



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

HIPERIDRICIDADE, LUZ E REGULADORES DE CRESCIMENTO NO CULTIVO
IN VITRO DE MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.)

SABRINA DE MATOS TRENTÓ

2017

SABRINA DE MATOS TRENTO

HIPERIDRICIDADE, LUZ E REGULADORES DE CRESCIMENTO NO CULTIVO
IN VITRO DE MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- T795h Trento, Sabrina de Matos, 1991
2017 Hiperidridicidade, luz e reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* de manjericão (*Ocimum basilicum L.*) / Sabrina de Matos Trento. - 2017.
64 p. : il.
- Orientador: José Magno Queiroz Luz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia.
Inclui bibliografia.
1. Agronomia - Teses. 2. Manjericão - Propagação-*in vitro* - Teses.
3. Plantas - Reguladores - Teses. 4. Hormônios vegetais - Teses. I. Luz,
José Magno Queiroz, 1967. II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

SABRINA DE MATOS TRENTO

HIPERIDRICIDADE, LUZ E REGULADORES DE CRESCIMENTO NO CULTIVO
IN VITRO DE MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2017.

Dra. Muza do Carmo Vieira	IFGoiano
Dra. Simone Abreu Asmar	UFU
Dra. Elequisandra da Costa Araruna	UFU

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz
ICIAG-UFU
(Orientador)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Aos meus pais Ivonir Trento e Celia Trento,

Às minhas irmãs Joyce e Angélica

Aos meus sogros Ari e Nair

Dedico.

Ao meu marido Gustavo,

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre guiando meus passos e sendo meu refúgio e fortaleza em todos os momentos.

Aos meus pais, pelo amor imensurável e por nunca medirem esforços para que eu pudesse estudar e alcançar os meus objetivos.

Às minhas amadas irmãs, Joyce e Angélica, que sempre me apoiaram e incentivaram.

Ao meu marido Gustavo Malagi, pela compreensão, incentivo e imprescindível ajuda. Seu apoio foi fundamental para que eu alcançasse essa conquista.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade de cursar essa Pós-Graduação.

Ao professor José Magno Queiroz Luz, pela orientação e prestatividade de sempre.

À Simone Abreu Asmar, pela coorientação e auxílio no planejamento dos experimentos.

Ao meu colega Herick, ser humano incrível, sempre bem humorado e disposto a ajudar. Às minhas colegas de laboratório Danyela, Mariana e Rayssa, por toda ajuda e por todos os momentos compartilhados.

Aos participantes da banca examinadora, que também dividirão comigo esse momento tão importante e esperado: Dra Muza do Carmo Vieira e Dra Elequisandra da Costa Araruna.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pela concessão da bolsa.

À FAPEMIG pelo suporte financeiro na condução do trabalho.

A todos que de uma forma ou de outra participaram dessa breve e intensa caminhada.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	i
RESUMO	i
ABSTRACT.....	ii
1.INTRODUÇÃO GERAL	1
2.REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Descrição da espécie.....	3
2.2 Cultivar Maria Bonita	4
2.3 Cultura de tecidos vegetais.....	5
2.4 Meios de cultura.....	6
2.5 Reguladores de crescimento.....	7
2.6 Qualidade e fontes de luz.....	8
REFERÊNCIAS.....	11
CAPÍTULO 2	16
RESUMO	16
ABSTRACT.....	17
1.INTRODUÇÃO.....	18
2.MATERIAL E MÉTODOS	20
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO 3	29
RESUMO	29
ABSTRACT.....	30
1.INTRODUÇÃO.....	31
2.MATERIAL E MÉTODOS	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
CAPÍTULO 4	45
RESUMO	45
ABSTRACT.....	46

1. INTRODUÇÃO.....	47
2. MATERIAL E MÉTODOS	48
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4. CONCLUSÕES.....	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
REFERÊNCIAS.....	62

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

TABELA 2- Coeficientes angulares (a), lineares (b) e de determinação (R^2) de equações de regressão linear simples, relacionando estimativas visuais e reais de grau de hiperidridicidade efetuadas por dez avaliadores, sem e com o uso da escala proposta, a partir de 60 plântulas de manjericão com sintomas de hiperidridicidade. Uberlândia, 2017.....21

TABELA 3- Erros absolutos obtidos pela diferença entre os graus de hiperidridicidade reais estimados por dez avaliadores, sem e com a utilização da escala, a partir de 60 plântulas de manjericão com sintomas de hiperidridicidade. Uberlândia, 2017.....23

Capítulo 3

TABELA 4- Tratamentos utilizados para multiplicação *in vitro* de *Ocimum basilicum* L. Uberlândia – MG, 2017.....32

TABELA 5- Resumo da análise de variância das características porcentagem de hiperidridicidade (%H), grau de hiperidridicidade (GH), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CR), número de raízes (NR), massa fresca (MF), massa seca (MS), índice de clorofila total (CT) e teor de água (TA) de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) cultivadas *in vitro* sob reguladores de crescimento e fontes de luminosidade. Uberlândia, MG, 2017.....34

TABELA 6- Porcentagem de hiperidridicidade (%) de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) micropagadas sob condições de luminosidade e reguladores de crescimento. Uberlândia, MG, 2017.....36

TABELA 7- Grau de hiperidridade de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) micropagadas sob condições de luminosas e reguladores de crescimento. Uberlândia, MG, 2017.....36

TABELA 8- Número de raízes de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) micropagadas sob condições de luminosidade e reguladores de crescimento. Uberlândia, MG, 2017.....37

TABELA 9- Comprimento de parte aérea (cm), comprimento de maior raiz (cm), massa fresca (g), massa seca (g), clorofila total (spad) e teor de água (%) de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) micropagadas com diferentes reguladores de crescimento. Uberlândia, MG, 2017.....38

TABELA 10- Comprimento de parte aérea (cm), comprimento de maior raiz (cm), massa fresca (g), massa seca (g), clorofila total (spad) e teor de água (%) de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) micropagadas sob lâmpadas brancas convencionais e lâmpadas Growlux. Uberlândia, MG, 2017.....39

Capítulo 4

TABELA 11- Tratamentos utilizados para multiplicação *in vitro* de *Ocimum basilicum* L. Uberlândia – MG, 2017.....49

TABELA 12- Resumo da análise de variância das características porcentagem de hiperidridicidade (%H), grau de hiperidridicidade (GH), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CR), número de raízes (NR), massa fresca (MF), massa seca (MS), índice de clorofila total (CT) e teor de água (TA) de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) cultivadas com concentrações de meio MS e com diferentes fontes de luminosidade.Uberlândia, MG, 2017.....51

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

FIGURA 1- *Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria Bonita).....5

FIGURA 1- Taxa fotossintética das plantas segundo o comprimento de onda de luz.....9

Capítulo 2

FIGURA 3– Escala para quantificação de hiperidricidade em plântulas de manjericão cultivadas *in vitro*. Uberlândia, 2017.....19

FIGURA 4– Plântulas de manjericão cultivadas *in vitro*, retiradas aleatoriamente do experimento, para validação da escala proposta. Uberlândia, 2017.....20

FIGURA 5–Relação entre o grau de hiperidricidade real e estimado de plântulas de manjericão, a partir da avaliação por dez avaliadores sem o uso da escala proposta (a) e com a utilização da escala (b). Uberlândia, 2017.....22

FIGURA 6– Erros absolutos (diferença entre o grau de hiperidricidade real e severidade estimada) registrados pela avaliação do grau de hiperidricidade por dez avaliadores, sem (a) e com (b) o uso da escala em 60 plântulas de manjericão cultivadas *in vitro*. Uberlândia, 2017.....23

Capítulo 3

FIGURA 7- Segmentos nodais de *Ocimum basilicum* L., cultivados sob lâmpadas fluorescentes brancas.....32

FIGURA 8- Segmentos nodais de *Ocimum basilicum* L., cultivados sob lâmpadas Growlux.....33

Capítulo 4

FIGURA 9- Segmentos nodais de *Ocimum basilicum* L. cultivados sob lâmpadas LED vermelha, verde, azul e lâmpadas fluorescentes brancas.....49

FIGURA 10- Porcentagem de hiperidricidade (A) e grau de hiperidricidade (B) de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) cultivadas com diferentes concentrações de sais do meio MS e diferentes fontes de luminosidade. Uberlândia MG, 2017.....53

FIGURA 11- Comprimento da parte aérea de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) cultivadas com diferentes concentrações de sais do meio MS e diferentes fontes de luminosidade. Uberlândia, MG, 2017.....54

FIGURA 12- Comprimento de maior raiz de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) cultivadas com diferentes concentrações de sais do meio MS e diferentes fontes de luminosidade. Uberlândia, MG, 2017.....55

FIGURA 13- Número de raízes de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) cultivadas com diferentes concentrações de sais do meio MS e diferentes fontes de luminosidade. Uberlândia, MG, 2017.....56

FIGURA 14- Massa Fresca (A) e massa seca (B) de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) cultivadas com diferentes concentrações de sais do meio MS e diferentes fontes de luminosidade. Uberlândia, MG, 2017.....58

FIGURA 15- Índice de clorofila total de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) cultivadas com diferentes concentrações de sais do meio MS e diferentes fontes de luminosidade. Uberlândia, MG, 2017.....59

CAPÍTULO 1

RESUMO

TRENTO, SABRINA DE MATOS. **Hiperidridicidade, luz e reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* de manjericão (*Ocimum basilicum* L.)** 2017. 64 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.¹

O manjericão, pertencente à família Lamiaceae, faz parte de um grupo de plantas medicinais e aromáticas de grande valor econômico, em virtude da qualidade do óleo essencial que produz. A utilização de técnicas de micropropagação em plantas aromáticas e medicinais proporciona produção em larga escala. Pela importância medicinal e econômica do manjericão, objetivou-se avaliar neste trabalho, o cultivo *in vitro* de *Ocimum basilicum* L. cv Maria Bonita por meio de diferentes fontes de luminosidade, reguladores de crescimento e concentrações de meio de cultura. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia-MG. Primeiramente, desenvolveu-se uma escala para avaliar o grau de hiperidridicidade de plântulas de manjericão cultivadas *in vitro*. No primeiro experimento, foram avaliados cinco reguladores de crescimento, 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN), esperimidina, espermina e putrescina, e duas fontes de luminosidade (lâmpadas fluorescentes brancas e lâmpadas Growlux). Por intermédio dos resultados obtidos, observou-se que a lâmpada Growlux mostrou-se mais promissora para o cultivo *in vitro* de manjericão. Em relação ao regulador de crescimento, a cinetina e a putrescina mostraram-se mais eficientes para o cultivo da espécie. No segundo experimento, foram avaliadas concentrações do meio MS (25, 50, 75 e 100%) e diferentes cores de lâmpadas LED (vermelho, verde e azul) além de lâmpadas brancas fluorescentes. Por meio das respostas obtidas, concluiu-se que o meio MS 100% induziu a uma maior quantidade de plântulas hiperídricas e as lâmpadas fluorescentes brancas propiciaram um melhor desenvolvimento das plântulas de manjericão. As conclusões obtidas se basearam na avaliação do comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), número de raízes (NR), massa fresca (MF), massa seca (MS), teor de água (TA), percentagem de hiperidridicidade (%H), grau de hiperidridicidade (GH) e índices de clorofila total (CT).

Palavras-chave: micropropagação; reguladores de crescimento; concentração de sais; lâmpadas.

¹Orientador: José Magno Queiroz Luz- UFU

ABSTRACT

TRENTO, SABRINA DE MATOS. Hyperhydricity, light and growth regulators *in vitro* cultivation of basil. 2017. 64p. Dissertation (Masters in Agronomy/Phytotechny) - Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG.¹

Basil, which belongs to the Family *Lamiaceae*, is part of a group of medicinal and aromatic plants of great economic value, due to the quality of the essential oil it produces. The use of micropropagation techniques in aromatic and medicinal plants enables their large scale production. Due to the medicinal and economic importance of basil, the objective of the present study was to analyze *in vitro* culture of *Ocimum basilicum* L. cv Maria Bonita using different sources of luminosity, growth regulators and culture medium concentrations. The experiments were carried out at the Biotechnology laboratory of the Federal University of Uberlândia-MG. First, a scale was developed to evaluate the degree of hyperhydricity of basil seedlings cultured *in vitro*. During the first experiment, five growth regulators such as 6-benzilaminopurine (BAP), kinetin (KIN), spermidine, spermine, putrescine and two sources of luminosity (white fluorescent lamps and Growlux lamps) were evaluated. The results obtained showed the Growlux lamps to be more promising for *in vitro* culture of basil. Regarding growth regulators, kinetin and putrescine proved to be more efficient for species multiplication. During the second experiment, MS medium concentrations (25, 50, 75 and 100%) and different LED lamp colors (red, green and blue) were assessed, as well as white fluorescent lamps. By means of the obtained results, it was concluded that the MS medium at 100% induced a greater quantity of hyperhydric seedlings, and the white fluorescent lamps, together with lower concentrations of salts, provided optimal development of basil seedlings. The conclusions collected in the present study were based on the evaluation of aerial portion length (CPA -> APL), root length (CR -> RL), number of roots (NR), fresh mass (MF -> FM), dry mass (MS -> DM), water content (TA -> WC), percentage of hyperhydricity (%H), degree of hyperhydricity (GH -> DH) and total chlorophyll indices (CT -> TCI).

Keywords: growth regulators, salt concentration, lamps.

¹Major: José Magno Queiroz Luz – UFU.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de substâncias químicas extraídas de plantas a serem utilizadas na fabricação de medicamentos para uso humano e de outros produtos, como inseticidas e fungicidas, tem sido significativa. Dessa forma, o uso de vegetais com o intuito de curar determinadas doenças vem apresentando mudanças, visto que o conhecimento empírico acumulado ao longo das gerações foi substituído pelas pesquisas refinadas em centros especializados (SILVA, 2005).

O manjericão (*Ocimum basilicum* L.) é uma planta aromática, pertencente à família Lamiaceae, utilizada desde os tempos antigos e cujas propriedades medicinais são consagradas pelo uso popular. Por apresentar óleos essenciais e princípios ativos importantes, o manjericão tornou-se alvo de muitas pesquisas, despertando grande interesse industrial para a utilização na área alimentícia, de fármacos e cosméticos (RABELO et al., 2003).

Segundo Blanck et al. (2007), o óleo essencial de manjericão da cultivar Maria Bonita apresenta elevado rendimento quando comparado a outras cultivares, possuindo substâncias de importância econômica, terapêutica e condimentar, como o linalol, o geraniol e o 1,8-cineol. O linalol tem ganhado espaço na agricultura em virtude de suas propriedades antimicrobianas, inseticidas e repelentes, sendo muito utilizado como composto de partida para várias sínteses importantes, como a do acetato de linalila, muito útil em operações curativas, preventivas e na conservação de grãos (FERNANDES et al., 2004).

Apesar da facilidade de obtenção de mudas pelo método convencional - por meio de sementes e estacas, os plantios com a espécie precisam ser formados a fim de se obter as características de interesse, as quais devem apresentar fuste ereto e crescimento uniforme, com isso melhorando seu rendimento (REIS et al., 2007). Além disso, uma das maiores dificuldades na utilização de espécies da família Lamiaceae para fins farmacêuticos é a variabilidade individual decorrente da heterogeneidade genética e bioquímica. Considerando tais limitações, torna-se necessário o desenvolvimento de estratégias alternativas que tenham como propósito a produção de mudas homogêneas, gerando biomassa para estudos farmacológicos, além de proteger o germoplasma existente.

Quando se trata de plantas medicinais, a preocupação não deve estar relacionada apenas com a produção quantitativa de biomassa por hectare, mas também com a riqueza dos princípios ativos contidos (STEFANINI et al., 2002). Por isso, o desenvolvimento de metodologias de micropropagação é um meio efetivo para a multiplicação rápida de espécies nas quais é necessário obter alta uniformidade de progênie e produção em larga escala.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição da espécie

O manjericão (*Ocimum basilicum* L.) é uma planta aromática e medicinal, originária da Índia. Também conhecido como alfavaca, alfavaca-cheirosa, basílico ou manjericão comum, é a espécie da família Lamiaceae mais intensamente cultivada no Brasil (RODRIGUES; SANTOS, 2005). Alguns autores relatam que sua implantação no país foi intensificada após a chegada dos imigrantes italianos, já que, para eles, a planta faz parte de uma tradição culinária muito forte (KÉITA et al., 2001).

