3,0% de sacarose obtiveram maior incremento, não se diferenciando entre si. Para altura, biomassa fresca e seca de brotação, o melhor tratamento foi o que utilizou 1,5% de sacarose (Tabela 5).

TABELA 5 Valores médios de número de brotações, altura da brotação, biomassa fresca da brotação (BFB), biomassa seca da brotação (BSB) e número de raízes de *Ocimum selloi*, nas diferentes concentrações de sacarose, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Sacarose (%)	Nº de brotações	Altura da brotação (cm)	BFB (mg)	BSB (mg)	Nº de raízes
0,0	1,00 b	0,13 c	12,10 c	1,42 c	0,00 b
1,5	2,00 a	1,28 a	88,20 a	10,92 a	2,00 a
3,0	2,00 a	0,43 b	36,80 b	6,37 b	2,00 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Ribeiro et al. (2008), em trabalho realizado com *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng, obtiveram maior comprimento de brotos (3,42 cm) na presença de 3,0% de sacarose. Maior quantidade de massa fresca da parte aérea (0,9 g) foi observada na presença de 6,0% de sacarose e 100% dos sais do meio MS.

De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), a sacarose é a principal fonte de carbono no meio de cultura, sendo responsável pelo fornecimento de energia para o crescimento *in vitro*, a regulação do potencial hídrico e o componente utilizado em maior concentração do meio de cultura.

Nicoloso et al. (2003), compararam quatro concentrações de cinco fontes de carbono. A sacarose, nas concentrações de 3,0%, 4,5% e 6,0%, foi a melhor fonte de carboidratos quanto ao número de brotações, altura de brotações, média da altura de brotações e número total de segmentos nodais por planta de *Pfaffia glomerata*.

Na Figura 1 observam-se as gemas axilares de atroveran em diferentes meios de cultivo, na ausência e no uso de 1,5% de sacarose, demonstrando a necessidade de suplementação de sacarose para o crescimento e a diferenciação do tecido.

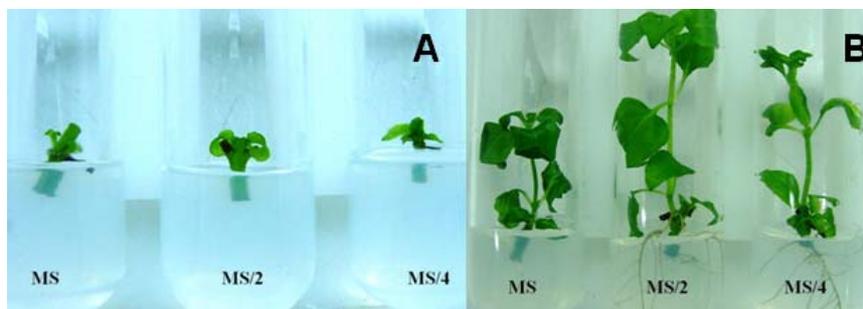


FIGURA 1 A) Gemas axilares de atroveran em diferentes meios de cultivo, na ausência de sacarose aos 30 dias. B) Gemas axilares de atroveran em diferentes meios de cultivo, suplementados com 1,5% de sacarose aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Experimento 2: Desenvolvimento de gemas axilares de *O. selloi* *in vitro*

A interação foi significativa para altura, biomassa fresca e seca das brotações, número, comprimento, biomassa fresca e seca de raízes.

Para altura da brotação, a ausência de sacarose não sofreu diferença estatística significativa para as variações do meio MS. Para a concentração de 1,5% de sacarose, o meio MS/4 mostrou ser o mais indicado, seguido do MS/2. Já para a concentração de 3,0% de sacarose, o tratamento mais eficiente foi o MS. Para todos os meios utilizados, a sacarose, na concentração de 1,5%, proporcionou efeito positivo, ao contrário da ausência de sacarose (Tabela 6).

A concentração de 1,5% sacarose favoreceu o desenvolvimento da plântula cultivada *in vitro*, mostrando que presença desse carboidrato no meio de cultivo foi essencial para o desenvolvimento da plântula micropropagada. Maiores concentrações de sacarose aumentam o efeito osmótico no meio de cultura, podendo prejudicar o desenvolvimento da plântula cultivada *in vitro*.

TABELA 6 Valores médios da altura da brotação (cm) de *Ocimum selloi* na interação do meio de cultura e da concentração de sacarose, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Meio de cultura	Sacarose (%)		
	0,0	1,5	3,0
MS/4	0,10 c A	2,80 a A	0,80 b B
MS/2	0,10 c A	2,44 a B	0,46 b B
MS	0,10 c A	1,80 a C	1,04 b A

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna.

Fráguas et al. (2003) obtiveram crescimento satisfatório de plântulas resultantes do cruzamento entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*, em meio de cultura MS contendo 2,0% de sacarose.

Na Tabela 7 observam-se os valores médios da interação para a biomassa fresca das brotações. A ausência e a concentração de 1,5% de sacarose não evidenciaram efeito significativo para as diferentes variações do meio MS. Na utilização de 3,0% de sacarose, o meio MS, na sua composição original, proporcionou melhor resposta. Para os meios MS/4 e MS/2, a sacarose, na concentração de 1,5%, mostrou ter efeito positivo para o peso. Com relação ao MS, as concentrações de 1,5% e 3,0% de sacarose não se diferenciaram entre si. A ausência de sacarose apresentou efeito negativo para o desenvolvimento da parte aérea.

TABELA 7 Valores médios da biomassa fresca da brotação (mg) de *Ocimum selloi*, na interação do meio de cultura e da concentração de sacarose, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Meio de cultura	Sacarose (%)		
	0,0	1,5	3,0
MS/4	2,38 c A	82,86 a A	24,22 b B
MS/2	2,46 c A	79,16 a A	20,08 b B
MS	1,62 b A	65,86 a A	79,08 a A

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna.

Sorace et al. (2008) constataram que o tratamento contendo 4,0% de sacarose e a metade da concentração dos macronutrientes do meio MS foi o mais eficiente para o desenvolvimento vegetativo e o enraizamento da orquídea *Oncidium baueri*.

Para biomassa seca da brotação, a ausência de sacarose não apresentou diferença significativa para as variações do meio MS. Na concentração de 1,5% de sacarose, os meios MS/2 e MS ocasionaram aumento do peso, não se diferenciando entre si. A biomassa seca produzida na concentração de 3,0% de sacarose no MS completo foi superior às diluições do MS. Para os meios MS/4 e MS/2, a sacarose na concentração de 1,5% afetou positivamente o peso. Com relação ao MS, as concentrações de 1,5% e 3,0% de sacarose não se diferenciaram entre si. A ausência de sacarose ocasionou efeito negativo para a biomassa (Tabela 8).