A espécie apresenta caule ereto e ramificado, pode atingir aproximadamente um metro de altura. Suas folhas são delicadas, ovaladas, pubescentes e de cor verde-brilhante. As inflorescências são do tipo espiga e compostas por flores brancas, lilases ou avermelhadas. Sua polinização é cruzada e os frutos são do tipo aquênio, de coloração preto-azulada. Há mais de 60 variedades descritas, com variações na cor, tamanho e forma das folhas, porte da planta e concentração de aroma. As folhas do manjericão apresentam sabor e aroma doce e picante característico e são utilizadas secas ou frescas na preparação de diversos pratos quentes ou frios. Além disso, essas espécies são caracterizadas também pela presença de numerosos tricomas glandulares que recobrem a maior parte dos órgãos aéreos. A grande importância econômica dessa família se deve principalmente aos óleos essenciais produzidos e armazenados nessas estruturas (MARTINS, 1996).

O manjericão é utilizado principalmente na gastronomia, na indústria alimentícia, no paisagismo, na medicina popular, na indústria farmacêutica, de perfumes e na produção de óleos essenciais (ROSAS et al., 2004; LORENZI; MATOS, 2002; SIMÕES; SPITZER, 2003). Na gastronomia, as folhas verdes são usadas em massas, saladas e condimentos *in natura*, sendo que as folhas secas inteiras ou moídas integram molhos de tomate e pestos (DEBAGGIO; BELSINGER, 1996). As cultivares com folhas arroxeadas ou púrpuras também são utilizadas como plantas ornamentais (LORENZI; MATOS, 2002; SANTOS, 2007). Na medicina natural e fitoterapia, o manjericão é indicado como antisséptico, antibacteriano, antiflamatório, antimicrobiano e antioxidante (ÁVILA, 2008). O seu chá é estimulante digestivo, antiespasmódico gástrico e antireumático (LORENZI; MATOS, 2002). Na aromaterapia, por sua vez, é

utilizado para aliviar ansiedade, stress, depressão e fadiga, além de fortalecer o sistema nervoso central (GROSSMAN, 2005).

2.2 Cultivar Maria Bonita

Um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético para a cultura do manjericão é selecionar novas cultivares, cada vez mais uniformes e padronizadas em relação aos constituintes do óleo essencial. Desde 2000, o programa de melhoramento genético da Universidade Federal de Sergipe realiza muitas pesquisas para analisar o comportamento de acessos de manjericão e buscar aqueles que apresentam alta produção de óleo essencial e acessos ricos principalmente em linalol (BLANK et al., 2004; BLANK et al., 2007).

Segundo Blank et al. (2004), ao estudarem 55 genótipos diferentes de *Ocimum* sp., o acesso PI197442 (coloração: pétala – rósea e sépala – roxa, espécie *O.basilicum*) destacou-se no teor óleo essencial com 2,536 mL/100g e no rendimento de óleo essencial com 21,817 L/ha. Por intermédio do acesso PI 197442, do Banco de Germoplasma North Central Regional PI Station, EUA, Blank et al. (2007) desenvolveram a primeira cultivar nacional de manjericão (*Ocimum basilicum*, L.) registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, a qual foi denominada de Maria Bonita. Se comparada a outras cultivares, essa cultivar possui expressivo teor e rendimento de óleo essencial e apresenta como componentes majoritários o linalol, o geraniol e 1,8-cineol na sua composição química (BLANK et al., 2007).

A cultivar Maria Bonita possui comprimento médio de folha de 6,5 cm e largura de folha de 2,8 cm, largura média de copa de 45,70 cm, diâmetro médio do caule de 1,32 cm, altura média de 45,50 cm e hábito de crescimento ereto, o que favorece a sua colheita, tanto manual como mecanizada (Figura 1) (BLANK et al., 2007).



FIGURA 1 - *Ocimum basilicum*L. (cultivar Maria Bonita).

Fonte: www.ainfo.cnptia.embrapa.br

Essa espécie é comercialmente cultivada para utilização de suas folhas verdes e aromáticas, as quais são usadas frescas e secas como aromatizante ou tempero. Seu óleo essencial possui atividades anticonceptiva e antigiardial (BLANK et al., 2004).

Estudos indicam que uma das grandes limitações da utilização de espécies da família Lamiaceae para fabricação de remédios e cosméticos é sua grande variabilidade individual, em virtude da heterogeneidade genética e bioquímica. Além disso, o declínio no teor de princípios ativos ou de óleos essenciais em plantas medicinais é comum quando essas são cultivadas por longos períodos e submetidas a vários cortes. Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas que maximizem o cultivo de espécies medicinais é uma forma de assegurar a quantidade e a regularidade do fornecimento de matéria-prima, controlando os fatores que influenciam na sua qualidade fitoquímica e farmacológica e garantindo o fornecimento de princípios ativos de excelência (LOURENZANI et al., 2004; PINTO et al., 2008; CHAGAS et al., 2011).

2.3Cultura de tecidos vegetais

O cultivo *in vitro* é uma técnica que permite o crescimento de células, tecidos ou órgãos vegetais isolados a partir de uma planta-mãe, em meio nutritivo e em condições assépticas e ambientais (iluminação e temperatura) controladas (GEORGE, et al., 2008). A cultura de tecidos é uma importante ferramenta biotecnológica utilizada com sucesso para propagação clonal de plantas, obtenção de plantas livres de patógenos, melhoramento e transformação genética, fertilização *in vitro*, resgate de embriões, conservação de germoplasma e também para a produção de metabólitos secundários

(GEORGE, et al., 2008; ENGELMANN, 2011). Essa técnica pode ser empregada em diferentes espécies, incluindo as plantas medicinais e aromáticas, principalmente no que diz respeito à obtenção de genótipos produtores de compostos medicinais de interesse (COSTA et al., 2007).

A regeneração de plantas por meio do cultivo *in vitro* baseia-se no princípio da totipotência celular, proposto pelo fisiologista Haberlandt que, em 1902, relatou que as células vegetais possuíam o potencial genético para regenerar uma planta inteira (FLORES, 2006).

Dentre as técnicas da cultura de tecidos, a micropopragação é uma das que têm maior destaque por sua ampla aplicação prática e pela obtenção de resultados mais concretos (GRETTAPAGLIA; MACHADO, 1998; GEORGE, et al., 2008). Para as plantas aromáticas e medicinais, as técnicas de micropopragação utilizadas dependem, principalmente, dos objetivos da propagação e das características da planta em estudo. Dessa forma, sistemas de propagação por meio da cultura de meristemas, cultura de calos e segmentos nodais têm sido aplicados na multiplicação de plantas aromáticas e medicinais (BAJAJ et al., 1988).

A influência do genótipo sobre o comportamento *in vitro* tem mostrado que alguns ajustes devem ser realizados para distintos genótipos visando à otimização dos seus processos de micropopragação (EVANS et al., 1984).

Vários protocolos de micropopragação têm sido estudados para diversas espécies medicinais. Entretanto, o sucesso desse processo depende de alguns fatores, como tipo de explante, meio de cultura, regulador de crescimento, condições de incubação, dentre outros (DESCHAMPS, 1993; KOMALAVALLI; RAO, 2000).

2.4 Meios de cultura

Os componentes do meio de cultura podem afetar vários fatores do cultivo *in vitro*, por isso são estabelecidas várias modificações genótipo-específicas da composição do meio nutritivo, com intuito de promover melhorias no cultivo *in vitro* da espécie estudada (LONDE et al., 2012). Esses meios nutritivos nada mais são do que combinações de sais minerais (macro e micronutrientes), carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento, que podem ser sólidos, utilizando um agente solidificante,

ou líquidos, de acordo com o protocolo para o sistema de cultivo (CALDAS et al., 1998).

Os minerais incluídos na maioria dos meios utilizados na micropopragação de plantas foram definidos por White em 1951 e utilizados durante muitos anos como meio básico para diferentes espécies. O meio MS de Murashige e Skoog (1962) foi desenvolvido a partir de testes de suplementação do meio de White com extratos de folhas de fumo sendo uma das primeiras formulações melhoradas e utilizadas em cultura de tecidos de plantas, apresentando altos níveis de nitrato, potássio e amônio (GAMBORG et al., 1968). Atualmente, esse meio nutritivo é o mais utilizado para o desenvolvimento *in vitro* de plantas.

2.5 Reguladores de crescimento

O sucesso do cultivo *in vitro* de espécies vegetais depende de fatores associados à indução e ao controle da morfogênese quanto à regeneração de brotos e raízes no processo de organogênese, tornando-se imprescindível o controle da composição do meio de cultura (SOUZA et al., 2010).

Os eventos fisiológicos de germinação, crescimento e desenvolvimento que ocorrem nos vegetais representam um processo integrado e complexo, havendo uma estreita relação desses eventos com a ação dos hormônios vegetais. Inúmeros compostos sintéticos (reguladores de crescimento vegetal) reproduzem os efeitos dos hormônios endógenos e seu uso é rentável e bastante utilizado (ROSA et al., 2002). Diversas classes de reguladores vegetais têm sido empregadas nas técnicas de cultura de tecidos, com ênfase na suplementação do meio com auxinas e citocininas.

Conforme é relatado por Kieber (2004), as citocininas estão relacionadas aos processos fisiológicos de crescimento, incluindo a senescência foliar, a mobilização de nutrientes, a dominância apical, a formação e a atividade dos meristemas apicais, o desenvolvimento floral, a germinação de sementes e a quebra de dormência das gemas.

O tipo de citocinina e a sua concentração são fatores fundamentais para o bom desempenho da multiplicação *in vitro*. Grattapaglia e Machado (1998) ressaltam que as citocininas 6- benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN) são muito eficazes em promover a multiplicação de plantas e são as principais citocininas utilizadas no cultivo *in vitro* para melhorar a micropopragação, com aumento no número de gemas, folhas e brotos, e para induzir um acréscimo na produção de massa fresca e qualidade das

plantas cultivadas. Porém, embora sejam as mais utilizadas, não são ideais para todas as espécies (TORRES et al., 1998).

Juntamente com as citocininas e as auxinas, outra classe de substâncias que vêm sendo empregada para estimular o desenvolvimento vegetal *in vitro* são as poliaminas. A adição de poliaminas ao meio de cultura tem mostrado um efeito estimulador de crescimento em várias plantas (SCOTT et al., 1998), estando envolvidas na regulação do crescimento, divisão e diferenciação celular (RAJAM, 1997). Além disso, essas substâncias têm sido relatadas como antioxidantes eficientes em sistemas experimentais, exercendo este efeito por meio da proteção de componentes celulares, tais como membranas, ácidos nucléicos e ácidos graxos poli-insaturados, de danos oxidativos (LOVAAS, 1991; LOVAAS, 1996).

2.6 Qualidade e fontes de luz

Os vegetais utilizam a sinalização da qualidade de luz para a determinação do padrão de crescimento (ALMEIDA; MUNDSTOCK, 2001), crescendo sob uma região limitada do espectro visível e exibindo morfologia e fisiologia determinadas pelas variações nesse espectro (ESKINS; BEREMAND, 1990).

Alguns estudos relatam que alterações espectrais têm efeitos em processos de germinação de sementes, inibição do alongamento do hipocótilo, expansão dos cotilédones e das folhas, enverdecimento e biossíntese de pigmentos, alongamento do caule e indução do florescimento (SAITOU et al., 2004; TAIZ; ZIEGER, 2004; TSEGAY et al., 2005; WELLER et al., 2000).

Marks e Simpson (1999) concluíram que, com a variação na qualidade espectral, é possível manipular o crescimento *in vitro* de diversas espécies de uma maneira alternativa à adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura.

Segundo Erig e Schuch (2005), a qualidade da luz afeta a eficiência biológica dos fitorreguladores adicionados ao meio de cultura, bem como o balanço hormonal nos tecidos.

Para a realização da fotossíntese, os pigmentos vegetais absorvem de forma mais eficiente a energia proveniente de comprimentos de onda na faixa do azul (390 a 500 nm) e do vermelho (600 a 700 nm), refletindo a cor verde, característica da maioria das folhas (Figura 2).

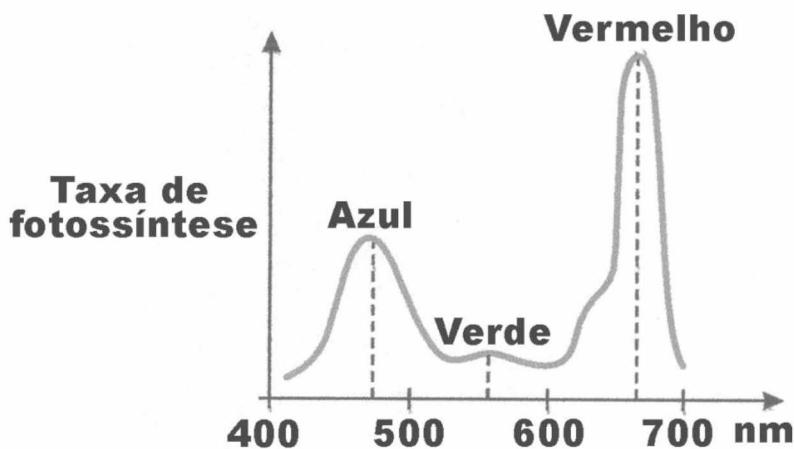


FIGURA 2 - Taxa fotossintética das plantas segundo o comprimento de onda de luz (SANTOS, 2011).

Embora as lâmpadas fluorescentes sejam comumente utilizadas nas salas de crescimento dos laboratórios de micropopulação (BULA et al., 1991), esse tipo de fonte de luz não é considerado como ótimo, pois essas lâmpadas são particularmente ricas em comprimentos de ondas azuis (SALISBURY; ROSS, 2012). Poucos estudos mencionam a utilização de lâmpadas Growlux no cultivo *in vitro*, sendo que esse tipo de lâmpada apresenta comprimentos de ondas azuis, laranjas e vermelhos.

As lâmpadas LED também possuem características mais avançadas do que as lâmpadas fluorescentes e incandescentes, comumente usadas como fontes de radiação convencional. Dentre essas características, destacam-se: o comprimento de onda específico, pequena massa e volume, longo período de vida e baixo aquecimento. Este último contribui para a aquisição de um sistema de resfriamento menos potente e que, consequentemente, consumirá menos energia (ROCHA et al., 2010; ROCHA et al., 2013).

Existem alguns trabalhos de avaliação do uso das lâmpadas LED como fonte de luz alternativa às lâmpadas tradicionais utilizadas na sala de cultivo *in vitro* de plantas de espécies como morangueiro (ROCHA et al., 2010) e orquídea (SKIN et al., 2008), entre outras. De acordo com esses autores, as LEDs têm contribuído para o aumento da quantidade de clorofila, número de brotações por explante e comprimento da brotação.

No entanto, estudos da qualidade de luz na micropopulação ainda são escassos e também não são claros os efeitos do espectro e dos níveis de irradiação no crescimento de plântulas durante o cultivo *in vitro*.

Por isso, sabendo que a qualidade da luz pode gerar respostas positivas no desenvolvimento dos vegetais *in vitro*, o seu estudo surge como uma ferramenta na

manipulação da indução de balanços fisiológicos favoráveis a respostas específicas no crescimento das plantas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. L.; MUNDSTOCK, C. M. O afilhamento da aveia afetado pela qualidade de luz em plantas sob competição. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31,n.3, p. 393-400, maio/jun. 2001.

ÁVILA, L.C. (Org.). **Índice terapêutico fitoterápico**. 1 ed. Petrópolis, RJ: EPUB, 2008,328 p.

BAJAJ, Y.P.S., FURMONOWA, M.; OLSZOWSKA, O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: BAJAJ, Y.P.S.(Ed.)**Biotechnology in agriculture and forestry**, Medicinal and Aromatic Plants I, Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, p. 60-103, 1988, v.4.

BLANK, A. F.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; SANTOS NETO, A. L.; ALVES, P. B.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M. C. Caracterização morfológica e agronômica de acessos de manjericão e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n.1, p.113-116, 2004.

BLANK, A.F.; SOUZA, E.M.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; PAULA,J.W.A.; ALVES, P.B. Novas cultivares maria bonita: cultivar de manjericão tipo linalol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.12, p.1811-1813, 2007.

BULA, R. J.; MORROW, T. W.; BARTA, D. J.; IGNATINS, R. W.; MARTINS, T. S. Light-emitting diodes as a radiation source for plants. **HortScience**, Wisconsin, v. 26, p. 203-205, feb., 1991.

CALDAS, L. S. et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. v.1. p.87-132.

CHAGAS, J. H.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; SANTOS, F. M. Produção de biomassa e teor de óleo essencial em função da idade e época de colheita em plantas de hortelã-japonesa. **Acta Scientiarum**. Agronomy. Maringá, v.33, n.2, p.327-334, 2011.

COSTA, A. S. et al. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.25, n.1, p.68-72, 2007.

DEBAGGIO, T; BELSINGER, S. **Basil: an herb lover's guide**. Colorado-USA: Interweave Press, 1996. 144p.