TABELA 8 Valores médios da biomassa seca da brotação (mg) de *Ocimum selloi*, na interação do meio de cultura e da concentração de sacarose, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Meio de cultura	Sacarose (%)		
	0,0	1,5	3,0
MS/4	0,14 c A	5,12 a B	3,22 b B
MS/2	0,10 c A	6,62 a A	3,08 b B
MS	0,08 b A	6,70 a A	7,72 a A

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna.

Dados semelhantes foram observados por Calvete et al. (2002) no cultivo de morangueiro. Na ausência de sacarose, não houve desenvolvimento da raiz *in vitro* e a concentração de 4,5% de sacarose apresentou maior enraizamento.

A análise de dados mostrou interação entre os meios utilizados e a concentração de sacarose para o número de raízes. Tanto para o MS/4 quanto para o MS/2, o uso de 1,5% de sacarose possibilitou maior número de raízes. Já para o MS, a concentração de 3,0% causou aumento desse número, comparada com as outras concentrações (Tabela 9).

TABELA 9 Valores médios do número de raízes de *Ocimum selloi* na interação do meio de cultura e da concentração de sacarose, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Meio de cultura	Sacarose (%)		
	0,0	1,5	3,0
MS/4	0,00 c A	5 a A	3 b B
MS/2	0,00 c A	5 a A	3 b B
MS	0,00 c A	2 b B	4 a A

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna.

Para 1,5% e 3,0% de sacarose, o MS/4 possibilitou maior comprimento de raízes. A utilização de 1,5% de sacarose proporcionou maior formação de tecido radicular nos meios MS/4 e MS/2. O uso de 1,5% e 3,0% de sacarose não evidenciou efeito significativo para o MS completo (Tabela 10). Os dados obtidos mostram que esse carboidrato é essencial para o enraizamento *in vitro* de gemas axilares de atroveran.

TABELA 10 Valores médios do comprimento de raízes (cm) de *Ocimum selloi* na interação do meio de cultura e da concentração de sacarose, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Meio de cultura	Sacarose (%)		
	0,0	1,5	3,0
MS/4	0,00 c A	2,02 a A	1,26 b A
MS/2	0,00 c A	1,40 a B	0,72 b B
MS	0,00 b A	0,64 a C	0,68 a B

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna.

No cultivo *in vitro* de copo-de-leite (*Zantedeschia aethiopica*) com diferentes concentrações de sacarose, os melhores resultados para comprimento e número de raízes foram observados somente na presença de sacarose, em concentrações de 5,1% a 5,7% (Ribeiro, et al., 2009).

A biomassa fresca de raízes apresentou interação significativa. A concentração de 1,5% de sacarose não apresentou diferença estatística para os meios MS/4 e MS/2, sendo esses os tratamentos que apresentaram melhores resultados. Já para a concentração de 3,0% de sacarose o MS/2 induziu maior formação de biomassa. A utilização de MS/4 não sofreu influência significativa com relação às concentrações de 1,5% e 3,0% de sacarose, tendo o mesmo sido observado para o MS/2. Para o MS completo, a suplementação de 3,0% de sacarose demonstrou melhor efeito (Tabela 11).

TABELA 11 Valores médios da biomassa fresca de raízes (mg) de *Ocimum selloi* na interação do meio de cultura e da concentração de sacarose, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Meio de cultura	Sacarose (%)		
	0,0	1,5	3,0
MS/4	0,00 b A	10,02 a A	5,90 a B
MS/2	0,00 b A	10,22 a A	23,06 a A
MS	0,00 b A	0,98 b B	3,58 a B

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna.

No cultivo *in vitro* de morangueiro, Riquelme et al. (1991) observaram que o aumento da produção da biomassa da raiz foi crescente entre as dosagens utilizadas, até 4,5%.

Na Tabela 12 constam os valores médios da interação para biomassa seca de raízes, sendo possível observar que a biomassa seca produzida na concentração de sacarose de 1,5% foi maior nos meios MS/4 e MS/2. O MS/4 apresentou efeito positivo no uso de 3,0% de sacarose. Para o meio MS/4, o uso de 1,5% de sacarose causou um aumento na biomassa seca, tendo o mesmo sido observado para o MS/2. Para o MS completo, a concentração de 3,0% de sacarose demonstrou melhor efeito.

TABELA 12 Valores médios da biomassa seca de raízes (mg) de *Ocimum selloi*, na interação do meio de cultura e da concentração de sacarose, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Meio de cultura	Sacarose (%)		
	0,0	1,5	3,0
MS/4	0,00 c A	0,92 a A	0,72 b A
MS/2	0,00 c A	0,74 a A	0,28 b B
MS	0,00 b A	0,06 b B	0,38 a B

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna.

Para morangueiro, Calvete et al. (2002) observaram que doses crescentes de sacarose promoveram acréscimos de 0,14 mg na massa seca por grama de sacarose. O aumento da dosagem de 1,5% para 6,0% de sacarose dobrou o peso da matéria seca do sistema da raiz, passando de 4,3 para 8,7 mg.

Pela imagem da Figura 3 é possível verificar que não houve formação de raízes na ausência de sacarose, que a presença de sacarose no meio de cultura foi importante para o desenvolvimento das gemas axilares e que o uso do MS/4

suplementado com 1,5% de sacarose proporcionou maior altura para as plântulas.

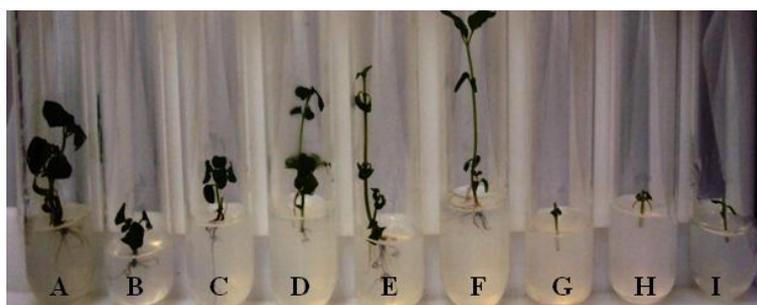


FIGURA 3 Desenvolvimento de gemas axilares de atroveran em diferentes meios de cultivo, aos 30 dias. A) MS + 3% de sacarose. B) MS/2 + 3% de sacarose. C) MS/4 + 3% de sacarose. D) MS + 1,5% de sacarose. E) MS/2 + 1,5% de sacarose. F) MS/4 + 1,5% de sacarose. G) MS + 0% de sacarose. H) MS/2 + 0% de sacarose. I) MS/4 + 0% de sacarose. UFLA, Lavras, MG, 2010.

6 CONCLUSÃO

O uso de sacarose foi essencial para o estabelecimento e o desenvolvimento de gemas axilares de *O. selloi in vitro*.