DESCHAMPS, C. **Propagação vegetativa *in vitro* de Sarandi** (*Sebastiana schottiana* MUELL. ARG.), espécie florestal de mata ciliar.1993. 128 f.Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1993.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cell and Developmental biology**, Gaithersburg,v.47,n.1,p.5-16, Feb, 2011.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e o uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.961-965, jul./ago. 2005.

ESKINS, K.; BEREMAND, P. D. Light-quality irradiance-level control of light-harvesting complex of photosystem 2 in maize mesophyll cells. Evidence for a low fluence rate threshold in blue-light reduction of mRNA and protein. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.78, n. 3, p.435-440, mar.1990.

EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; MEDINA-FILHO, H. P. Somaclonal and gametoclonal variation., **American Journal Botany**, New Jersey, n.71, v. 6, p. 759–774, 1984.

FERNANDES, P.C.; FACANALI, R.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; MARQUES, M.O.M. Cultivo de manjericão em hidroponia e em diferentes substratos sob ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, p.260-264, 2004.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de B-ecdisona em Pfaffia glomerata e Pfaffia tuberosa (AMARANTHACEAE)**. 2006.168 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements os suspension cultures of soyabean root cells. **Experimental Cell Research**, San Diego, v.50, n.1, p.151-158, 1968.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht: The Background, 2008.v.1, 709 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Org.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EmbrapaSPI/Embrapa-CNPH, 1998. p.183-260.

GROSSMAM, L. (Coord.). **Óleos essenciais:** na culinária, cosmética e saúde. São Paulo: Optionline, 2005, 301 p.

KÉITA, S. M., VINCENT, C.; SCHMIT J. P.; ARNASON, J. T.; BÉLANGER, A. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.). **Journal of Stored Products Research**.v.37, n.4, p. 339–349, 2001.

KIEBER, J. Citocininas: reguladores da divisão celular. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 517-540.

KOMALAVALLI, N.; RAO, M.V. In vitro micropropagation of *Gymnema sylvestre* - A multipurpose medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.61, n.2, p.97-105, 2000.

LONDE, L.N.; ALVES, K.A.; RIBEIRO, E.B. Efeito de concentrações de sacarose e de meio de cultura sobre a taxa de crescimento de mandioca variedade BGM 0116 conservadas *in vitro*. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, São Luiz, v.6, n.2, p. 67, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa:Instituto Plantarum, 2002.252p.

LOURENZANI, A.E.B.S.; LOURENZANI, W.L.; BATALHA, M.O. Barreiras e oportunidades na comercialização de plantas medicinais provenientes da agricultura familiar. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.34, n.3, mar., 2004.

LOVAAS, E. Antioxidative effects of polyamines. **Journal of the American Oil Chemical Society**, v. 68, p.353-8, 1991.

_____. Antioxidante and metal-chelatizing effects of polyamines. In: H. SIES (Org.). **Advances in pharmacology antioxidants in disease mechanisms and therapy**. New York: Academic Press, 1996. v.38, p.119-49.

MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.28, n.2, p.133-142, June 1999.

MARTINS, E.R. **Morfologia interna e externa caracterização isoenzimática e óleo essencial de Ocimum selloi benth.** 1996. 97 f. Dissertacão (Mestrado em Agronomia) –Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.5,n.3,p.473-497,1962.

PINTO, D.S.; TOMAZ, A.C.A.; TAVARES, J.F.; TENÓRIO-SOUZA, F.H.; DIAS, C.S.; BRAZ-FILHO, R.; CUNHA, E.V.L. Secondary metabolites isolated from Richardia brasiliensis Gomes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.367-372, 2008.

RABELO, M.; SOUZA, E.P.; SOARES, P.M.G.; MIRANDA, A.V.; MATOS, F.J.A; CRIDDLE, D.N. Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum Gratissimum* L. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto,v.36, n.4, p.521-524, Apr.2003.

RAJAM, M. V. Polyamines.In: PRASAD, M.N.V. (Ed.). **Plant Ecophysiology**.New York: J.Wiley, 1997. p.343-74.

REIS, I.N.R.; LAMEIRA, O.A.; CORDEIRO, I.M.C.C. Indução da Calogênese em Paricá (*Schizolobium parahyba var.amazonicum* através da adição de AIB e BAP. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p.501-503, jul., 2007.

ROCHA, P. S. G. et al. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 1922-1928, 2010.

_____. et al. Diodos emissores de luz e concentrações (LEDs) na micropropagação de amoreira-preta cv. Tupy. **Horticultura Argentina**, Mendoza, v. 32, n. 79, p. 14-19, 2013.

RODRIGUES M. F.; DOS SANTOS E. C. **Estudo da viabilidade financeira: implantação da cultura do manjericão para exportação.** UPIS, 2005. Disponível em: <http://www.upis.br/pesquisas/pdf/agronomia/projeto_empresarial/pesquisas/implantacao_manjericao1.pdf>. Acesso em 22/01/2017.

ROSA, F. A. F. da. **Síntese e avaliação da atividade reguladora de crescimento vegetal de novos compostos indólicos derivados do safrol e relacionados ao ácido indol-3-acético.** 2002. 144f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

ROSAS, J.F.; SILVA, A.C.M.; ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A. Comparação dos voláteis das folhas de *Ocimum micranthum* Willd. obtidos por hidrodestilação e destilação-extracção simultânea. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Paulínia, v. 7, p. 26-29, 2004.

SAITOU, T.; HASHIDUME, A.; TOKUTOMI, S.; KAMADA, H. Reduction of phytochrome level and light-induced formation of adventitious shoots by introduction of antisense genes for phytochrome A in horseradish hairy roots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 76, n.1 p.45-51, jan. 2004.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Fisiologia das plantas.** São Paulo: Cengage Learning, 2012. 774 p.

SANTOS, E. F. **Seleção de tipos de *Ocimum basilicum* L. de cor púrpura para o mercado de plantas ornamentais.** 2007. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

SCOTT, E. A.; DHUNDY, R.B.; SUBHASH, C.M. Metabolism of polyamines in transgenic cells of carrot expressing a mouse ornithine decarboxylase cDNA. **Plant Physiology**, v.116, p.299-307, 1998.

SILVA, F. G. **Teor de fenóis e óleos essenciais em calos, plântulas e plantas em carqueja *Baccharis trimera*.** 2005. 132 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) -Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, , 2005.

SIMÕES, C.M.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 5 ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003, p. 467-495.

SKIN, H. S. et al. The effect of light quality on the growth and development of in vitro cultured *Doritaenopsis* plant. **ActaPhysiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 30, p. 339-343, 2008.

SOUZA, C. R. et al. Influência do ácido giberélico sobre a arquitetura de plantas de feijão no início de desenvolvimento. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.32, n.2, p. 325-32, 2010.

STEFANINI, M. B.; RODRIGUES, S. D.; MING, L. C. Ação de fitorreguladores no crescimento da erva-cidreira-brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 18- 23, mar. 2002.

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

TSEGAY, B. A.; OLSEN, J. E.; JUNTILLA, O. Effect of red and far-red light on inhibition of hypocotyls elongation in ecotypes of *Betula pendula* Roth. **America Jounrnal of Biotechnology**, v.4, n.1, p.50-56, 2005.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. v.1, 509 p.

WELLER, J. L.; SCHREUDER, M. E. L.; SMITH, H.; KOORNNEEF, M.; KENDRICK, R. E. Physiological interactions of phytochromes A, B1 and B2 in the control of development in tomato. **Plant Journal**, Oxford, v.24, n.3, p. 345-346, nov. 2000.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE UMA ESCALA PARA QUANTIFICAÇÃO DO GRAU DE HIPERIDRICIDADE EM PLÂNTULAS DE MANJERICÃO CULTIVADAS *IN VITRO*

RESUMO

TRENTÓ, SABRINA DE MATOS. **Desenvolvimento de uma escala para quantificação do grau de hiperidricidade em plântulas de manjericão cultivadas *in vitro*.** 2017. 64 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.¹

A hiperidridicidade é um distúrbio morfológico, fisiológico e bioquímico desencadeado principalmente por fatores químicos, como os componentes do meio de cultura e o uso de reguladores de crescimento em altas concentrações. O manjericão é uma planta medicinal muito sensível a esses distúrbios fisiológicos, no entanto não existem na literatura estudos que quantifiquem a intensidade da hiperidridicidade ocasionada pelo cultivo *in vitro* dessa espécie. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma escala para quantificação de grau de hiperidridicidade em plântulas de manjericão cultivadas *in vitro*. Para a elaboração da escala, foram selecionadas duas plântulas que representassem o máximo e o mínimo grau de hiperidridicidade entre todas as plântulas do experimento e, a partir disso, foram escolhidas quatro plântulas com graus intermediários de hiperidridicidade. Dessa forma, a escala foi composta por seis níveis de intensidade de vitrificação: 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0, a qual foi validada por dez avaliadores sem experiência na quantificação desse distúrbio. Primeiramente, a intensidade de hiperidridicidade foi estimada pelos dez avaliadores sem auxílio da escala e, em seguida, com a utilização da escala proposta, em 60 plântulas aleatórias de manjericão, com níveis de intensidade heterogêneos. Regressões lineares simples, relacionando os valores das intensidades reais e intensidades estimadas, foram utilizadas para análise da acurácia dos avaliadores, enquanto os coeficientes de determinação e variância dos erros absolutos determinaram a precisão dos avaliadores. Constatou-se precisão nas estimativas visuais de intensidade desse distúrbio fisiológico pelo uso da escala proposta. A escala proposta é adequada para estimar a intensidade de hiperidridicidade em plântulas de manjericão, sendo possível sua utilização em pesquisas no cultivo *in vitro* da espécie.

Palavras chave: vitrificação, distúrbio fisiológico, *Ocimum basilicum* L.

¹Orientador: José Magno Queiroz Luz- UFU

ABSTRACT

TRENTO, SABRINA DE MATOS. **Development of a scale for quantification of the degree of hyperhydricity in basil seedlings cultivated *in vitro*.** 2017. 64 p. Dissertation (Masters in Agronomy/Phytotechny). Federal University of Uberlândia. Uberlândia, MG.¹

Hyperhydricity is a morphological, physiological and biochemical disorder triggered mainly by chemical factors such as culture medium components, especially the use of growth regulators in high concentrations. Basil is a medicinal plant very sensitive to these physiological disorders, however, there are no studies in the literature that quantify the intensity of hyperhydricity caused by *in vitro* cultivation of this species. The objective of this work was to develop and validate a scale for quantification of the degree of hyperhydricity in basil seedlings cultivated *in vitro*. For the construction of the scale, two seedlings were selected that represented the maximum and minimum degree of hyperhydricity among all the seedlings of the experiment and from that, four seedlings with intermediate degrees of hyperhydricity were chosen. Thus, the scale was composed of six levels of vitrification intensity: 0.0; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0 and 5.0, which was validated by ten evaluators with no experience in the quantification of this disorder. Firstly, the intensity of hyperhydricity was estimated by the ten evaluators without the aid of the scale, and then, using the proposed scale, in 60 random seedlings of basil, with heterogeneous intensity levels. Simple linear regressions relating the values of real intensities and estimated intensities were used to analyze the accuracy of the evaluators, while the coefficients of determination and variance of the absolute errors determined the accuracy of the evaluators. Accurate visual estimates of the intensity of this physiological disorder were found using the proposed scale. The proposed scale is adequate to estimate the hyperhydricity intensity in Basil seedlings, being possible to use them *in vitro* cultivation of the species.

Keywords: Vitrification, physiological disturbance, *Ocimum basilicum* L.

¹Major:: José Magno Queiroz Luz- UFU

1. INTRODUÇÃO

É inquestionável que as plantas cultivadas *in vitro* estão sob condição de estresse, visto que a alta umidade relativa, baixa intensidade luminosa, altas concentrações de sais presentes nos meios de cultura e os reguladores de crescimento podem, eventualmente, ocasionar uma desordem fisiológica e morfológica denominada de hiperidridicidade ou vitrificação (ZIV, 1991; FRANCK et al., 2004; SAHER et al., 2004).

Plantas hiperídricas caracterizam-se por apresentarem aspecto translúcido, caules largos e engrossados em diâmetro e com entrenós mais curtos que os de plantas normais, órgãos menos verdes e facilmente quebráveis, menor formação de raízes ou o não enraizamento, folhas grossas, frágeis, alongadas e/ou enrugadas e com alterações na densidade e distribuição dos estômatos, nas células-guarda, no número e espessura das camadas da epiderme e do tecido parenquimático e nas estruturas de defesa mecânica e química, além de desorganização dos tilacoides, menor número de cloroplastos e menor quantidade de clorofila (FONTES et al., 1999; GASPER et al., 1991; OLMOS; HELLÍN, 1998; SAEBO et al., 1995).

Além desses sintomas, plantas vitrificadas podem não sobreviver ao transplante para o solo na aclimatização, porque possuem menor teor de massa seca que as normais e são menos lignificadas, dentre outros fatores. Sendo assim, esse fenômeno pode causar perdas significativas no processo de propagação *in vitro*, inviabilizando cultivos comerciais de produção de mudas (HAZARIKA, 2006).

Entretanto, esse distúrbio fisiológico e morfológico é geralmente considerado reversível. Isso não significa que folhas hiperídricas, uma vez que estejam completamente formadas e maduras, revertam à sua estrutura normal, mas que novas brotações ou folhas recém-formadas em partes aéreas hiperídricas, após serem transferidas para meio ou ambiente não propício à ocorrência desse fenômeno, podem ter uma morfologia e anatomia similar a das plantas normais (KEVERS; GASPAR, 2004). Entretanto, esse distúrbio fisiológico e morfológico é geralmente considerado reversível. Isso não significa que folhas hiperídricas, uma vez que estejam completamente formadas e maduras, revertam à sua estrutura normal, mas que novas brotações ou folhas recém-formadas em partes aéreas hiperídricas, após serem transferidas para meio ou ambiente não propício à ocorrência desse fenômeno, podem ter uma morfologia e anatomia similar a das plantas normais (KEVERS; GASPAR,

2004). Sabendo que a hiperidridicidade pode ser reversível, estudos que avaliam quais fatores podem formar tecidos hiperídricos e que quantifiquem a intensidade de hiperidridicidade causada por cada fator podem auxiliar na classificação, prevenção e reversibilidade da vitrificação em plantas cultivadas *in vitro*. Por isso, o objetivo deste trabalho foi elaborar uma escala para mensurar o grau de hiperidridicidade ocasionado por reguladores de crescimento e concentrações de sais no cultivo *in vitro* de *Ocimum basilicum* L. A escala proposta é uma adaptação de escalas diagramáticas, sendo que os parâmetros de desenvolvimento, avaliação e validação pela observação da acurácia e precisão são amplamente utilizados para a elaboração de escalas diagramáticas na avaliação de severidade de doenças em plantas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento da escala foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, campus Umuarama. As plântulas utilizadas para a elaboração da escala foram selecionadas aleatoriamente, a partir do total de 420 plântulas de manjericão utilizadas para elaboração do primeiro experimento desta dissertação, com objetivo de testar diferentes reguladores de crescimentos (6-benzilaminopurina, cinetina, espermidina, espermina e putrescina) e duas fontes de luminosidade (lâmpadas fluorescentes brancas e lâmpadas Growlux) no cultivo *in vitro* de *Ocimum basilicum* L., conforme descrito no capítulo 3. Para o desenvolvimento de uma escala que pudesse representar fielmente os níveis de hiperidridicidade na população de plântulas do experimento, foram selecionadas duas plântulas que representassem o máximo e o mínimo grau de hiperidridicidade na população de plântulas. Posteriormente, foram designadas quatro plântulas com graus intermediários de hiperidridicidade, formando assim a escala proposta com seis níveis de hiperidridicidade: 0, 1, 2, 3, 4 e 5 (Figura 3).



FIGURA 3– Escala para quantificação de hiperidricidade em plântulas de manjericão cultivadas *in vitro*. Uberlândia, 2017. Fonte: Arquivo pessoal.

A validação da escala foi realizada em duas etapas. Na primeira, separou-se aleatoriamente 60 plântulas de manjericão em níveis heterogêneos de hiperidricidade dentre as 420 do experimento (Figura 4), para estabelecer os graus reais de hiperidricidade. Para a definição da nota real de hiperidricidade das 60 plântulas selecionadas, um único avaliador com experiência realizou a avaliação das plântulas por três vezes consecutivas, utilizando a escala proposta. O grau real de hiperidricidade foi estabelecido por meio da média das três notas atribuídas para cada plântula.

Na segunda etapa, foi realizada a validação efetiva da escala. Para isso, dez avaliadores sem experiência em avaliação desse distúrbio fisiológico foram convidados para avaliarem a intensidade hiperídrica dessas plântulas, primeiramente sem auxílio da escala e, em seguida, com a utilização da escala proposta.



FIGURA 4 – Plântulas de manjericão cultivadas *in vitro*, retiradas aleatoriamente do experimento, para a validação da escala proposta. Uberlândia, 2017. Fonte: Arquivo pessoal.