Tanto para o estabelecimento quanto para o desenvolvimento, recomenda-se a concentração de 1,5% de sacarose. O MS/2 mostrou ser o mais indicado para o estabelecimento e o MS/4, para o desenvolvimento de gemas axilares de *O. selloi in vitro*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALDAS, L. S.; HARIDASON, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, 1990. 443 p.
- CALVETE, E. O. **Concentração de sacarose *in vitro* e seleção de substratos para aclimatização *ex vitro* de morangueiro cv campinas (*Fragaria ananassa* Duch.)**. 1998. 108 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- CALVETE, E. O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNON, M. H.; SUZIN, M. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 649-653, dez. 2002.
- COUTO, M.; OLIVEIRA, R. P.; FORTES, G. R. L. Multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus* sp. 'Barrier' e 'Cadaman'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 26, n. 1, p. 5-7, abr. 2004.
- DANTAS, M. C. A.; CERETTA, M.; COUTINHO, F. E.; FORTES, G. R. de L. Enraizamento *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus* sp.), cultivar Caigangue. **Agropecuária de Clima Temperado**, Pelotas, v. 3, n. 2, p. 123-130, 2000.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: sistema de análise de variância versão 5.0. Lavras: Departamento de Ciências Exatas, 2007.
- FRÁGUAS, C. B.; VILLA, F.; SOUZA, A. V.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Ceres**, Viçosa, MG, v. 50, n. 292, p. 719-726, 2003.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Dordrech: Background, 2008. v. 1, 501 p.
- 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: ABCTP, 1998. p. 183-260.

GUIMARÃES, P. T. C.; PASQUAL, M.; MIRANDA, A. M. P. de. Efeito de diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose sobre a propagação “*in vitro*” da samambaia-espada [*Nephrolepis exaltata* (L.) Schott]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 2, p. 309-316, mar./abr. 1999.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 254 p.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation of seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar. 1962.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

MURCH, S. J.; LIU, C.; ROMERO, R. M.; SAXENA, P. K. *In vitro* culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrech, v. 78, n. 1, p. 63-68, Jan. 2004.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; MARTINS, C. F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro. [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 3, n. 2, p. 11-18, fev. 2001.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C. F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 84-90, jan./fev. 2003.

PASQUAL, M. Meios de cultura. In: PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais**. Lavras: UFLA, 2001. v. 1, 74 p.

PASQUAL, M.; ALVES, G. P.; DUTRA, L. F.; FINOTTI, D. R.; CHAGAS, E. A. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerina ‘Poncã’: concentrações do meio MS e da sacarose. **Ceres**, Viçosa, MG, v. 49, n. 282, p. 181-189, 2002.

PESSOA, C. C.; SILVA, A. L. L. da; FRANCO, E. T. H.; BISOGNIN, D. A. Propagação *in vitro* de *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott. **Caderno de Pesquisa Série Biologia**, Santa Cruz do Sul, v. 16, n. 1, p. 43-49, jan. 2004.

PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators. **Plant, Tissue Culture and Biotechnology**, Dordrech., v. 1, n. 1, p. 26-37, Jan. 1995.

RIBEIRO, M. N. O.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; CAVALLARI, L. da L. Desenvolvimento *in vitro* de copo-de-leite: efeito das concentrações de sacarose e de ácido giberélico. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 575-580, jul./set. 2009.

RIBEIRO, M. N. O.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; CAVALLARI, L. da L. Diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. (copo-de-leite). **Revisa Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 39, n. 1, p. 101-106, jan./mar. 2008.

RIQUELME, C.; GUIÑAZU, M. E.; TIZIO, R. Pre-acondicionamento y aclimatacion en condiciones de invernáculo de plântulas micropropagadas de frutilla, menta, papa y vid. **Phyton**, Buenos Aires, v. 52, n. 1, p. 73-82, jul. 1991.

SORACE, M.; FARIA, R. T. de; GOMES, G. P. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 775-782, out./dez. 2008.

VIEIRA, R. F.; SIMON, J. E. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. **Economic Botany**, Bronx, v. 54, n. 2, p. 207-216, Apr./June 2000.

VILLA, F.; ARAÚJO, A. G. de; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 582-589, mar./abr. 2006.

CAPÍTULO 4

CULTIVO *IN VITRO* DE SEGMENTO APICAL E NODAL DE *Ocimum selloi* Benth.

1 RESUMO

Objetivou-se, com a realização deste trabalho, promover a proliferação de brotações em segmentos apicais e nodais de atroveran em diferentes concentrações de BAP. Plantas jovens serviram de doadoras de segmentos apicais e nodais. Os segmentos foram inoculados em meio MS/2 acrescido de 1,5% de sacarose e diferentes concentrações de BAP. O experimento foi em fatorial 3 x 4, sendo 3 as posições dos segmentos de atroveran (segmento apical, primeiro e segundo segmentos nodais) e 4 concentrações de BAP (0; 2; 4 e 6 mg L⁻¹). Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições. Aos 30 dias, avaliaram-se número, altura e biomassa seca das brotações e número, comprimento e biomassa seca de raízes. O segmento apical de atroveran apresentou menor desenvolvimento para todos os parâmetros avaliados. Os primeiros e os segundos segmentos tiveram desenvolvimento similar. O aumento da concentração do BAP inibiu o crescimento da brotação e o desenvolvimento de raízes, sendo observada a formação de raízes apenas nos tratamentos em que este regulador de crescimento estava ausente. As diferentes concentrações de BAP foram eficientes na produção de brotações.

Palavras-chave: atroveran, planta medicinal, gema, micropropagação.

2 ABSTRACT

The aim with this work was proliferation of shoots from apical and nodal segments of atoveran with different concentrations of BAP. Young plants were used as donors of apical and nodal segments. The segments were inoculated in half strength of MS supplemented with 1.5% of sucrose and different BAP concentrations. The experiment was in factorial 3 x 4, being 3 positions of the segments of atoveran (apical segment; first and second nodal segment) and 4 concentrations of BAP (0; 2; 4 and 6 mg L⁻¹). The completely randomized design was used with 4 repetitions. After 30 days was evaluated the number and height of shoots and dry biomass, number and length root and dry biomass of roots. The apical segment of atoveran showed lower development for all parameters. The first and second segments had similar development. The increase in concentration of BAP inhibited the growth of shoots and roots. It was observed the formation of roots only in the treatments that this growth regulator was absent. Different concentrations of BAP were effective in the proliferation of shoots.

Key words: atoveran, medicinal plant, egg, micropropagation.

3 INTRODUÇÃO

O *Ocimum selloi* Benth pertence à família Lamiaceae e é conhecido popularmente como atoveran, alfavaca, elixir-paregórico, anis-do-campo, erva-doce-silvestre, alfavaca-do-mato e hortelã-brava, tendo demonstrado efeito analgésico e antidiarreico (Franca et al., 2008). Estudos etnobotânicos realizados com o *O. selloi* revelaram que esta planta é utilizada na medicina popular com várias finalidades. Por via oral, é usada como digestivo e para tratar gastrite, vômitos, tosse, bronquite e outras condições. O *O. selloi* é empregado também topicamente para aliviar dores nas pernas. Além do uso medicinal, algumas espécies do gênero *Ocimum* são utilizadas também como tempero no Brasil (Lorenzi & Matos, 2002).

Muitas plantas medicinais já são multiplicadas *in vitro*. Entre elas: *Pfaffia glomerata* (Maldaner et al., 2006), *Lychnophora pinaster* (Souza et al., 2007), *Melissa officinalis* (Reis et al., 2009). Por meio da biotecnologia, é possível aumentar a produção e diminuir o preço dos princípios ativos fitoquímicos (Bajaj et al., 1988). A proliferação *in vitro* de plantas medicinais pode ser usada não só para a produção de mudas saudáveis e de boa qualidade, mas também para suprir a escassez de material para o plantio e determinar o teor e a composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* (Reis et al., 2009).

As citocininas estimulam a maior produção de partes aéreas das brotações até uma determinada concentração, a partir da qual ocorre diminuição da altura em virtude de um possível efeito fitotóxico da citocinina (Reis et al., 2008). A indução de brotações *in vitro* ocorre pelo desequilíbrio hormonal induzido por uma concentração adequada e balanceada de reguladores vegetais adicionada ao meio, como a citocinina, que é muito favorável na fase de multiplicação *in vitro*. A 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido muito eficaz para

promover multiplicação de partes aéreas e indução de gemas axilares e brotos em diversas espécies (Reis et al., 2009).

Reis et al. (2008), no cultivo *in vitro* de segmentos nodais de plântulas de *Melissa officinalis*, observaram que, em meio MS contendo 4,44 μ mol/L de BAP, houve um maior número de brotos, mas com pequenos números de nós e comprimento do broto, não havendo formação de raízes. A maior taxa de multiplicação de segmentos nodais foi obtida em meio MS sem adição de regulador de crescimento. É frequente a opção pelo uso de segmentos nodais, em função de ocorrerem em maior quantidade na planta matriz do que o segmento apical.

Objetivou-se, com a realização deste trabalho, a indução de brotações em segmentos apicais e nodais de atroveran em diferentes concentrações de BAP.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG. Plantas jovens de atroveran cultivadas em casa de vegetação serviram de doadoras de segmentos apicais e nodais, sendo os nodais obtidos do primeiro e do segundo segmentos abaixo do apical.

A exsicata da espécie está depositada no herbário ESAL, do Departamento de Biologia da UFLA, sob o registro nº 7474.

Os segmentos foram cortados com o auxílio de uma lâmina e lavados abundantemente com água corrente e sabão neutro. Em seguida, foram imersos em solução de hipoclorito de sódio comercial a 50% e mantidos sob agitação

constante, por 15 minutos. Em seguida, os segmentos foram lavados cinco vezes em água destilada e autoclavada, sob capela de fluxo laminar.

Após a assepsia, os segmentos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (Murasghe & Skoog, 1962), na concentração de 50% dos sais, suplementado com 1,5% de sacarose e 4 concentrações de BAP (0; 2; 4 e 6 mg L⁻¹). O meio de cultura foi solidificado com 0,6% de ágar, o pH foi ajustado para 5,7±0,1 e, em seguida, autoclavado, a 120°C e 1 atm, por 20 minutos. Após a inoculação, os tubos foram fechados com tampas plásticas e vedados com parafilme. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro, sob intensidade luminosa de 25 µmol m⁻² s⁻¹, à temperatura de 26±0,1°C.

O experimento foi em fatorial 3 x 4, sendo 3 as posições dos segmentos de atroveran (apical; 1º e 2º segmentos) e 4 concentrações de BAP (0; 2; 4 e 6 mg L⁻¹), totalizando 12 tratamentos. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições, sendo 5 tubos por repetição e 1 explante por tubo.

Aos 30 dias, avaliaram-se número de brotações, altura das brotações (cm), biomassa seca das brotações (mg), número de raízes, comprimento de raízes (cm) e biomassa seca de raízes (mg).

A altura da brotação e o comprimento de raízes foram determinados com o auxílio de uma régua. Para a altura, a medição foi feita da base da brotação até a gema apical. Para a determinação da biomassa seca, as brotações e as raízes foram colocadas em sacos de papel kraft e acondicionados em estufa de circulação forçada de ar, a 60°C, por 5 dias. Após esse período, o material vegetal foi mensurado em balança de precisão.

A análise estatística dos dados foi realizada pelo software Sisvar[®], versão 5.0 (Ferreira, 2007). Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA, pelo teste F (p<0,05). Para comparação dos segmentos foi utilizado o teste de Scott-

Knott ($p < 0,05$). A comparação das concentrações de BAP foi realizada por meio da análise de regressão polinomial.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação foi significativa para as variáveis número e altura das brotações, número e comprimento de raízes. Para as demais variáveis analisadas, os fatores posição do segmento e da concentração de BAP foram significativos apenas quando analisados separadamente.

Os resultados da interação da posição do segmento e da concentração de BAP para número de brotações são apresentados na Figura 1.

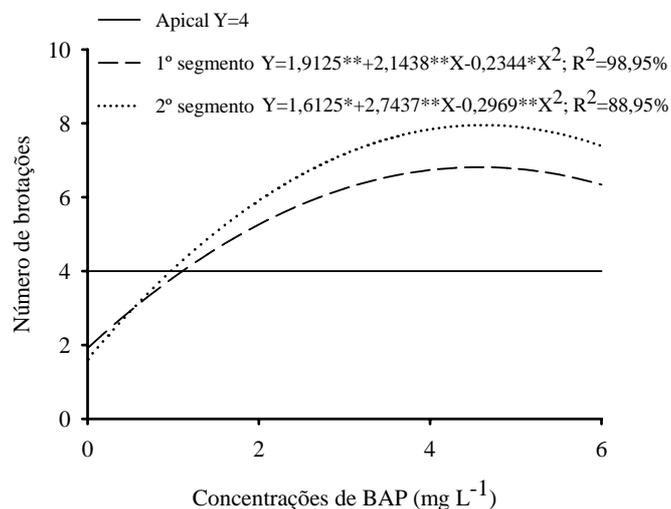


FIGURA 1 Número de brotações de segmento apical e nodal de *Ocimum selloi* submetidas a diferentes concentrações de BAP, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010. *, ** significativo a 5% e a 1%, pelo teste t, respectivamente.