Para a análise da acurácia dos avaliadores, foram utilizadas regressões lineares simples, relacionando as notas reais e as notas estimadas de hiperidridicidade. No que concerne à precisão dos avaliadores, utilizou-se os coeficientes de determinação e variância dos erros absolutos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observados coeficientes angulares (a) médios de 0,977 e 0,896 sem e com a utilização da escala, respectivamente, entre os avaliadores. Já os coeficientes lineares (b) médios dos avaliadores foram de 0,062 e 0,130, respectivamente sem e com a utilização da escala (Tabela 2). Os valores de coeficiente angular e linear obtidos com a utilização da escala não evidenciaram melhoria da acuracidade dos avaliadores, quando comparado aos valores obtidos sem o uso da escala. Isso porque o valor médio do coeficiente angular distanciou-se de 1 e o valor médio do coeficiente linear distanciou-se de 0, como descrito por Mazaro et al. (2006), ao desenvolver a escala diagramática para avaliação da severidade de doença foliar na cultura do morango.

TABELA 2 - Coeficientes angulares (a), lineares (b) e de determinação (R^2) de equações de regressão linear simples, relacionando estimativas visuais e reais de grau de hiperidridicidade efetuadas por dez avaliadores, sem e com o uso da escala proposta, a partir de 60 plântulas de manjericão com sintomas de hiperidridicidade. Uberlândia, 2017.

Avaliador	Sem escala			Com escala		
	a	b	R²	a	b	R²
1	0,634	1,055	0,497	0,972	0,122	0,886
2	1,129	-0,550	0,872	1,039	0,157	0,925
3	0,983	0,454	0,847	1,038	0,040	0,855
4	0,914	0,763	0,764	0,860	0,741	0,801
5	1,132	-0,177	0,862	1,054	-0,007	0,869
6	1,179	-1,667	0,840	1,122	-0,329	0,846
7	1,083	0,003	0,864	1,060	0,140	0,886
8	0,951	0,477	0,819	1,079	-0,434	0,841
9	0,983	-0,210	0,752	0,869	0,531	0,801
10	0,790	0,478	0,635	0,875	0,340	0,795
Média	0,977	0,062	0,775	0,896	0,130	0,851

No entanto, a utilização da escala colaborou para um coeficiente de determinação (R^2) de 0,851 entre os avaliadores, enquanto a não utilização da escala refletiu em um coeficiente médio de determinação de 0,775. Tal situação nos leva a considerar que a utilização da escala contribuiu para o aumento da precisão da avaliação do grau de hiperidridicidade, haja vista que os valores estimados pelos avaliadores mostraram-se repetidamente mais próximos dos reais graus de hiperidridicidade. A figura 5A ilustra com clareza a maior dispersão das notas de hiperidridicidade estimadas em relação a notas reais sem a utilização da escala. A figura 5B, por sua vez, revela a maior aproximação dos graus estimados com os graus reais de hiperidridicidade com a utilização da escala.

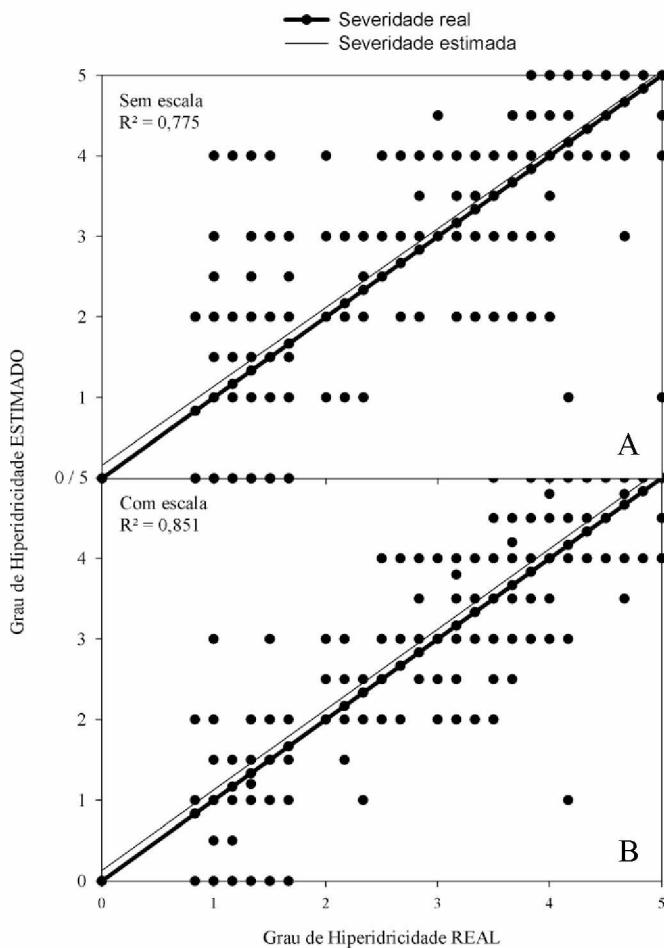


FIGURA 5–Relação entre o grau de hiperidricidade real e estimado de plântulas de manjericão, a partir da avaliação por dez avaliadores sem o uso da escala proposta (A) e com a utilização da escala (B). Uberlândia, 2017.

O aumento da precisão da avaliação do grau de hiperidricidade pela utilização da escala proposta foi constatado também ao se observar os erros absolutos (grau de hiperidricidade real menos o grau de hiperidricidade estimado) obtidos pelas avaliações dos dez avaliadores. Sem o uso da escala, foram observadas estimativas de até 4,00 graus superiores ao real grau, e de até -3,00 abaixo do real, sendo as médias de 1,72 e -1,78 graus, respectivamente. Por outro lado, o uso da escala contribui para a menor amplitude dos erros absolutos, haja vista que a máxima estimativa superior foi de 3,17, enquanto a estimativa inferior foi de -2,00, com média de 1,64 e -1,35, respectivamente (Tabela 3).

TABELA 3– Erros absolutos obtidos pela diferença entre os graus de hiperidricidade reais estimados por dez avaliadores, sem e com a utilização da escala, a partir de 60 plântulas de manjericão com sintomas de hiperidricidade. Uberlândia, 2017.

Avaliador	Sem escala	Com escala
-----------	------------	------------

	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo
1	2,00	-3,00	1,20	-1,00
2	1,33	-2,00	0,67	-1,33
3	1,17	-2,00	1,17	-1,33
4	1,17	-2,50	1,00	-2,00
5	1,50	-1,33	1,50	-1,33
6	1,67	-1,17	1,67	-1,50
7	1,17	-1,33	1,17	-1,33
8	1,17	-1,50	1,67	-1,17
9	2,00	-1,50	3,17	-1,33
10	4,00	-1,50	3,17	-1,17
Média	1,72	-1,78	1,64	-1,35

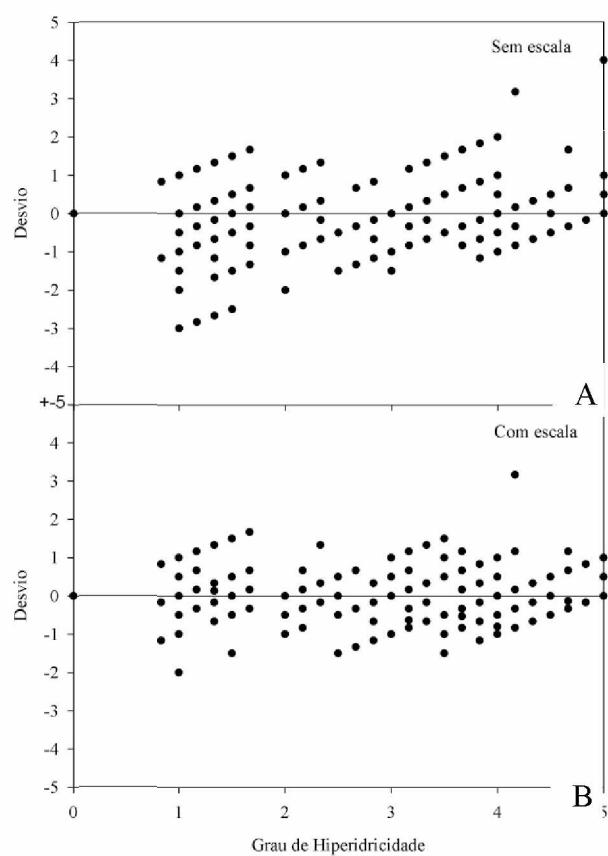


FIGURA 6– Erros absolutos (diferença entre o grau de hiperidricidade real e severidade estimada) registrados pela avaliação do grau de hiperidricidade por dez avaliadores, sem (a) e com (b) o uso da escala, em 60 plântulas de manjericão cultivadas *in vitro*. Uberlândia, 2017.

A figura 6 exemplifica como a precisão da avaliação do grau de hiperidricidade foi maximizada pela utilização da escala proposta. Os dados apontam a menor variabilidade dos erros absolutos pela utilização da escala (B) em comparação com os dados obtidos sem a utilização da escala proposta (A), ou seja, as superestimações e

subestimações dos graus de hiperidridicidade pelos avaliadores foram reduzidas pela utilização da escala.

O aumento da precisão de uma escala diagramática com os mesmos princípios de construção e avaliação também foi verificado por Malagi et al.(2011) e Citadin et al. (2008), estudando a severidade de doenças em milho e pêssego, respectivamente. Isso demonstra que esse método é eficaz para validação de escalas.

4. CONCLUSÃO

Se, por um lado, a escala proposta não contribuiu para o aumento da acuracidade dos avaliadores, ela demonstrou um aumento de precisão da avaliação por eles realizada.

O aumento da precisão por meio da utilização da escala proposta e a falta de outras escalas na literatura que quantifiquem o grau da hiperidridicidade em plantas cultivadas *in vitro* justificam o seu emprego nesse e em futuros trabalhos com a espécie.

REFERÊNCIAS

CITADIN, I.; ASSMANN, A. P.; MAZARO, S. M.; GOUVEA, A. G.; DANNER, M. A.; MALAGI, G. Escala diagramática para avaliação da severidade de bacteriose em pêssego. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.2, p.327-330, jun. 2008.

FONTES, M. A. OTONI, W. C.; CAROLINO, S. M. B.; et al. Hyperhydricity in pepper plants regenerated in vitro: involvement of BiP (Binding Protein) and ultrastructural aspects. **Plant Cell Reports**, New York, n. 19, p. 81- 87, 1999.

FRANCK, T.; KEVERS, C.; GASPAR, T.; DOMMES, J.; DEBY, C.; GREIMERS, R.; SERTEYN, D.; DEBY-DUPONT, G. Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelride: a controlled stress response. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 519-527, 2004.

GASPER, T.; HAGÈGE, D.; KEVERS, C.; et al. When plant teratomas turn into cancers in the absence of pathogens. **Physiologia Plantarum, Lund**, v.83, n.4, p.96-701, 1991.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 105-120, 2006.

KEVERS, C.; GASPAR, T. Vitrification of carnation *in vitro*: changes in water content, extracellular space, air volume, and ion levels. **Physiologie Végétale**, v.244, p.647-653, 1986.

MALAGI, G.; SANTOS, I.; CAMOCHENA, R.C.; MOCELLIN, R. Elaboração e validação da escala diagramática para avaliação da mancha branca do milho. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.42, n.3, p.797-804, jul-set. 2011.

MAZARO, S. M.; GOUVEA, A.; MIO, L.L.M.; DESCHAMPS, C.; BIASI, L.A.; CITADIN, I. Escala diagramática para avaliação de severidade da mancha-de-dendrophoma em morango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, p. 1630-1633, 2006.

OLMOS, E.; HELLÍN, E. Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 75, p. 91-101, 1998.

SAEBO, A.; KREKLING, I. T.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 41, n. 2, p. 177-185, 1995.

SAHER, S.; PIQUERAS, A.; HELLIN, E.; OLMOS, E. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 120, p. 152-161, 2004.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh, P.C.; Zimmerman, R.H. *Micropropagation: Technology and Applications*, Dordrech: **Kluwer Academic Publicashers**, p.45-69, 1991.

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE *Ocimum basilicum* L. SOB DIFERENTES FONTES DE LUMINOSIDADE E REGULADORES DE CRESCIMENTO

RESUMO

TRENTI, SABRINA DE MATOS. **Desenvolvimento *in vitro* de segmentos nodais de *Ocimum basilicum* L. sob diferentes fontes de luminosidade e reguladores de crescimento.** 2017. 64 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.¹

O *Ocimum basilicum* L. tem sido alvo de muitas pesquisas em razão de características importantes, tais como a utilização na área alimentícia, de fármacos e cosméticos. Apesar da facilidade de se obter mudas pelo método convencional, por meio de sementes e estacas, os plantios com a espécie precisam ser formados a fim de se obter características de interesse. O desenvolvimento de metodologias de micropropagação é um meio efetivo para a multiplicação rápida de espécies nas quais é necessário obter alta uniformidade de progénie. Então, há um grande interesse de utilização dessas técnicas para ampliar a propagação de plantas medicinais e aromáticas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi testar diferentes reguladores de crescimento (6-benzilaminopurina - BAP, cinetina - KIN, espermidina, espermina e putrescina) e duas fontes de luminosidade (lâmpadas fluorescentes brancas e lâmpadas Growlux) no cultivo *in vitro* de manjericão. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados (DBC) com seis tratamentos e seis repetições. Cada parcela foi constituída de seis tubos de ensaio com um único explante por tubo. Aos 60 dias após a inoculação dos explantes foram avaliados os seguintes aspectos: comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), número de raízes (NR), massa fresca (MF), massa seca (MS), teor de água (TA), percentagem de hiperidridicidade (%H), grau de hiperidridicidade (GH) e clorofila total (CT). Com base nas melhores respostas, concluiu-se que os reguladores de crescimento cinetina e putrescina sob as lâmpadas Growlux mostraram-se mais promissores para o cultivo *in vitro* de manjericão.

Palavras-chave: fitorreguladores; cultivo *in vitro*; poliaminas.

¹Orientador: José Magno Queiroz Luz- UFU

ABSTRACT

TRENTO, SABRINA DE MATOS. *In vitro development of nodal segments of Ocimum basilicum L. under different sources of luminosity and growth regulators*.2017.64 p. Dissertation (Mastersin Agronomy/Phytotechny).Federal University of Uberlândia. Uberlândia, MG.¹

Ocimum basilicum L. has been the topic of many studies due to important aspect such as its inclusion in the fields of nutrition, pharmaceuticals and cosmetics. Despite the easiness of conventionally attaining seedlings by seeds and cuttings, planting of the species is necessary in order to obtain characteristics of interest. The development of micropropagation techniques is an effective means for rapid multiplication of species in which achieving high progeny uniformity is necessary. Therefore, there is great interest in the use of these methodologies to increase propagation of medicinal and aromatic plants. In view of this, the objective of the present study was to evaluate different growth regulators (6-benzilaminopurine - BAP, cinetina - KIN, spermidine, spermine and putrescine) and two sources of luminosity (white fluorescent lamps and Growlux lamps) in the *in vitro*culture of basil. The experimental design used consisted of randomized blocks (DBC -> DRB) with six treatments and six repetitions. Each plot consisted of six test tubes containing a single explant per tube. After 60 days post explant inoculation, the following criteria were analyzed: aerial portion length (CPA -> APL), root length (CR -> RL), number of roots (NR), fresh mass (MF -> FM), dry mass (MS -> DM), water content (TA -> WC), percentage of hyperhydricity (%H), degree of hyperhydricity (GH -> DH) and total chlorophyll (CT -> TC). Based on the optimal results, the use of Kinetine and Putrescine regulators under Growlux lamps showed to be more promising for *in vitro* culture of basil.

Keywords: phytoregulators, *in vitro* culture, polyamines.

¹Major: José Magno Queiroz Luz – UFU.

1. INTRODUÇÃO

O manjericão (*Ocimum basilicum* L.) é uma das ervas mais populares e úteis na culinária em virtude de seu aroma e fragrância. As principais formas de utilização são o manjericão fresco, seco ou seu óleo essencial, sendo esta última a que apresenta maior valor agregado. O óleo essencial é rico em linalol, componente utilizado em várias sínteses, como o acetato de linalila, utilizado em grande quantidade para fixar fragrâncias, como nos perfumes finos de alto valor agregado (JOSÉ, 2014).

A importância do manjericão é notória, evidenciando que mais estudos devem ser desenvolvidos no sentido de se avaliar os aspectos fitotécnicos dessa espécie, garantindo a conservação de suas propriedades químicas.

A cultura de tecidos vegetais tem sido considerada uma ferramenta promissora para a preservação de fontes vegetais, bem como para a propagação comercial de plantas medicinais (ABREU, 1998).