O segmento apical apresentou uma constante, não havendo diferença estatística entre as concentrações de BAP na indução de brotação para esse segmento (Figura 2). No entanto, os primeiros e os segundos segmentos apresentaram comportamento quadrático. O primeiro segmento teve o número máximo estimado em 7 brotações, na concentração de 4,57 mg L⁻¹ de BAP. Em relação ao segundo segmento, o número máximo estimado foi de 8 brotações, na concentração de 4,62 mg L⁻¹ de BAP. Para ambos os segmentos, a ausência do regulador de crescimento afetou negativamente a produção de brotações. Esse resultado indica que há diferenças no desenvolvimento dos segmentos de

atroveran, de acordo com a sua posição na planta, pois não forneceram explantes uniformes quanto ao desenvolvimento *in vitro*.

Vicente et al. (2009), trabalhando com *Vernonia condensata*, constataram que a concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP foi a que proporcionou a melhor resposta com relação ao número de brotações por explantes.

O efeito benéfico do BAP na multiplicação das brotações pode ser relacionado com a influência desse regulador na divisão celular e na quebra de dormência das gemas axilares, até então inibidas pela dominância apical (Brum et al., 2002).

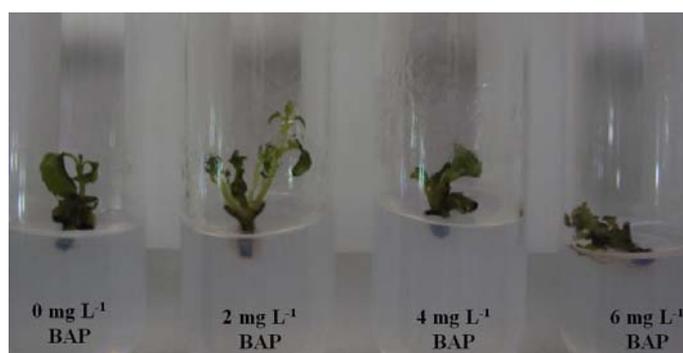


FIGURA 2 Segmentos apicais de *Ocimum selloi*, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de BAP aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Os dados da interação para altura do broto são apresentados na Figura 3.

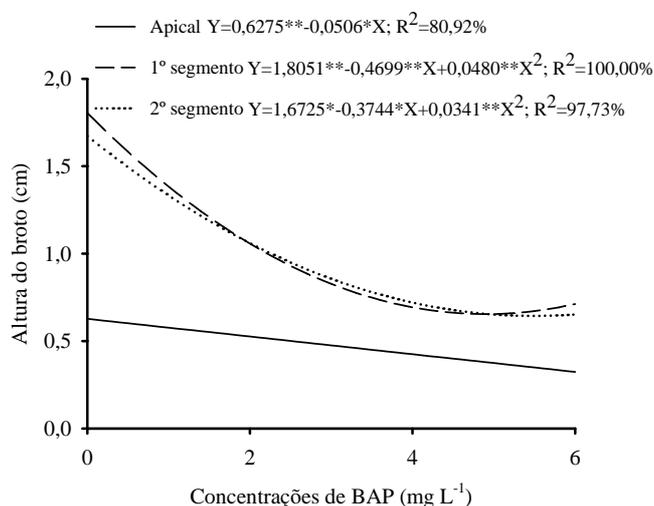


FIGURA 3 Altura da brotação de segmento apical e nodal de *Ocimum selloi* submetidas a diferentes concentrações de BAP, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010. *, ** significativo, a 5% e a 1% pelo teste t, respectivamente.

O crescimento da brotação foi maior na ausência de BAP, para todos os segmentos testados. Os resultados demonstraram que as menores concentrações de BAP produziram menos brotações, o que possibilitou maior crescimento das brotações, por não competirem por nutrientes. O segmento apical apresentou comportamento linear, tendo o ponto de mínimo de 0,31 cm na concentração de 6 mg L^{-1} de BAP. Os primeiros e os segundos segmentos nodais apresentaram comportamento quadrático, tendo como ponto de mínimo 0,66 e 0,64 cm, nas concentrações de 4,89 e 5,49 mg L^{-1} de BAP, respectivamente.

Os segmentos podem acumular níveis diferentes de reguladores vegetais endógenos em diferentes posições da haste e, portanto, podem promover respostas diversas (Pereira et al., 2005). Leontiev-Orlov et al. (2000) e Pérez-Tornero et al. (2000) observaram que doses crescentes de citocininas inibiram o alongamento das brotações em Prunáceas. Conforme Leshem et al. (1988), o uso de citocinina em níveis elevados pode ser tóxico, pois leva à formação de rosetas e inibe o alongamento da brotação.

A variável biomassa seca de brotação não apresentou interação. Com relação à posição do segmento, o segundo segmento nodal forneceu melhor resposta, seguido do primeiro e, depois, do apical (Tabela 1).

TABELA 1 Valores médios da biomassa seca das brotações (BSB) nos diferentes segmentos de *Ocimum selloi*. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Segmentos	BSB (g)
Apical	0,0042 c
1°	0,0064 b
2°	0,0087 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

As concentrações de BAP apresentaram comportamento cúbico para a biomassa seca de brotação (Figura 4). A derivada da equação mostrou peso seco máximo de 8,62 mg em 4,67 mg L⁻¹ de BAP e peso seco mínimo de 4,45 mg em 1,23 mg L⁻¹ de BAP. A ausência de BAP proporcionou maior altura de brotação, possibilitando maior produção de biomassa. O acréscimo da citocinina ao meio de cultura fez com que essa altura tendesse a diminuir, porém, aumentou o

número de brotações na concentração de 4,67 mg L⁻¹ de BAP, o que também possibilitou aumento da biomassa seca.

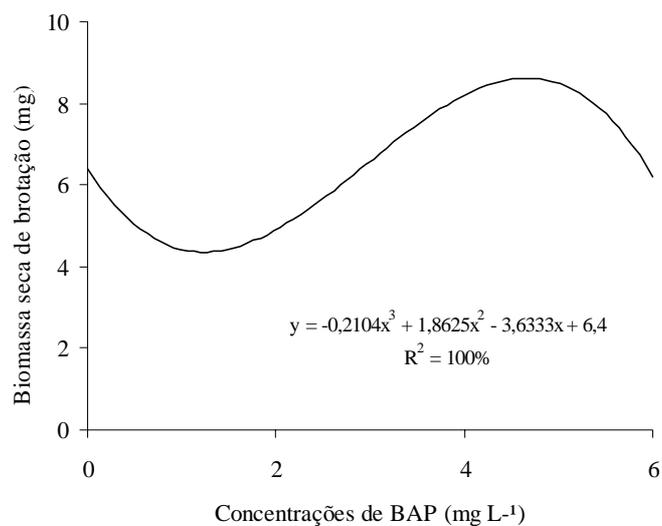


FIGURA 4 Biomassa seca de brotações de *Ocimum selloi* submetidas a diferentes concentrações de BAP, aos 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

As concentrações de BAP mostraram ter efeito negativo para a formação de raízes, independente da posição do explante. Apenas houve formação de raízes na ausência do BAP (Figura 5), sendo este o melhor tratamento para o número, o comprimento e a biomassa seca de raízes. A diminuição da produção de raízes com a adição de BAP normalmente ocorre porque esse regulador é

inibidor do sistema radicular, e a indução ou a inibição dependerão do balanço e da interação entre as substâncias de crescimento endógenas e exógenas.

Santana et al. (2006), trabalhando com *Ocimum basilicum*, demonstraram que, para a variável porcentagem de raízes, os meios de cultivo sem BAP e nas concentrações de 2 a 4 mg L⁻¹ apresentaram os maiores valores. Segundo a mesma autora, na medida em que as concentrações do regulador de crescimento aumentaram, a porcentagem de raízes tendeu a diminuir

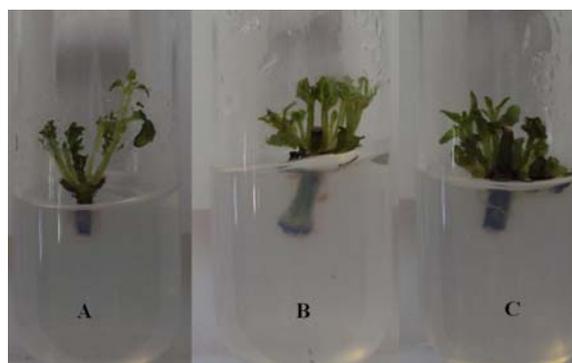


FIGURA 5 Segmentos de *Ocimum selloi* cultivadas *in vitro* aos 30 dias. A) Segmento apical + 2 mg L⁻¹ de BAP. B) Primeiro segmento + 4 mg L⁻¹ de BAP. C) Segundo segmento + 6 mg L⁻¹ de BAP. UFLA, Lavras, MG, 2010.

6 CONCLUSÃO

O segmento apical de atroveran apresentou menor desenvolvimento para todos os parâmetros avaliados. Os primeiros e segundos segmentos tiveram desenvolvimento similar.

O aumento da concentração do BAP inibiu o crescimento da brotação e o desenvolvimento de raízes, sendo observada a formação de raízes apenas nos tratamentos em que este regulador de crescimento estava ausente.

As diferentes concentrações de BAP foram eficientes na produção de brotações.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAJAJ, Y. P. S.; FURMANOWA, M.; OLSZOWSK, O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: BAJAJ, Y. P. S. (Org.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, Berlin: Springer Verlag, 1988. v. 4, p. 60-103.

BRUM, G. R.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, p. 1403-1409, dez. 2002.

FERREIRA, D. F. SISVAR: Sistema de análise de variância versão 5.0. Lavras: Departamento de Ciências Exatas, 2007.

FRANCA, C. S.; MENEZES, F. S.; COSTA, L. C. de B.; ALVES, P. B.; PINTO, J. E. B. P.; MARÇAL, R. M. Analgesic and antidiarrheal properties of *Ocimum selloi* essential oil in mice. **Fitoterapia**, Milano, v. 79, n. 2, p. 569-573, Mar./Apr. 2008.

LEONTIEV-ORLOV, O.; ROGALSKI, M.; MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L. 6-Benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de prunáceas (*Prunus* sp.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 6, n. 1, p. 63- 67, jan./abr. 2000.

LESHEN, B.; WERKER, E.; SHALEV, D. P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, London, v. 2, n. 3, p. 271-276, Nov. 1988.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 254 p.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T.; SANTOS, E. S. dos; FLORES, R.; SKREBSKY, E. C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1201-1206, dez. 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

PEREIRA, J. E. S.; FRANÇA, R. B. de; DANTAS, A. C. de M.; FORTES, G. R. L. Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* de batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 86-89, mar. 2005.

PÉREZ-TORNERO, O.; LOPEZ, J. M.; EGEA, J.; BURGOS, L. Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 75, n. 3, p. 283-286, May/June 2000.

REIS, É. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Ceres**, Viçosa, MG, v. 55, n. 1, p. 160-167, 2008.

REIS, É. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. *in vitro* sob influência do meio de cultura. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 1, p. 331-335, jan. 2009.

SANTANA, J. G. S.; COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F. Influência de concentrações de BAP na micropropagação de manjeriço

(*Ocimum basilicum* L. NSL6421-S2-05). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 2006, GOIÂNIA. REVISTA DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HORTICULTURA, 46., 2006, Brasília. **Anais...** Brasília: ABH, 2006. v. 24, p. 2686-2689.

SOUZA, A. V. de; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CORRÊA, R. M.; COSTA, L. C. de B.; DYER, W. E. *In vitro* propagation of *Lychnophora pinaster* (Asteraceae): a threatened endemic medicinal plant. **Hortscience**, Alexandria, v. 42, n. 7, p. 1665-1669, Dec. 2007.

VICENTE, M. A. A.; ALMEIDA, W. A. B.; CARVALHO, Z. S. Multiplicação *in vitro* e aclimação de *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 176-183, jun. 2009.

CAPÍTULO 5

ACLI MATI ZA ÇÃO DE PLÂNTULAS MICROPROPAGADAS DE *Ocimum selloi* Benth.

1 RESUMO

Atroveran (*Ocimum selloi* Benth - Lamiaceae) é uma planta medicinal nativa do Brasil. O objetivo desse trabalho foi promover a aclimatização de plântulas micropropagadas de atroveran em diferentes substratos. Os substratos avaliados foram: areia, Plantmax[®], solo e solo+esterco bovino (2:1). Aos 45 dias, avaliaram-se a altura da planta, biomassa seca da parte aérea, número de nós, comprimento da raiz e biomassa seca do sistema radicular. Para a aclimatização de plântulas de *Ocimum selloi*, recomenda-se o uso do substrato comercial Plantmax[®].

Palavras-chave: atroveran, planta medicinal, substratos.

2 ABSTRACT

Atroveran (*Ocimum selloi* Benth - Lamiaceae) is a native medicinal plant from Brazil. The goal of this work was acclimatization of plantlets of atroveran in different substratum. The treatments had consisted of following substratum: sand, Plantmax[®], soil and soil + cattle manure (2: 1). After 45 days was evaluated the plant height, dry biomass of the aerial part, number of node, root length and dry biomass of roots. The acclimatization of *Ocimum selloi* plantlets suggests the use of the commercial substratum Plantmax[®].