Um dos fatores fundamentais para o sucesso do cultivo *in vitro* de qualquer cultura é a escolha do meio de cultivo adequado, que servirá não apenas como suporte para o desenvolvimento vegetal, mas também como fonte de nutrientes para o explante utilizado.

Estudos indicam que o uso de reguladores de crescimento pode potencializar o crescimento de plantas cultivadas *in vitro*. Conforme Torres et al. (1998), o acréscimo de reguladores de crescimento ao meio de cultivo é utilizado para suprir possíveis deficiências endógenas e melhorar as características de cultivo *in vitro*. O crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e balanço dos reguladores de crescimento existentes no meio de cultura, principalmente as auxinas e citocininas.

As citocininas são utilizadas para quebrar a dominância apical dos brotos e aumentar a taxa de multiplicação (GRIMALDI et al., 2008). O regulador de crescimento 6- benzilaminopurina (BAP) é uma das principais citocininas utilizadas na cultura de tecidos e é adicionada ao meio de cultura para proporcionar, principalmente, o aumento no número de gemas, folhas e brotos, e para induzir um acréscimo na produção de massa fresca e qualidade das plantas cultivadas.

Outras substâncias que podem contribuir para o crescimento vegetal *in vitro* e que têm sido denominadas como uma nova classe de reguladores de crescimento são as poliaminas. Essas substâncias são encontradas em todas as células vegetais, porém sua função só começou a ser investigada recentemente.

As poliaminas têm sido localizadas no vacúolo, mitocôndrias e cloroplastos e parecem estar envolvidas em um grande número de processos bioquímicos nos vegetais. Rajam (1997) e Kumar et al. (1997) sugerem a atuação das poliaminas durante o crescimento e desenvolvimento celular, incluindo a estabilização das duplas hélices do DNA, divisão celular, desenvolvimento de órgãos, senescência foliar, amadurecimento de frutos, tuberização e respostas a mudanças ambientais. Poliaminas exógenas (putrescina, espermidina e espermina), em combinação com outros reguladores de crescimento, têm se mostrado eficientes na multiplicação de brotos e indução de raízes de diversas espécies vegetais (DAVIES; OLSON, 1994; MIRZA; REHMAN, 1998; TASSONI et al., 2000).

Contudo, o principal fator que regula o crescimento vegetal é a luz. A irradiância luminosa afeta de forma complexa todas as etapas do crescimento e desenvolvimento das plantas.

Geralmente, a principal fonte de luminosidade utilizada em salas de crescimento de cultura de tecidos é a lâmpada fluorescente branca. Pouco se sabe sobre o comportamento do manjericão exposto a outras fontes luminosas.

Diante do exposto, objetivou-se, neste trabalho, avaliar o efeito de alguns reguladores de crescimento e de fontes de luminosidade no desenvolvimento *in vitro* de manjericão, especificamente da cultivar Maria Bonita.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. As sementes de *Ocimum basilicum* L. foram lavadas com 100 mL de água destilada e 3 gotas de detergente neutro. Em câmara de fluxo laminar, foram enxaguadas três vezes com água destilada e autoclavada. Em seguida, elas foram desinfestadas com uma solução de hipoclorito de cálcio a 1% por 5 minutos e, posteriormente, imersas em hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos e novamente enxaguadas com água destilada e autoclavada. Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em frascos contendo quarenta mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 1,8 g L⁻¹ de Phytagel, 3% de sacarose e com pH ajustado para 5,7 e autoclavado a 121° C e 1,2 atm durante 20 minutos. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas por dia, temperatura de 25±2°C, com intensidade luminosa de 52,5W m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes. Esses procedimentos foram realizados para obtenção das plântulas de manjericão e para a instalação do experimento depois de 60 dias.

Na instalação do experimento, segmentos nodais de aproximadamente 1 cm, provenientes do estabelecimento prévio de sementes *in vitro*, foram inoculados individualmente em tubos de ensaio (25x150mm) contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de 6- benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN), espermidina, espermina e putrecina, com adição de 30 g L⁻¹ de sacarose. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 e, em seguida, o meio foi autoclavado a 121°C e 1,2 atm durante 20 minutos, antes da inoculação dos explantes.

Após a inoculação, os tubos de ensaio transparentes foram vedados com tampas de polipropileno, filme PVC e mantidos em sala de crescimento convencional, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C, sob duas condições luminosas: lâmpadas fluorescentes brancas (Fluo. Branca) (Figura 7) e lâmpadas Growlux (Figura 8), caracterizando, então, dois experimentos independentes para análise estatística conjunta.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (DBC) com seis tratamentos e seis repetições (Tabela 4). Cada parcela experimental consistiu de seis tubos de ensaio, sendo que cada tubo de ensaio continha um explante.

TABELA 4. Tratamentos utilizados para multiplicação *in vitro* de *Ocimum basilicum* L. Uberlândia – MG, 2017.

Tratamento	Tipo de lâmpada	Regulador de crescimento	Concentração (mg L ⁻¹)
T1	Fluo. Branca	Testemunha	0,0
T2	Fluo. Branca	BAP	0,5
T3	Fluo. Branca	KIN	0,5
T4	Fluo. Branca	Espermidina	0,5
T5	Fluo. Branca	Espermina	0,5
T6	Fluo. Branca	Putrescina	0,5
T1	Growlux	Testemunha	0,0
T2	Growlux	BAP	0,5
T3	Growlux	KIN	0,5
T4	Growlux	Espermidina	0,5
T5	Growlux	Espermina	0,5
T6	Growlux	Putrescina	0,5



FIGURA 7 – Segmentos nodais de *Ocimum basilicum* L. cultivados sob lâmpadas fluorescentes brancas. Fonte: Arquivo pessoal



FIGURA 8 – Segmentos nodais de *Ocimum basilicum* L. cultivados sob lâmpadas Growlux. Fonte: Arquivo pessoal

Após 60 dias de inoculação dos segmentos nodais, foram avaliadas as seguintes características das plântulas: percentagem de hiperidridicidade (%), grau de hiperidridicidade (notas), comprimento parte aérea (cm), comprimento de raízes (cm), número de raízes, massa fresca (g), massa seca (g), clorofila (SPAD), e teor de água (%) das plântulas.

Por meio do programa estatístico SPSS Statistics foram testadas as pressuposições de normalidade dos resíduos, homogeneidade das variâncias e aditividade de blocos, com os testes de Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov ($\alpha = 0,01$), Levene e Tukey ($\alpha = 0,01$).

Realizou-se uma análise conjunta do experimento com o programa estatístico Genes (CRUZ, 2006). Sendo os dados qualitativos, as médias foram comparadas com a aplicação do teste de Tukey a 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do resumo da análise de variância (Tabela 5), observa-se que houve interação significativa entre os fatores apenas para as seguintes variáveis: porcentagem de hiperidridicidade (%H), grau de hiperidridicidade (GH) e número de raízes (NR). Já para as características: comprimento de parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CR), massa fresca (MF), massa seca (MS), clorofila (CL) e teor de água (TA), a interação não foi significativa, o que caracteriza independência dos fatores estudados. Assim, esses fatores foram analisados isoladamente.

TABELA 5- Resumo da análise de variância das características porcentagem de hiperidridicidade (%H), grau de hiperidridicidade (GH), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CR), número de raízes (NR), massa fresca (MF), massa seca (MS), índice de clorofila total (CT) e teor de água (TA) de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) cultivadas *in vitro* sob diferentes reguladores de crescimento e fontes de luminosidade.

FV	GL	%H	GH	CPA	CR	NR	MF	MS	CT	TA
Regulador	5	8,86*	59,23*	29,69*	11,27*	14,24*	21,51*	7,10*	1,69 ^{ns}	4,67*
Luz	1	8,26*	57,32*	24,21*	23,82*	5,41*	30,37*	43,0*	9,80*	0,32 ^{ns}
Reg x Luz	5	3,36*	3,69*	1,27 ^{ns}	0,58 ^{ns}	9,92*	1,96 ^{ns}	1,27 ^{ns}	1,57 ^{ns}	0,17 ^{ns}
CV (%)		25,25	18,85	21,31	38,20	30,19	23,50	24,72	24,86	2,14
Média geral		73,1	2,54	4,61	3,35	13,32	0,82	4,46	20,10	94,28

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, ^{ns} não significativo pelo teste F.

Dentre as duas fontes de luminosidade testadas, as lâmpadas Growlux, em conjunto com o regulador de crescimento cinetina e a testemunha, favorecem uma menor porcentagem de plântulas hiperídricas (Tabela 6).

TABELA 6 - Porcentagem de hiperidridicidade (%) de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) micropropagadas sob diferentes reguladores de crescimento e condições de luminosidade. Uberlândia, MG, 2017.

Regulador de crescimento	Concentração (mgL ⁻¹)	% de Hiperidridicidade		
		Convencional	Growlux	
Testemunha	0,0	88,88	A ab	52,21
BAP	0,5	100,00	A a	93,33
KIN	0,5	63,88	A b	38,33
Espermidina	0,5	59,71	A b	80,28
Espermina	0,5	88,33	A ab	81,66
Putrescina	0,5	69,71	A ab	60,83
(CV%)		25		

Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Em relação ao grau de hiperidridicidade, ou seja, a intensidade de vitrificação das plântulas, observou-se que as plântulas mostraram-se menos hiperídricas quando cultivadas sob lâmpadas Growlux para todos os reguladores de crescimento, exceto quando cultivadas com BAP, quando se mostraram com maior grau de vitrificação (Tabela 7).

TABELA 7 - Grau de hiperidridade de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) micropagadas sob diferentes reguladores de crescimento e condições de luminosidade. Uberlândia, MG, 2017

Regulador de Crescimento	Concentração (mgL ⁻¹)	Grau de Hiperidridicidade	
		Convencional	Growlux
Testemunha	0,0	2,59 Ab	1,45 Bbcd
BAP	0,5	4,73 Aa	4,54 Aa
KIN	0,5	2,32 Ab	1,39 Bcd
Espermidina	0,5	2,53 Ab	1,87 Bbc
Espermina	0,5	3,01 Ab	2,21 Bb
Putrescina	0,5	2,80 Ab	1,01 Bd
(CV%) 18			

Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Costa et al. (2015) também observaram a presença de muitas plantas hiperídricas ao testarem doses de BAP na multiplicação *in vitro* do híbrido de manjericão Sweed Dani x Maria Bonita.

Além disso, a presença de citocinina foi associada à ocorrência de hiperidridicidade em culturas de ápices caulinares de *Lisianthus* (PAEK; HAHN, 2000).

Segundo Barbosa (2006), a adição de BAP no meio de cultivo induz ao estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes e da peroxidação de lipídios, além de alterações em nível celular, como malformações de estômatos e de células epidérmicas, e aumento na produção e acúmulo de etileno no interior dos frascos de cultivo, ocasionando, então, a formação de tecidos hiperídricos.

Segundo Kevers et al. (1986), outro fator que pode promover a hiperidridicidade nas plantas cultivadas *in vitro* é o desequilíbrio dos componentes do meio de cultura, principalmente no que se refere à concentração de sais e a concentrações elevadas de reguladores de crescimento. Ademais, as condições atmosféricas do ambiente de cultivo podem induzir a formação de tecidos hiperídricos.

No presente estudo, além dos reguladores de crescimento, o que pode ter favorecido o aparecimento de muitas plântulas hiperídricas é o agente geleificante

utilizado, o Phytigel. Alguns autores relatam a preferência pela utilização desse agente geleificante em comparação à utilização de ágar, pois o Phytigel proporciona resultados semelhantes ao ágar em relação à solidificação do meio, mesmo quando utilizado em doses inferiores. Entretanto, de acordo com Franck et al. (1997), sua estrutura física parece permitir uma maior absorção de substâncias que podem induzir hiperidridicidade, como citocininas, íons amônio e água e, com isso, causar ou aumentar a porcentagem de hiperidridicidade de brotos regenerantes.

Estudos realizados pelo mesmo autor, nos quais é comparada a utilização de ágar e Phytigel em conjunto com o uso de BAP na indução de hiperidridicidade em duas variedades de *Prunus avium*, mostraram que a utilização de Phytigel em combinação com doses de BAP de 0,5 a 2,0 mgL⁻¹ induziram a uma maior quantidade de brotos hiperídricos, em comparação às mesmas doses que usaram ágar.

Outro fator que pode favorecer o aparecimento de tecidos hiperídricos é o excesso de vapor de água na atmosfera do frasco. A diminuição da umidade relativa é obtida com a mudança para um tipo de vedação dos frascos que melhor permita as trocas gasosas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Ivanova et al. (2010) estudaram a ventilação para reduzir hiperidridicidade em culturas de tecidos de *Aloe polyphylla* e verificaram que a troca gasosa entre a atmosfera *in vitro* e o ambiente externo é um pré-requisito essencial para controlar a hiperidridicidade. Ademais, perceberam que, no cultivo com ventilação promovida por modificação nas vedações dos recipientes, a hiperidridicidade foi completamente eliminada.

Sendo assim, novos experimentos devem ser realizados testando a utilização de ágar em combinação com os mesmos reguladores de crescimento e diferentes formas de vedação de frascos para a verificação dos níveis de hiperidridicidade em manjericão cultivar Maria Bonita.

Para a característica referente ao número de raízes (Tabela 8), observa-se que o regulador poliamínico putrescina, em conjunto com a utilização de lâmpadas Growlux, favoreceu um maior número de raízes nas plântulas micropropagadas de manjericão. Já a utilização do regulador BAP ocasionou plântulas com menor quantidade de raízes tanto nas lâmpadas Growlux como nas lâmpadas convencionais.

Esses resultados corroboram com o encontrado por Souza et al. (2015) ao testarem diferentes concentrações e tipos de poliaminas em *Anemopaegma arvense*, pois observaram que a maior porcentagem de enraizamento foi obtida com a utilização de 0,5 mg L⁻¹ de putrescina, em comparação com espermidina e espermina.

TABELA 8- Número de raízes de plântulas de Manjericão (*Ocimum basilicum* L.) micropagadas sob diferentes reguladores de crescimento e condições de luminosidade. Uberlândia, MG, 2017.

Regulador de Crescimento	Concentração (mgL ⁻¹)	Nº de Raízes	
		Convencional	Growlux
Testemunha	0,0	13,82 Aa	16,34 Ab
BAP	0,5	4,47Ab	6,11 Ac
KIN	0,5	12,40 Aa	13,63 Ab
Espermidina	0,5	15,01 Aa	14,13 Ab
Espermina	0,5	11,95 Aa	15,04 Ab
Putrescina	0,5	13,17 Ba	23,83 Aa
(CV%) 30			

Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Em relação às respostas dos reguladores de crescimento (Tabela 9) para as características comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz, (CR), massa fresca (MF), massa seca (MS), clorofila total (CT) e teor de água (TA), pode-se observar que, para o comprimento da parte aérea, a utilização de putrescina e a testemunha diferiram da utilização de BAP, apresentando plantas de maior tamanho. Entretanto, não diferiram estatisticamente dos demais reguladores de crescimento.

TABELA 9- Comprimento de parte aérea (cm), comprimento de maior raiz (cm), massa fresca (g), massa seca (g), Clorofila total (spad) e teor de água (%) de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) micropagadas sob diferentes reguladores de crescimento. Uberlândia, MG, 2017.

Tratamento	CPA (cm)	CR (cm)	MF(g)	MS(g)	CT(spad)	TA(%)
Testemunha	5,6 a**	3,2 ab*	0,70 ab**	0,03 ns	21,4 ns	94,4 ns
BAP	1,6 b	1,1 b	0,53 b	0,04	18,9	91,8
KIN	5,1 ab	5,4 a	1,29 a	0,05	20,4	95,4
Espermidina	4,9 ab	3,2 ab	0,83 ab	0,04	21,8	95,0
Espermina	4,4 ab	2,9 ab	0,71 ab	0,03	16,8	94,8
Putrescina	5,8 a	3,5 ab	0,84 ab	0,04	21,1	94,1

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns Não significativo.* e ** Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.

O efeito deletério da adição de BAP no meio de cultura pode ter ocorrido porque a presença elevada da concentração de sais pode interferir na regulação osmótica do meio de cultura e, consequentemente, na disponibilidade de água no processo de desenvolvimento da planta.

Outro fator que pode ter levado à diminuição no comprimento da parte aérea das plântulas com a utilização de BAP é que essa citocinina induz à formação de um maior número de brotações, e estas competirem entre si por nutrientes no meio de cultura (ROCHA et al., 2007).

Esse resultado corrobora com o encontrado por Oliveira et al. (2012), que testaram diferentes concentrações de BAP na micropropagação de porta-enxertos de pêssego e observaram que maiores comprimentos de parte aérea foram obtidos com meio de cultura sem BAP.

Com relação à característica de massa fresca (MF), houve diferença entre os reguladores KIN e BAP, mas eles não diferiram dos demais reguladores utilizados. A adição de cinetina no meio promoveu um aumento no teor de massa fresca das plântulas em detrimento da utilização de BAP.