Key words: atroveran, medicinal plant, substratum.

3 INTRODUÇÃO

Ocimum selloi Benth é um subarbusto perene, nativo das regiões sul e sudeste do Brasil, conhecido popularmente como alfavaquinha, elixir-paregórico ou atroveran. A espécie tem largo uso popular como antidiarreico, antiespasmódico e anti-inflamatório, e tem ação comprovada como repelente de insetos (Lorenzi & Matos, 2002).

Uma etapa crítica da micropropagação é a aclimatização, devido à dificuldade de transferir com sucesso plantas da condição *in vitro* para a casa de vegetação e, posteriormente, para o campo (Fráguas, 2003). Durante a micropropagação, as plantas são mantidas em um ambiente totalmente controlado. Ao serem transferidas para condições naturais e, por ser uma mudança brusca, isso deve ocorrer paulatinamente, pois as plantas não estão adaptadas ao novo ambiente.

Para que as mudas tenham alta taxa de sobrevivência na aclimatização, é necessário que elas produzam novas raízes em substratos e que estes tenham condições físicas e nutricionais adequadas. Além do mais, a planta deverá desenvolver mecanismos de controle de transpiração e condutância estomática, ativar controle de perda de água pelas células e aumentar a taxa fotossintética em condições de atmosfera mais rica em CO₂ (Díaz-Perez et al., 1995).

Outro fator importante na aclimatização de mudas é o substrato (Calvete, 2000), devendo apresentar boa coesão entre as partículas e adequada aderência junto às raízes (Toledo et al., 1997). Dessa forma, a seleção do substrato é fundamental no crescimento e no desenvolvimento das plantas micropropagadas, influenciando diretamente o sucesso da aclimatização.

O substrato é o meio de sustentação ou suporte durante o cultivo *in vitro* e aclimatização das plantas. Também é um fator externo de marcada influência

no processo de enraizamento adventício e sobre a qualidade das raízes formadas, desempenhando papel importante na sobrevivência e no desenvolvimento inicial da nova planta. Além disso, pode afetar o escurecimento do ambiente de enraizamento, pH, umidade e resistência física ao crescimento das raízes, entre outros (George, 1993).

Silva et al. (2007) observaram que plantas de *Aloe vera* aclimatizadas em substrato comercial Plantmax[®], durante 60 dias, em casa de vegetação (25±2°C, 80% de UR do ar e 40% de redução da radiação solar), apresentaram 95% das plantas de *A. vera* prontas para serem transplantadas em definitivo para o campo de produção.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de promover a aclimatização de plântulas micropropagadas de atoveran em diferentes substratos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

A exsicata da espécie está depositada no herbário ESAL, do Departamento de Biologia da UFLA, sob o registro nº 7474.

Plantas de *Ocimum selloi*, estabelecidas *in vitro* em meio MS/2 suplementado de 1,5% de sacarose, foram utilizadas para a realização do trabalho. Plântulas com o sistema radicular desenvolvido foram retiradas dos tubos de ensaio e cuidadosamente lavadas com água corrente, para eliminar os resíduos do meio de cultura. Em seguida, foram transplantadas para bandejas plásticas de 36 cm x

27 cm, constituídas de 24 células cada. Cada bandeja correspondeu a um tratamento.

A aclimatização foi realizada em casa de vegetação com nebulização intermitente, temperatura mantida em torno de 26°C e sombreamento parcial obtido com sombrite de 70% de sombreamento.

Os substratos avaliados foram: areia, substrato comercial Plantmax[®], solo (Latosolo Vermelho Escuro) e solo (Latosolo Vermelho Escuro) + esterco bovino (2:1), totalizando 4 tratamentos. Para cada tratamento, foram utilizadas cinco repetições, sendo quatro plântulas por repetição.

Aos 45 dias, avaliaram-se a percentagem de sobrevivência, a altura da planta (cm), o número de entrenós, a biomassa seca da parte aérea (mg), o comprimento da maior raiz (cm) e a biomassa seca do sistema radicular (mg).

A altura da planta e o comprimento da maior raiz foram determinados com o auxílio de uma régua; para a altura, a medição foi feita da base da planta até a gema apical. Para a determinação da biomassa seca, a parte aérea da planta (folhas e caule) e raízes foi colocada em sacos de papel kraft e acondicionada em estufa de circulação forçada de ar, a 60°C, por 5 dias. Após esse período, o material vegetal foi mensurado em balança de precisão.

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando-se o software Sisvar[®], versão 5.0 (Ferreira, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sobrevivência das plantas, durante o processo de aclimatização em diferentes substratos, não sofreu influência dos tratamentos. As demais variáveis estudadas apresentaram resultados significativos.

Para o desenvolvimento da altura, número de entrenós e biomassa seca da parte aérea, o melhor substrato foi o Plantmax[®], seguido dos outros substratos, os quais não se diferenciaram entre si. O mesmo pode ser observado para comprimento da maior raiz e biomassa seca do sistema radicular (Tabela 1). Pelas suas características físicas e químicas, o substrato comercial possibilitou um melhor desenvolvimento da parte aérea (Figura 1) e do sistema radicular da planta. A areia, por ser um substrato com baixo teor de nutrientes, não apresentou crescimento das raízes, mesmo tendo uma boa relação ar-água. Para Hartmann et al. (2002), o substrato adequado deve ser inerte, poroso, com boa drenagem e capaz de manter a aeração e a umidade, permitindo o desenvolvimento do sistema radicular.

TABELA 1 Valores médios da altura, número de entrenós (Nº E), biomassa seca da parte aérea (BSPA), porcentagem de sobrevivência (% S), comprimento da maior raiz (CMR) e biomassa seca do sistema radicular (BSSR) de plântulas aclimatizadas de *Ocimum selloi*, aos 45 dias, em diferentes substratos. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Substrato	Altura (cm)	Nº E	BSPA (mg)	% S	CMR (cm)	BSSR (mg)
Areia	5,95 b	4,00 b	35,90 b	100 a	9,60 b	11,58 b
Plantmax [®]	8,90 a	7,00 a	226,28 a	95 a	19,25 a	95,18 a
Solo	6,45 b	5,00 b	62,32 b	100 a	13,52 b	19,76 b
Solo + Esterco bovino	5,43 b	5,00 b	61,06 b	95 a	11,47 b	28,62 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Segundo Silva et al. (2001), o substrato comercial tem sido considerado adequado para o procedimento de aclimatização, devido aos seus constituintes químicos, principalmente pela presença de fósforo que, de acordo com Mendonça et al. (2003), estimula o crescimento da parte aérea da planta ou, ainda, às características físicas que apresentam maior porosidade total, o que dá a esse substrato maior capacidade de retenção de água e aeração.