Esse resultado contradiz o encontrado por Asmar et al. (2012), que testaram concentrações de BAP na proliferação de brotos de *Lippia alba*. Esses autores usaram BAP na mesma concentração utilizada neste experimento de 0,5 mg L⁻¹, e obtiveram um aumento nos teores de massas fresca e seca da espécie.

Ademais, não houve diferença significativa para as características: massa seca (MS), clorofila total (CT) e teor de água (TA).

Para as características de comprimento de parte aérea, comprimento de maior raiz, massa fresca, massa seca e clorofila em relação às fontes de luminosidade (Tabela 10), a utilização de lâmpadas Growlux proporcionou melhores respostas no cultivo *in vitro* do manjericão Maria Bonita. No entanto, o teor de água nas plantas não diferiu estatisticamente entre as duas fontes de luminosas.

TABELA 10 - Comprimento de parte aérea (cm), comprimento de maior raiz (cm), massa fresca (g), massa seca (g), Clorofila total (spad) e teor de água (%) de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) micropropagadas sob lâmpadas brancas convencionais e lâmpadas Growlux. Uberlândia, MG, 2017.

Lâmpada	CPA (cm)	CR (cm)	MF(g)	MS(g)	C(SPAD)	TA(%)
Growlux	5,28 a ^{**}	3,95 a ^{**}	1,01 a ^{**}	0,056 a ^{**}	21,99 a [*]	94,20 ns
Convencional	3,94 b	2,75 b	0,62 b	0,033 b	18,22 b	94,36

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
ns Não significativo.* e ** Significativo a 5% e 1% de probabilidade respectivamente.

Para a realização da fotossíntese, os pigmentos vegetais absorvem de forma mais eficiente a energia proveniente de comprimentos de onda na faixa do azul e do vermelho no espectro de luz e refletem a luz verde, característica da maioria dos

vegetais. As lâmpadas Growlux são enriquecidas com comprimentos de ondas na faixa do azul e do vermelho, o que pode ter favorecido melhores respostas das plântulas de manjericão quando expostas às lâmpadas Growlux, contrariamente às lâmpadas fluorescentes brancas, nas quais os comprimentos de ondas na faixa do azul são predominantes.

Na multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de *Prunus GF 677*, Morini e Muleo, (2003) obtiveram maior comprimento de plantas mantidas sob luz vermelha. Marks e Simpson (1999) também mencionam que a utilização de luz vermelha estimula o alongamento de brotos. Segundo esses autores, o alongamento dos brotos das plântulas cultivadas *in vitro* pode ser promovido ou inibido por meio do controle da qualidade luminosa e da proporção entre as diferentes faixas de luz.

4. CONCLUSÕES

Lâmpadas Growlux apresentam elevado potencial para serem utilizadas como fontes de luz na micropropagação de *Ocimum basilicum* L. cv Maria Bonita, visto que favorecem menor grau de hiperidridicidade em relação às lâmpadas convencionais, além de melhor desenvolvimento das plântulas de manjericão.

Ademais, os reguladores de crescimento cinetina e a putrescina mostraram-se mais apropriados para o desenvolvimento *in vitro* de *Ocimum basilicum* L. cv Maria Bonita.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I. N. **Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides***. 1998. 101f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.
- ASMAR, S. A.; RESENDE, R.F.; ARARUNA, E.C.; MORAIS, T.P.; LUZ, J.M.Q. Concentrações de BAP sobre a proliferação *in vitro* de brotos de *Lippia Alba*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.14, p. 149-153, 2012.
- BARBOSA, L. M. P. **Caracterização anatômica e bioquímica da hiperidridicidade em morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) e videira (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) propagadas *in vitro***. 2006. 146p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- COSTA, A. S.; BLANK, M. F. A.; SILVA, J. H. S.; TORRES, M. F.; SANTOS, O. N. A.; BLANK, A. F. Multiplicação *in vitro* e indução de calos embriogênicos em híbrido de Manjericão. **Scientia Plena**, Aracaju, v.11,n.1, p. 1-12, 2015.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: biometria**. Viçosa: Editora UFV. 2006. 382 p.
- DAVIS, D. G.; OLSON, P.A. Effects of putrescine and inhibitors of putrescine biosynthesis on organogenesis in *Euphorbia esula* L. **In Vitro Cellular and Development Biology Plant**, v. 30, p. 124-130, 1994.
- FRANCK, T.; CRÉVECOEUR, M.; WUEST,J.; GREPPIN, H. GASPAR, T. Cytological comparison of leaves and stems of *Prunus avium* L. shoots cultured on a solid medium with Ágar or gelrite. **Biotechniques and Histochemistry**, v. 73, p.32-43, 1997.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropopulação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA –CNPH, 1998, p. 183-260.
- GRIMALDI, F.; GROHSKOPF, M. A.; MUNIZ, A. W.; GUIDOLIN, A. F.. Enraizamento *in vitro* de frutíferas da família Rosaceae. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 7, n. 2, p. 160-168, 2008.
- IVANOVA, M.; STADEN, J. V. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schonland ex Pillans. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 60, p. 143–15, 2010.
- JOSÉ, J. V. **Adubação potássica e lâminas de irrigação na produção de biomassa e óleo essencial do manjericão *Ocimum basilicum* L.** 2014. 164p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz- ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

KEVERS, C.; GASPAR, T. Vitrification of carnation *in vitro*: changes in water content, extracellular space, air volume, and ion levels. **Physiologie Végétale**, v. 244, p. 647-653, 1986.

KUMAR, A.; ALTABELA, T.; TAYLOR, M.; TIBURCIO, A. Recent advance in polyamine research. **Trends Plant Science**, v.2, p.124-30, 1997.

MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. **Plant Growth Regulator, Farnham Royal**, v.28, n.2, p.133-142, 1999.

MIRZA, J. I.; REHMAN, A. A spermine-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* displays precocious germination. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.20, p.235-40, 1998.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht:Kluwer Academic Publishers, 2003.p. 3-35.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.5, n.3, p.473-497, 1962.

OLIVEIRA, R. P.; ROCHA, P. S. G.; SCIVITTARO, W. B. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na micropropagação do porta-enxerto de pêssego cv. Barrier. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22., 2012, Bento Gonçalves, **Anais...**, Bento Gonçalves, 2012, p. 5415-5418.

PAEK, K. Y.; HAHN, E. J. Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of *Lisianthus (Eustoma grandiflorum)*. **In vitro cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 36, p. 128-132, 2000.

RAJAM, M. V. Polyamines. In: PRASAD, M. N. V. (Ed.). **Plant ecophysiology**. New York: J. Wiley, 1997, p. 343-74.

ROCHA, P. S. R.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C. Qualidade da luz na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus*, cv. Mr. s. 2/5. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.23, n.3, p.33-40, 2007.

SOUZA, A. V. V.; OLIVEIRA, F. J. V.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento *in vitro* de catuaba (*Anemopaegma arvense* (Vell.) Stell. ex de Souza), uma planta medicinal do Cerrado. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, Botucatu, v.17, p. 51-58, 2015.

TASSONI, A.; VON BUUREN, M.; FRANCESCHETTI, M.; FORNALE, S.; BAGNI, N. Polyamine content and metabolin in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. **Plant Physiology Biochemistry**, v.36, p.383-93, 2000.

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

CAPÍTULO 4

DIODOS EMISSORES DE LUZ E CONCENTRAÇÕES DE MEIO MS NO CULTIVO *IN VITRO* DE MANJERICÃO

RESUMO

TRENTO, SABRINA DE MATOS. **Diodos emissores de luz e concentrações de meio MS no cultivo *in vitro* de manjericão ‘Maria Bonita’**. 2017. 64 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)–Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.¹

O manjericão (*Ocimum basilicum* L.) é uma planta aromática e medicinal de grande importância econômica por apresentar propriedades medicamentosas e produzir um óleo essencial rico em importantes princípios ativos. Porém, pode haver um declínio no teor de princípios ativos ou de óleos essenciais se ele for cultivado por longos períodos e submetido a vários cortes. Técnicas de micropropagação têm se mostrado alternativas viáveis para a produção massal de plantas, permitindo também o aumento rápido do número de indivíduos geneticamente idênticos a partir de plantas selecionadas, além da obtenção de plantas altamente homogêneas. Lâmpadas fluorescentes brancas ainda são mais difundidas e utilizadas em laboratórios de cultura de tecidos vegetais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de diferentes diodos emissores de luz (lâmpadas LED) azul, verde e vermelha, além de lâmpadas fluorescentes brancas, combinadas com diferentes concentrações do meio MS (25, 50, 75 e 100%), no cultivo *in vitro* de segmentos nodais de manjericão ‘Maria Bonita’. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos e cinco repetições, contendo cinco frascos por repetição para cada fonte de luz utilizada, caracterizando quatro experimentos independentes. Foram avaliadas as características: comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), número de raízes (NR), massa fresca (MF), massa seca (MS), teor de água (TA), percentagem de hiperidridicidade (%H), grau de hiperidridicidade (GH) e clorofila total (CT) das plântulas. Quanto às respostas obtidas, concluiu-se que o meio MS a 100% induziu uma maior quantidade de plântulas hiperídricas e as lâmpadas fluorescentes brancas propiciaram um melhor desenvolvimento das plântulas de manjericão.

Palavras-chave: LEDs; meio de cultura; micropropagação.

¹Orientador: José Magno Queiroz Luz - UFU

ABSTRACT

TRENTO, SABRINA DE MATOS. **Light-emitting diodes and MS medium *in vitro* culture of basil.** 2017. 64 p. Dissertation Masters in Agronomy / Phytotchny) Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG.¹

Basil (*Ocimum basilicum* L.) is an aromatic and medicinal plant of great economic importance due to its medicinal properties and its production of an essential oil rich in important active compounds. However, decreased amount of these compounds or essential oils may occur if the plant is cultivated and trimmed during long periods of time. Micropropagation techniques have shown to be viable alternatives to mass plant production, allowing rapid increases in the number of genetically identical individuals derived from selected plants and the attainment of highly homogenous plants/progeny. White fluorescent lamps are still more widespread and utilized in laboratories for plant tissue cultivation. The objective of the present study was to evaluate the use of different blue, green and red light-emitting diodes (LED lamps), in addition to white fluorescent lamps combined with different concentrations of MS medium (25, 50, 75 and 100%), in the *in vitro* culture of nodal segments of basil. The experimental design used was completely randomized (DIC -> CRD), with four treatments and five repetitions (containing 5 flasks per repetition) for each light source tested, characterizing four independent experiments. The following criteria were evaluated: aerial portion length (CPA -> APL), root length (CR -> RL), number of roots (NR), fresh mass (MF -> FM), dry mass (MS -> DM), water content (TA -> WC) percentage of hyperhydricity (%H), degree of hyperhydricity (GH -> DH) and total chlorophyll (CT -> TC) of the seedlings. Regarding the results obtained, it was concluded that the MS medium at 100% induced higher hyperhydricity, and the white fluorescent lamps combined with lower concentrations of salts led to optimal development of the Basil seedlings.

Keywords: LEDs, culture medium, micropropagation.

¹Major: José Magno Queiroz Luz – UFU.

1. INTRODUÇÃO

Os componentes da biodiversidade podem fornecer uma ampla gama de produtos de importância econômica. Entre esses produtos, destacam-se os fitoterápicos e os fitofármacos, originados dos recursos genéticos vegetais, mais especificamente de plantas medicinais (GUERRA; NODARI, 2007). A demanda por espécies medicinais tem crescido consideravelmente nos últimos anos. De acordo com Giulietti e Queiroz (2006), o Brasil possui alta diversidade de flora com potencial para o uso sustentável, incluindo alta proporção de espécies com compostos ativos, para as quais já se obteve a descoberta de substâncias puras e a produção de semi-sintéticos com potencial de utilização em doenças que afetam a população local (NEPOMUCENO, 2012).

Entre essas espécies vegetais produtoras de biocompostos encontra-se o manjericão. O *Ocimum basilicum* L., pertence à família Lamiaceae e compreende de 50 a 150 espécies, sendo encontrado na Ásia Tropical, África, América Central e América do Sul. Dentre as espécies do gênero *Ocimum*, a espécie *O. basilicum* L. é a mais cultivada comercialmente em virtude de suas folhas verdes e aromáticas que são utilizadas secas ou frescas como condimento ou na obtenção de óleo essencial. O óleo essencial dessa espécie é muito valorizado no mercado por apresentar princípios ativos importantes, os quais são aplicados nas indústrias de cosméticos, perfumaria, alimentícia e farmacêutica para confecção de produtos (LIBER et al., 2011).

Diante do elevado potencial fitoquímico e econômico do *Ocimum basilicum* L., torna-se importante o desenvolvimento de pesquisas voltadas para a propagação e avaliação do potencial produtivo em diferentes condições de cultivo.

A micropropagação é um dos mais promissores métodos para assegurar o uso sustentável de recursos vegetais. Muitas plantas medicinais já são multiplicadas *in vitro*, tais como *Melissa officinalis* (REIS et al., 2009), *Ananas erectifolius* (PEREIRA et al., 2008), *Eremanthus erythropappus* (ROSAL et al., 2007), *Lychnophora pinaster* (SOUZA et al., 2007) e *Jatropha elliptica* (CAMPOS et al., 2007). No que concerne às plantas medicinais, nas quais a qualidade do material genético e a homogeneidade são fatores determinantes para a qualidade, a micropropagação tem demonstrado excelentes resultados.

Nesse contexto, o cultivo *in vitro* de espécies medicinais possibilita a conservação de diferentes genótipos que podem ter diferentes índices na produção de

metabólitos secundários, além de contribuir para a otimização da produção de princípios ativos vegetais. Uma vez que a produção de compostos fitoquímicos frequentemente envolve a extração da planta viva, a qual necessita, muitas vezes, de muito tempo para se desenvolver, há a possibilidade de extinção de espécies nativas (VALLE, 2003).

Não existem relatos na literatura até o momento testando diferentes fontes de luminosidade sobre a propagação *in vitro* de *Ocimum basilicum* L., e há poucos estudos que relatam a influência da concentração de sais do meio de cultura no cultivo *in vitro* da espécie. Por isso, este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos de quatro concentrações de sais do meio MS e quatro fontes de luminosidade (LED vermelha, LED azul, LED verde e lâmpadas fluorescentes brancas) no cultivo *in vitro* de *Ocimum basilicum* L. cultivar Maria Bonita.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. As sementes de *Ocimum basilicum*L. foram lavadas com 100 mL de água destilada e 3 gotas de detergente neutro. Em câmara de fluxo laminar, foram enxaguadas três vezes com água destilada e autoclavada. Em seguida, as sementes foram desinfestadas com uma solução de hipoclorito de cálcio a 1% por 5 minutos e, posteriormente, imersas em hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos e novamente enxaguadas com água destilada autoclavada. Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em frascos com 40 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo 2,0 g L⁻¹ de Phytagel, 3% de sacarose e com pH ajustado para 5,7 e autoclavado a 121° C e 1,2 atm durante 20 minutos. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas por dia, temperatura de 25±2°C, com intensidade luminosa de 52,5W m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes. Todo esse procedimento foi realizado para obtenção das plântulas de manjericão e para posterior instalação do experimento.

Após 60 dias, com a obtenção das plântulas, segmentos nodais foram inoculados em frascos contendo 40 mL de meio de cultura. Os explantes foram inoculados em frascos com meio MS nas concentrações 25, 50, 75 e 100% dos sais e colocados na sala de crescimento sob quatro condições luminosas: lâmpadas LED vermelha, lâmpadas LED azul, lâmpadas LED verde e lâmpadas fluorescentes brancas (Fluo.brancas), caracterizando assim 4 experimentos independentes (Tabela 11).

Para cada uma das fontes de luminosidade, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos e cinco repetições. Cada parcela experimental consistiu de cinco frascos sendo que cada frasco continha um explante (Figura 9).

TABELA 11. Tratamentos utilizados para multiplicação *in vitro* de *Ocimum basilicum* L. Uberlândia – MG, 2016.

Tratamento	Tipo de Lâmpada	Meio de cultura	Concentração de sais (%)
T1	LED Vermelha	MS	25
T2	LED Vermelha	MS	50
T3	LED Vermelha	MS	75
T4	LED Vermelha	MS	100
T1	LED Verde	MS	25
T2	LED Verde	MS	50
T3	LED Verde	MS	75
T4	LED Verde	MS	100
T1	LED Azul	MS	25
T2	LED Azul	MS	50
T3	LED Azul	MS	75
T4	LED Azul	MS	100
T1	Fluo. Branca	MS	25
T2	Fluo. Branca	MS	50
T3	Fluo. Branca	MS	75
T4	Fluo. Branca	MS	100



FIGURA 9 – Segmentos nodais de *Ocimum basilicum* L. cultivados sob LEDs vermelhas, verdes, azuis e lâmpadas fluorescentes brancas. Fonte: Arquivo pessoal

O desenvolvimento das plântulas foi acompanhado por um período de dois meses sendo que ao final foram avaliadas as seguintes características: percentagem de hiperidridicidade (%), grau de hiperidridicidade (notas), comprimento parte aérea (cm), comprimento de raízes (cm), número de raízes, massa fresca (g), massa seca (g), clorofila (SPAD) e teor de água (%).

Foram testadas a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias, com os testes de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,01$) e Levene ($\alpha = 0,01$), por meio do programa computacional SPSS.

Realizou-se uma análise conjunta do experimento com o programa estatístico Genes (CRUZ, 2006), com posterior aplicação de regressão polinomial para estudo das doses do meio MS a 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada uma interação significativa das concentrações de sais do meio MS e das fontes de luminosidade para todas as características avaliadas, exceto para a característica teor de água (Tabela 12).

TABELA 12 - Resumo da análise de variância das características porcentagem de hiperidricidade (%H), grau de hiperidricidade (GH), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CR), número de raízes (NR), massa fresca (MF), massa seca (MS), índice de clorofila total (CT) e teor de água (TA) de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) cultivadas em quatro concentrações de meio MS e sob quatro diferentes fontes de luminosidade. Uberlândia, MG, 2017.

FV	GL	%H	GH	CPA	CR	NR	MF	MS	CT	TA
Concentrações	3	9,12*	25,36*	11,56*	8,53*	15,32*	8,95*	12,07*	1,61*	14,69 ^{ns}
Luz	3	13,41*	14,75*	39,80*	3,59*	12,49*	16,30*	26,30*	36,36*	13,80 ^{ns}
Conc. x Luz	9	2,39*	4,63*	5,91*	3,14*	3,11*	4,41*	3,66*	6,31*	12,78 ^{ns}
CV (%)	-	27,26	22,57	20,27	23,60	27,31	49,85	51,06	22,40	0,93
Média geral	-	76,60	2,02	6,20	6,00	13,60	1,17	0,07	19,59	94,14

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, ^{ns}não significativo pelo teste F.

Para a característica porcentagem de hiperidricidade, a equação linear crescente foi o modelo matemático mais adequado para explicar os resultados de todas as fontes de luminosidade, indicando que à medida que a concentração de sais do meio de cultura aumenta, existe uma tendência de aumento na hiperidricidade das plantas, exceto para a luz verde que não se adequou a nenhum modelo matemático. Com a utilização do meio MS 100% produziu-se uma maior quantidade de plantas hiperídricas, sendo 100% das plantas com sintomas de hiperidridicidade na LED vermelha, 91,58% na LED verde, 100% na LED azul e 95% sob as lâmpadas fluorescentes brancas (Figura 10A).

No que se refere à característica grau de hiperidridicidade (Figura 10B), para todas as fontes luminosas o aumento da concentração de sais do meio também favoreceu o maior grau de hiperidridicidade nas plântulas, porém isso foi mais evidente na LED azul menos pronunciado na luz branca, mostrando que as lâmpadas fluorescentes brancas formaram plântulas com menor intensidade de hiperidridicidade.

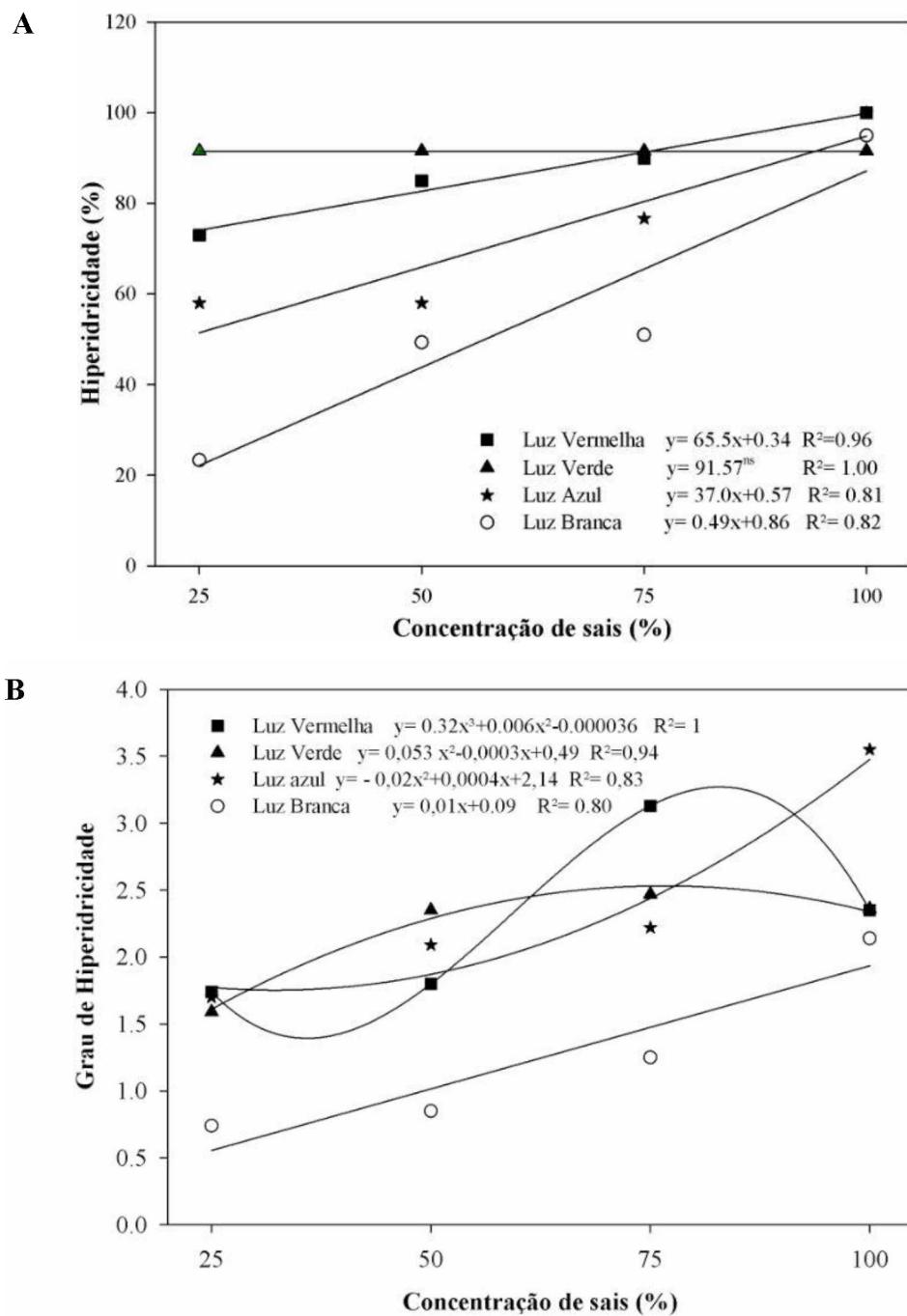


FIGURA 10– Porcentagem de hiperidricidade (A) e grau de hiperidricidade (B) de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) cultivadas com diferentes concentrações de sais do meio MS e diferentes fontes de luminosidade. Uberlândia, MG, 2017.

É provável que a ocorrência dessa anormalidade esteja associada à maior concentração salina no meio MS100%. Debergh (1983) confirma que um dos fatores que desencadeia a hiperidricidade é a concentração de sais presente no meio de cultura. Grattapaglia e Machado (1998) relataram que a redução da concentração da fonte de

nitrogênio, principalmente na forma amoniacal, tem sido utilizada para combater a vitrificação no cultivo *in vitro* de plantas.

Costa et al. (2015) também relatam que a concentração elevada de sais no meio de cultura contribui para um aumento de tecidos hiperídricos. No entanto, eles não encontraram diferenças significativas ao trabalharem com diferentes meios e concentrações no cultivo *in vitro* de *Ocimum basilicum* L.

Por outro lado, Radmann et al. (2009), avaliando a influência da composição do meio de cultura na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* sp., também verificaram uma hiperidridicidade mais acentuada nos explantes da espécie cultivadas sob meio MS 100% dos sais.

Os dados obtidos mostram que, para a característica comprimento da parte aérea (Figura 11), as lâmpadas LED vermelha e verde apresentaram equação matemática com tendência quadrática descendente. As lâmpadas LED azul mostraram uma linear decrescente, com tendência à diminuição da parte aérea conforme o aumento da concentração de sais do meio MS. O melhor resultado encontrado foi sob lâmpadas fluorescentes brancas com ajuste máximo ($R^2=1$), nas quais se observou um efeito quadrático ascendente, com ponto de máxima eficiência técnica calculada com o MS50%, que atinge maior valor do comprimento da parte aérea (10,45 cm). Isso demonstra que a utilização de lâmpadas fluorescentes brancas em conjunto com o meio MS50% se apresentou mais favorável para o desenvolvimento *in vitro* das plântulas de manjericão.

Essa condição de luminosidade em conjunto com 50% da concentração de sais do meio MS foi a mesma em que as plântulas de manjericão também demonstraram um menor grau de hiperidridade, o que pode explicar um melhor desenvolvimento da parte aérea, já que plântulas hiperídricas apresentam crescimento reduzido.

Esse resultado corrobora com o encontrado por Dzazio et al. (2002), que ao trabalharem com micropropagação de porta-enxerto de videira, observaram um maior crescimento da parte aérea das plantas com a utilização de meio MS 50%. Porém, discorda com o relatado por Ribeiro et al. (2007), os quais testaram diferentes concentrações de sais no cultivo *in vitro* de *Ocimum basilicum* L. e observaram que o meio MS 100% proporcionou maior média de altura de plantas.

Com relação às fontes de luminosidade, Oliveira et al. (2012) encontraram resultados semelhantes na micropropagação de porta-enxerto de pessegueiro, no qual as brotações de maior comprimento foram obtidas quando cultivadas sob lâmpadas

fluorescentes brancas. Por outro lado, Pasa et al. (2012) estudaram a qualidade de luz na micropropagação da amoreira-preta e relataram maior comprimento de brotações com a utilização de lâmpadas LED vermelha. A superioridade das lâmpadas LED em relação às lâmpadas fluorescentes brancas quanto à obtenção de maior comprimento de brotações havia sido demonstrada também em crisântemos (*Chrysanthemum sp.*) (KIM et al., 2004) e em copo-de-leite (*Zantedeschia albomaculata*) (CHANG et al., 2003). Esses autores obtiveram maior comprimento de brotações sob LED vermelha em crisântemos e sob LED azul em copo-de-leite. Essas divergências entre os resultados provavelmente indicam a existência de respostas diferenciadas entre espécies e até mesmo entre cultivares em relação à absorção de luz.

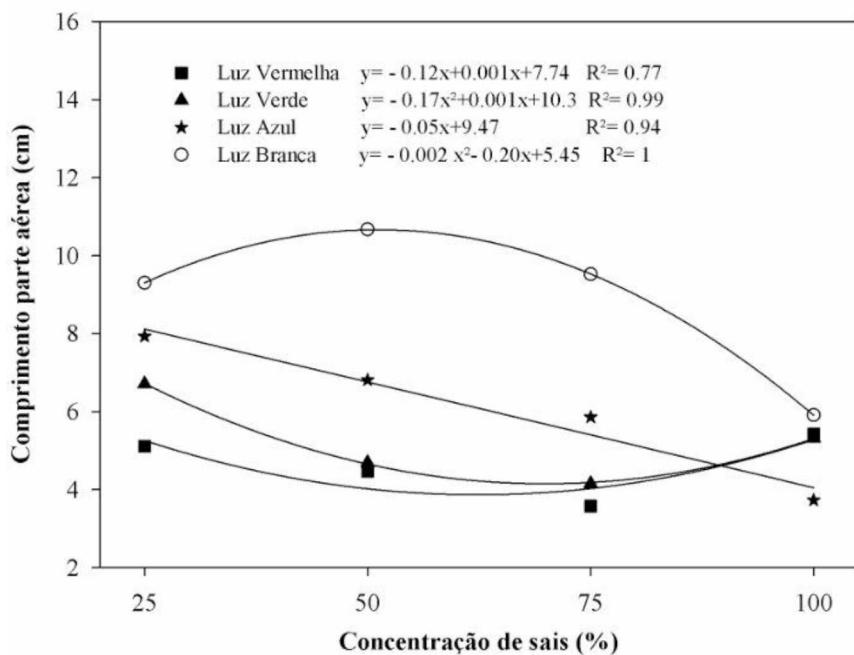


FIGURA 11 – Comprimento da parte aérea de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) cultivadas sob diferentes concentrações de sais do meio MS e diferentes fontes de luminosidade. Uberlândia, MG, 2017.

Para a característica referente ao comprimento de maior raiz (Figura 12), a análise de regressão indicou um modelo matemático quadrático ascendente com a utilização de lâmpadas LED vermelha. Para as lâmpadas LED azul, a tendência foi linear decrescente e nas lâmpadas fluorescentes brancas o comportamento da curva foi cúbica. Entretanto, a fonte de luminosidade que apresentou maior comprimento de raiz (8,60 cm) foi a lâmpada LED verde em conjunto com o meio MS25%, apresentando uma resposta cúbica aos efeitos das concentrações do meio. De forma geral, houve uma

tendência de aumento do comprimento de raízes com o MS25% para todos os tipos de lâmpadas.

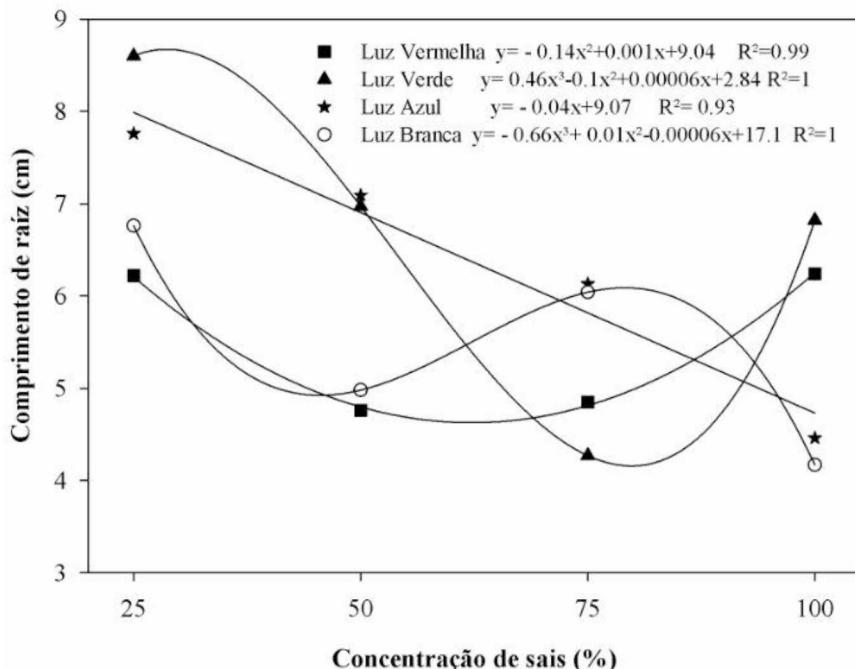


FIGURA 12 – Comprimento de maior raiz de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) cultivadas sob diferentes concentrações de sais do meio MS e diferentes fontes de luminosidade. Uberlândia, MG, 2017.

Para explicar esse resultado, é importante ressaltar que, durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais que compõem os meios de cultura não exercem somente um efeito nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas (GEORGE, 1996; MALDANER et al., 2006). Nesse contexto, a pressão osmótica elevada limita a absorção de água, sendo que a diluição aumenta a disponibilidade hídrica e reduz a oxigenação (TAIZ; ZEIGER, 2004). Dessa forma, uma maior disponibilidade de água no meio MS com 25% da concentração de sais pode ter favorecido o bom desenvolvimento da parte aérea das plantas nessa concentração e consequentemente o aumento do comprimento do sistema radicular.

Resultados diferentes foram encontrados por Pasa et al. (2012), que relatou maior tamanho de raízes sob lâmpadas fluorescente brancas na micropropagação de amoreira-preta.

Observando os resultados obtidos para a característica número de raízes (Figura 13), as lâmpadas LED vermelha apresentam uma tendência linear crescente conforme a concentração de sais do meio de cultura foi aumentada. Para as lâmpadas LED verde, o comportamento da curva foi cúbico, mostrando um melhor resultado com meio

MS100%. A curva da LED azul não se adequou a nenhum modelo matemático, não apresentando média superior à utilização de lâmpadas fluorescentes brancas em que se obteve a maior quantidade de raízes em relação a todas as outras fontes de luminosidade, com curva linear crescente e ponto de máxima eficiência técnica com a utilização do meio MS100%.