O Plantmax[®] é um substrato comercial composto de casca de pinus, turfa e vermiculita (Wendling et al., 2002) com boa relação ar-água, o que possibilitou o bom desenvolvimento da planta. Em trabalho realizado por Maloso et al. (2008) foi demonstrado que o substrato comercial é o mais indicado para a aclimatização de jambu [*Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen], apresentando 78,81% de plantas vivas.

Para Bosa et al. (2003), o bom desempenho dos substratos comerciais e das misturas de solo e ou compostos orgânicos com o condicionador físico (areia) pode ser atribuído à boa capacidade de estruturação do substrato.

O desenvolvimento da parte aérea das plantas aclimatizadas de atroveran em diferentes substratos pode ser observado na Figura 1.

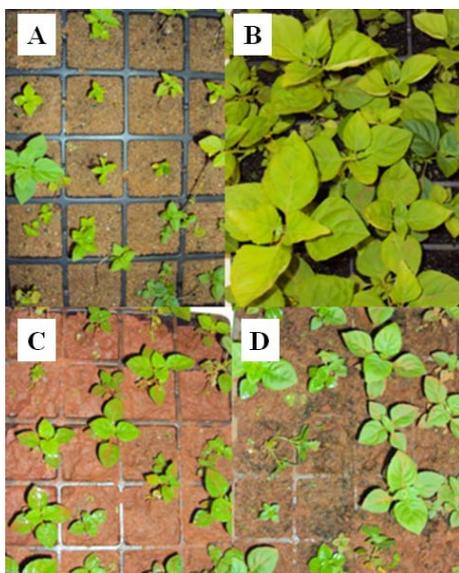


FIGURA 1 Parte aérea de plantas de *Ocimum selloi* aclimatizadas em diferentes substratos, aos 45 dias. A) Areia. B) Substrato comercial C) Solo. D) Solo + Esterco bovino (2:1). UFLA, Lavras, MG, 2010.

Pelas suas características físicas e químicas, o substrato comercial possibilitou um melhor desenvolvimento do sistema radicular da planta (Figura 2). Segundo Hoffmann et al. (2001), o Plantmax[®] apresenta vantagem pela sua

uniformidade de composição química e física, diferentemente do que pode ocorrer com o solo e distintos materiais orgânicos, os quais podem variar muito nas suas características, sendo o substrato mais recomendado, tanto para o crescimento da parte aérea quanto das raízes.

O desenvolvimento do sistema radicular das plantas aclimatizadas de atoveran em diferentes substratos pode ser observado na Figura 2.

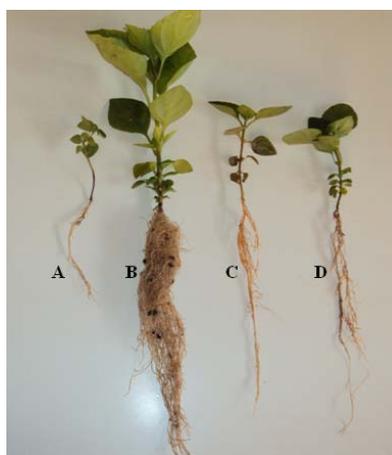


FIGURA 2 Sistema radicular de plantas de *Ocimum selloi* aclimatizadas em diferentes substratos, aos 45 dias. A) Areia. B) Substrato comercial. C) Solo. D) Solo + Esterco bovino (2:1). UFLA, Lavras, MG, 2010.

6 CONCLUSÃO

Para aclimatização de plantas de *Ocimum selloi* provenientes de cultivo *in vitro*, recomenda-se o uso do substrato comercial.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOSA, N.; CALVETE, E. O.; SUZIN, M.; BORDIGNON, L. Avaliação do crescimento de *Gypsophila paniculata* durante o enraizamento *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 510-513, set. 2003.
- CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; DAUDT, R. Efeito do substrato na aclimatização *ex vitro* de morangueiro cv. Campinas, *Fragaria x ananassa* Duch. In: KÄMPF, A. N.; FERMINO, M. H. (Ed.). **Substratos para plantas: a base da produção vegetal em recipientes**. Porto Alegre: Genesis, 2000. p. 257-264.
- DÍAZ- PEREZ, J. C.; SUTTER, E. G.; SHACKEL, K. A. Acclimatization and subsequent gas-exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 95, n. 2, p. 225-32, Feb. 1995.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: sistema de análise de variância versão 5.0. Lavras: Departamento de Ciências Exatas, 2007.
- FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira ‘Roxo-de-Valinhos’ em diferentes ambientes**. 2003. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 786 p.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. **Plant propagation: principles e practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880 p.
- HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; FRÁGUAS, C. B. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira “marubakaido”. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 2, p. 462-467, mar./abr. 2001.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 254 p.
- MALOSSO, M. G.; BARBOSA, E. P.; NAGAO, E. O. Micropropagação de jambu [*Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen]. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 10, n. 3, p. 91-95, fev. 2008.

MENDONÇA, V.; NETO, S. E. de A.; RAMOS, J. D.; PIO, R.; GONTIJO, T. C. A. Diferentes substratos e recipientes na formação de mudas de mamona (Sunrise solo). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 25, n. 1, p. 127-130, abr. 2003.

SILVA, C. G.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas de *Aloe vera* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 1, p. 29-35, fev. 2007.

SILVA, R. P.; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, N. T. V. Influência de diversos substratos no desenvolvimento de mudas de maracajuazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. flavicarpa DEG). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 23, n. 2, p. 377-381, maio 2001.

TOLEDO, A. R. M.; GIROTO, L. F.; SOUZA, M. Efeito de substratos na formação de mudas de laranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pera Rio) em vaso. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 21, n. 1, p. 29-34, jan./fev. 1997.

WENDLING, I.; GATTO, A.; PAIVA, H. N.; GONÇALVES, W. **Substratos, adubação e irrigação na produção de mudas**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2002. 165 p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cada dia, novos estudos comprovam o poder curativo das plantas. Com isso, o mercado de plantas medicinais vem crescendo e se fortificando. Para que esse mercado continue a crescer, novas pesquisas são necessárias.

A cultura de tecidos tem se mostrado uma ferramenta de importante aplicação nos estudos de plantas medicinais, principalmente no que diz respeito à produção de metabólitos especiais e de mudas de plantas.

No presente trabalho, observou-se que as altas concentrações de sais no meio de cultura MS prejudicaram a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas de *Ocimum selloi* cultivadas *in vitro*, assim como as altas concentrações de sacarose. O uso do regulador de crescimento BAP possibilitou a produção de brotos, tornando viável a multiplicação dessa planta *in vitro*. Constatou-se, ainda, que o substrato comercial apresenta características adequadas para o bom desenvolvimento da plântula, no processo de aclimatização.