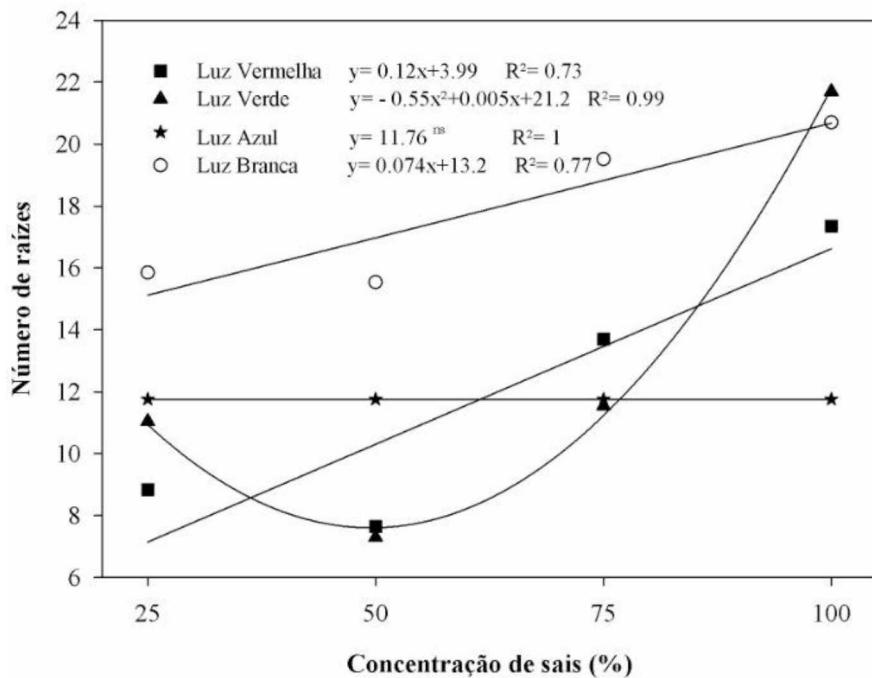


FIGURA 13 – Número de raízes de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) cultivadas sob diferentes concentrações de sais do meio MS e diferentes fontes de luminosidade. Uberlândia, MG, 2017.

Esses resultados diferem do encontrado por Rocha et al. (2007), que não observaram diferenças no número de raízes formadas do porta-enxerto de *Prunus* Mr.2/5 em função de diferentes qualidades de luz. No entanto, Iacona e Muleo. (2010) encontraram maior número de raízes em porta-enxerto de cerejeira com a utilização de luz azul, o que foi igualmente relatado por Pasa et al. (2012).

De acordo com os resultados obtidos de massa fresca (Figura 14A), as lâmpadas LED vermelha, verde e azul não se adequaram a nenhum modelo matemático, obtendo resultados inferiores em comparação às lâmpadas brancas. As lâmpadas fluorescentes brancas apresentam uma curva linear crescente e, conforme o aumento da concentração de sais do meio, houve também um aumento do teor de massa fresca das plântulas. Isso aconteceu provavelmente em virtude do melhor desenvolvimento das plântulas sob essa condição luminosa, apresentando maior comprimento de parte aérea e maior quantidade de raízes, incrementando assim, a massa fresca. Já para a característica massa seca

(Figura 14B), as lâmpadas LED não se adequaram a nenhum modelo de regressão, exceto as lâmpadas LED vermelha que mostram comportamento linear em relação às concentrações de sais do meio. Mesmo assim, esse comportamento é inferior ao resultado obtido pelas lâmpadas fluorescentes brancas que apresentam uma curva cúbica e maiores níveis de massa seca. Discordando desses resultados, Lian et al. (2002) relataram maior massa fresca e seca de explantes de lírio oriental cv. Pesaro (*Lilium*sp.) cultivados sob lâmpadas LED vermelha e LED azul.

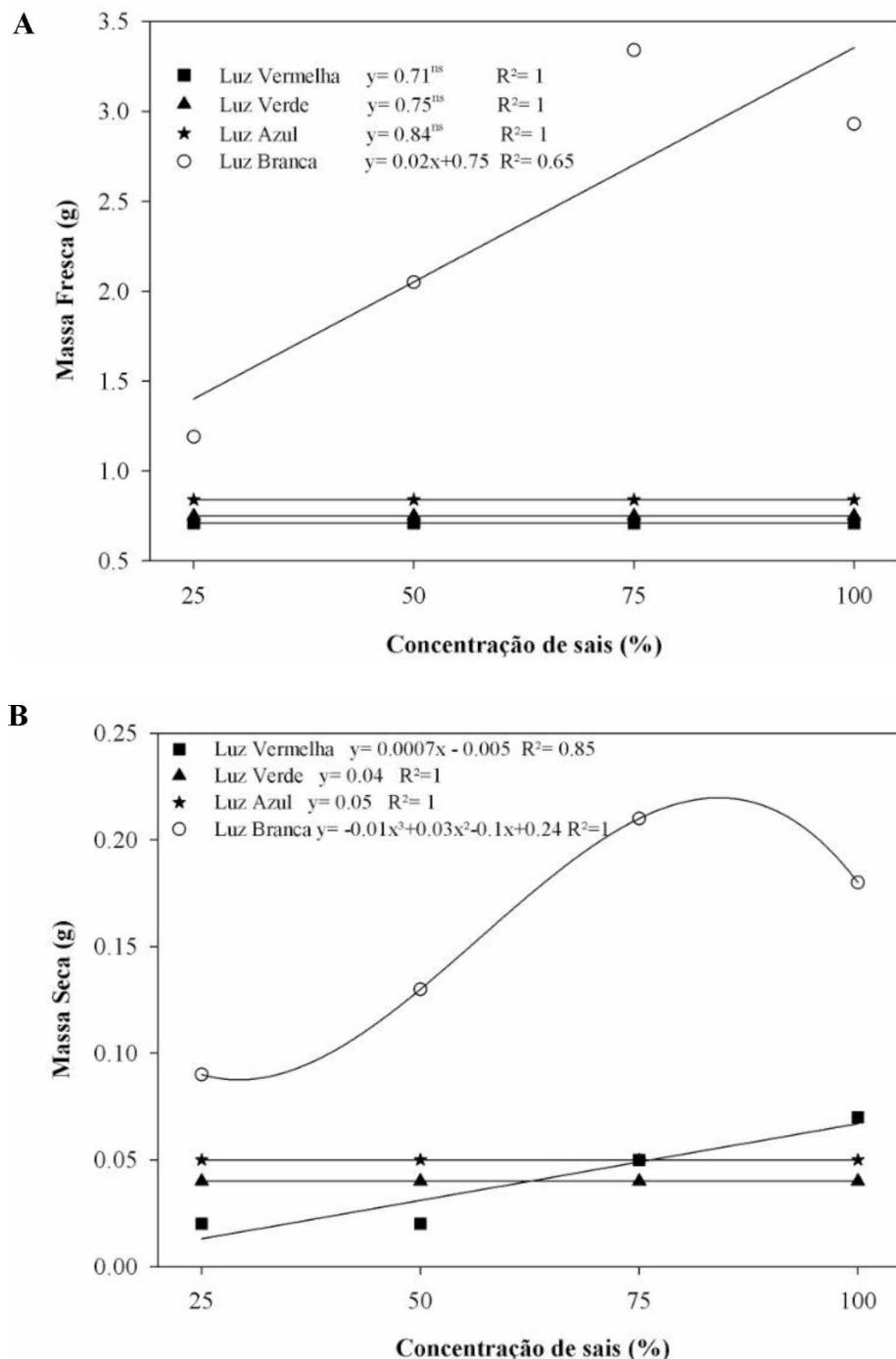


FIGURA 14 – Massa Fresca (A) e massa seca (B) de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) cultivadas sob diferentes concentrações de sais do meio MS e diferentes fontes de luminosidade. Uberlândia, MG, 2017.

Na figura 15, que demonstra os resultados do índice de clorofila nas plântulas, observa-se que as curvas das lâmpadas LED vermelha e verde não se ajustaram a nenhum modelo matemático, enquanto as lâmpadas LED azul mostraram uma curva quadrática. No entanto, a melhor fonte luminosa para essa característica foi obtida por meio das lâmpadas fluorescentes brancas, apresentando a máxima eficiência técnica calculada a 40,4% da concentração de sais obtendo 33,3 SPADs de clorofila. O resultado encontrado neste trabalho, contradiz o encontrado por Nhutet al. (2003), os quais obtiveram maior quantidade de clorofila em brotações de morangueiro cv. Akihime quando o cultivo foi realizado sob lâmpadas LED vermelha e azul. O incremento da quantidade de clorofila sob lâmpadas fluorescentes brancas pode ser explicado porque as plântulas cultivadas sob essa fonte luminosa apresentaram menor porcentagem e grau de hiperidridicidade, formando plântulas mais desenvolvidas e com menor teor de água nas células, principal desordem fisiológica ocasionada pela vitrificação.

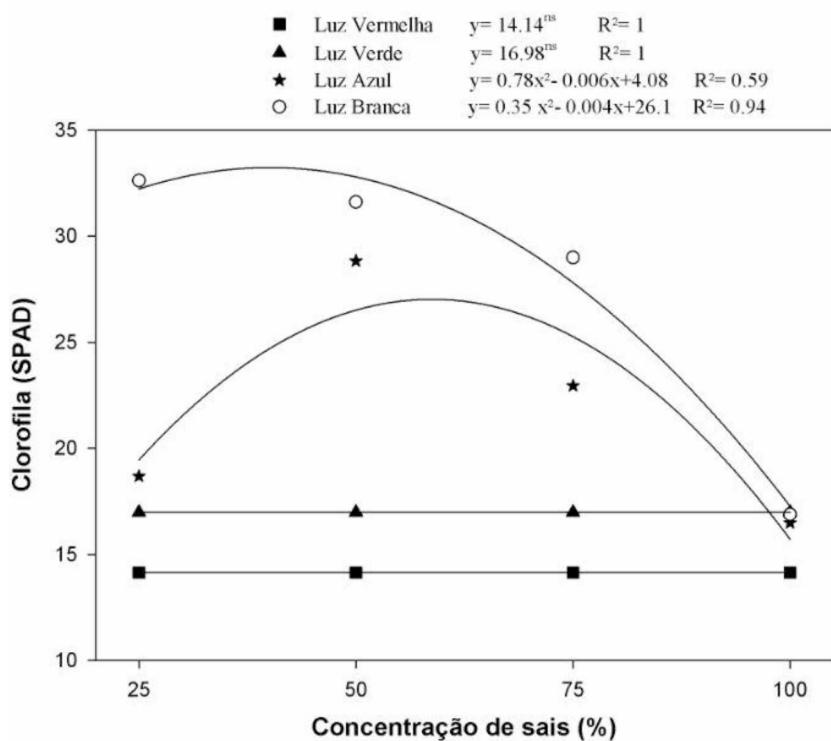


FIGURA 15 – Índice de clorofila total de plântulas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) cultivadas sob diferentes concentrações de sais do meio MS e diferentes fontes de luminosidade. Uberlândia, MG, 2017

4. CONCLUSÕES

A utilização de lâmpadas fluorescentes brancas formaram plântulas maiores, com melhor desenvolvimento do sistema radicular e menor porcentagem de hiperidridicidade.

Altas concentrações de sais do meio de cultura MS se mostraram prejudiciais para o desenvolvimento pleno das plântulas de manjericão.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No primeiro experimento, o uso de lâmpadas Growlux se mostrou positivo para sua utilização em futuros trabalhos na cultura de tecidos vegetais. No entanto, a utilização de lâmpadas LED coloridas no segundo experimento não apresentou superioridade em relação à utilização de lâmpadas fluorescentes brancas, demonstrando que outros fatores, como uso de reguladores de crescimento e concentrações de sais no meio de cultura, estão diretamente relacionados às respostas morfogênicas das plantas cultivadas sob diferentes fontes de luminosidade.

Diante desses resultados, sugere-se o desenvolvimento de novos estudos testando lâmpadas Growlux e LED coloridas na multiplicação *in vitro* de *Ocimum basilicum* L., de modo a compreender melhor as eventuais transformações morfofisiológicas que possam ocorrer nessas plântulas. Além de contribuírem para a completa elucidação desses fatores para o manjericão, esses estudos podem ser aplicados a outras culturas.

REFERÊNCIAS

- CAMPOS, R. A. S.; ANEZ, L.M.M.; DOMBROSKI, J.L.D.; DIGNART, S.L. Micropropagação de *Jatropha elliptica* (Pohl) Müll. Arg. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Paulínia, v.9, n.3, p.30-6, 2007.
- CHANG, H. S. Micropropagation of calla lilly (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, New York, v.39, p.129-134, 2003.
- COSTA, A. S.; BLANK, M. F. A.; SILVA, J. H. S.; TORRES, M. F.; SANTOS, O. N. A.; BLANK, A. F. Multiplicação *in vitro* e indução de calos embriogênicos em híbrido de Manjericão. **Scientia Plena**, Aracaju, v. 11, n.1, p. 1-12, 2015.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes**: biometria. Viçosa: Editora UFV. 2006. 382 p.
- DEBERGH, P. C. Effects of agar brand and concentration of the tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**, v. 59, n. 2, p. 270-276, 1983.
- DZAZIO, P. M.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira “420 A”. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.24, n.3, p.759-764, 2002.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.
- GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L.P. **Plantas da Caatinga**: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica. Recife: Associação Plantas do Nordeste, v. 4, 2006. 497 p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. p. 183-260
- GUERRA, M. P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs.) **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6^aed., Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p.13-28.
- IACONA, C.; MULEO, R. Light quality affects *in vitro* adventitious rooting and *ex vitro* performance of cherry rootstock colt. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.125, p.630-636, 2010.
- KIM, S. J; HAHN, E. J.; HEO, J. W.; PAEK, K. Y. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.110, p.143-151, 2004.
- LIAN, M. L.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium* oriental hybrid ‘Pesaro’. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.94, p.365-370, 2002.

LIBER, Z.; CAROVIC-STANKO, K.; POLITEO, O. Chemical characterization and genetic relationships among *Ocimum basilicum* L. cultivars. **Chemistry and Biodiversity**. v.8, n.11, p. 1978–1989, 2011.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T.; SANTOS, E. S.; 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, jul./ago. 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 5, n. 3, p. 473-497, 1962.

NEPOMUCENO, C. F. **Propagação e conservação *in vitro* de *Martianthus leucocephalus* j.f.b pastore**. 2012. 180 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 2012.

NHUT, D. T.; TAKAMURA, T.; OKAMOTO, K.; TANAKA, M. Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.73, p.43-52, 2003.

OLIVEIRA, R. P. de; ROCHA, P. S. G. da.; SCIVITTARO, W. B. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na micropropagação do porta-enxerto de pessegueiro cv. Barrier. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 24., 2016. Bento Gonçalves. **Resumo...** Bento Gonçalves, 2012.

PASA, M. S.; CARVALHO, G. L.; SCHUCH, M. W.; SCHMITZ, J. D.; TORCHELSEN, M. M.; NICKE, G. K.; SOMMER, L. R.; LIMA, T. S.; CAMARGO, S.S. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta Xavante. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.42, n.8, p.1392-1396 , ago. 2012.

PEREIRA, J. E. S.; FRANCA, R.; DANTAS, A. C.; 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**, v.23, n.1, p.86-9, 2008.

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; SOUZA, T. M.; FACHINELLO, J. C.; OLIVEIRA, R. P. Influência da composição do meio de cultivo e do tipo de explante na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* sp. **Sciencia Agraria**, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 95-101, mar/abril. 2009.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORREA, R. M. Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. *in vitro* sob influência do meio de cultura. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.31, p.331-5, 2009.

RIBEIRO M. F.; DONINI L. P.; SOUZA, J. A.; GUISSO A. P.; MOURA I. F.; BOBROWSKI V. L.; VIEGAS J. Influência de Diferentes Concentrações de Sais de MS e Açúcares 29 no Cultivo *in vitro* de Manjericão (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 57-59, 2007.

ROCHA, P. S. G.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C. Qualidade da luz na micropropagação do porta-enxerto de 'Prunus' cv. Mr. 2/5. **Bioscience journal**, v.23, p.32-40, 2007.

ROSAL, L. F.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; COSTA, L. C. B.; CORREA, R. M. Micropropagation of the medicinal plant *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish. **HortScience**, v.42, n.6, p.1420-4, 2007.

SOUZA, A.V.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CORREA, R.M. *In vitro* propagation of *Lychnophora pinaster* (Asteraceae): a threatened endemic medicinal plant. **HortScience**, v.42, n.7, p.1665-9, 2007.

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

VALLE, R. de C. S. C. **Estratégias de cultivo de células de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) determinação de parâmetros cinéticos**. 2003. 184p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) –Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.