

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO AGRONOMIA**

**MARCOS PAULO RESENDE RIBEIRO**

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Ocimum  
basilicum***

**Uberlândia – MG  
Abril - 2013**

**MARCOS PAULO RESENDE RIBEIRO**

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Ocimum basilicum***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: José Magno Queiroz Luz

**Uberlândia – MG  
Abril - 2013**

**MARCOS PAULO RESENDE RIBEIRO**

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Ocimum basilicum***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

*Aprovado pela Banca Examinadora em 15 de abril de 2013*

Prof. Msc. Elequisandra da Costa Araruna  
Membro da Banca

Prof. Dcs. Simone Abreu Asmar  
Membro da Banca

---

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por me guiar e iluminar em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais amados, Paulo Ribeiro e Magda Celeste Resende, pela dedicação durante suas vidas, para que eu pudesse realizar as minhas conquistas e pelo amor incondicional que tem por mim.

A minha irmã, Paola Resende Ribeiro, por todo amor, companheirismo e amizade.

Ao meu orientador José Magno Queiroz Luz, pela amizade e a oportunidade de desenvolver este trabalho.

A querida amiga Simone Abreu Asmar, por todo o apoio fundamental para a realização deste trabalho, pela paciência, prestatividade e carinho que dispensou a mim.

A Eleqisandra Araruna, pela participação na banca e apoio para o trabalho.

A Renata Ferreira Resende, e a todos os colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Uberlândia que contribuíram de alguma forma, para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O manjeriço é uma planta tradicionalmente usada como erva medicinal no tratamento de dor de cabeça, tosse, diarreia, entre outros, e também, considerada fonte de componentes aromáticos. A micropropagação tem sido utilizada para multiplicação de várias espécies com propriedades medicinais, além de objetivar a extração de óleos essenciais.

Objetivou-se com este trabalho avaliar a germinação e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de manjeriço. O trabalho foi composto por dois experimentos, no experimento I foi levado em consideração o efeito de carvão ativado em sua presença e ausência no meio de cultura, como também as doses de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e no experimento II, o efeito das concentrações do meio Murashige & Skoog (MS) e da sacarose.

Sementes de manjeriço da marca Isla® foram desinfestadas em álcool 70% durante um minuto e em solução de hipoclorito de sódio 30% por vinte minutos. Em seguida, em câmara de fluxo laminar foram submetidas a tríplice lavagem com água destilada e autoclavada, sendo adotado este procedimento para ambos experimentos. No experimento I, as sementes foram inoculadas em meio MS suplementado com 0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, e na presença (2 g L<sup>-1</sup>) e ausência de carvão ativado. Já no experimento II, as sementes foram inoculadas em meio MS (pleno) e MS/2, suplementados com 10; 20 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

Concluiu-se que a maior taxa de germinação *in vitro* de manjeriço ocorre na presença de ácido giberélico na dosagem de 1,0 mg L<sup>-1</sup> e evidencia-se que não há a necessidade de se adicionar o carvão ativado para se obter a germinação de sementes de manjeriço.

A concentração do meio MS/2 e de 10 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentam resultados satisfatórios para o desenvolvimento de plântulas *in vitro* de *Ocimum basilicum*.

**Palavras-chave:** *Ocimum basilicum* L., giberelina, sacarose, carvão ativado, cultura de tecidos.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	6
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
2.1 Plantas medicinais.....	8
2.1.1 Descrição da espécie.....	8
2.1.2 Germinação de espécies medicinais .....	9
2.2 Cultura de tecidos.....	10
2.2.1 Meios de cultura .....	11
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
7. CONCLUSÃO.....	22
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas para tratamentos fitoterápicos é uma tradição milenar que ao longo do tempo permitiu a humanidade o acúmulo de conhecimento, evoluindo a forma de sua utilização desde maneiras mais simples como tratamentos locais, até as formas modernas industrializadas.

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

O Brasil detém um amplo acervo genético com aproximadamente 15 a 20% da biodiversidade mundial, com destaque para as plantas superiores nas quais detém 24% da biodiversidade (BRASIL, 2006). A utilização de plantas medicinais no Brasil é prática comum, resultante da forte influência cultural dos indígenas e africanas e da cultura europeia trazida pelos colonizadores (AZEVEDO; FONSECA, 2007). Nesse sentido, o país que tem um aumento de 10% a 15% ao ano no uso da fitoterapia (RAMOS et al., 2005), possui potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas.

Por este motivo torna-se necessário estudar o comportamento de espécies medicinais perante as práticas agrônômicas, por meio da domesticação e do cultivo (CHAVES et al., 2002).

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), pertencente à família Lamiaceae, é uma planta medicinal, aromática e condimentar com elevada importância no cenário econômico mundial. Além de seu uso *in natura*, também é utilizado para obtenção de óleo essencial, muito importante na indústria de perfumaria, cosmético, medicamento e alimento, tendo, na cultivar Maria Bonita, o linalol como principal componente (BLANK et al., 2007).

Na medicina popular de alguns países, tem sido empregado para reduzir a ansiedade, diabetes, dores de cabeça, dores nos nervos, ação anti-inflamatória (GONZÁLES et al., 2011); controle de mosquitos e parasitas externos (BORA et al., 2011).

Trabalhos envolvendo aspectos agrônômicos na produção de plantas medicinais têm crescido sistematicamente, principalmente no que se refere à influência das técnicas de cultivo na produção, rendimento e composição de óleo essencial (BRANT et al., 2009; DAVID et al., 2007; MAIA et al., 2009; NALEPA, 2007).

A cultura de tecidos vegetais, que pode ser definida como um conjunto de técnicas utilizadas para favorecer o crescimento de um grande número de células em um ambiente estéril e controlado, sendo uma ferramenta que permite esse estudo, devido à possibilidade de realizar variações na formulação do meio de cultura (MONFORT, 2010).

A micropropagação é a modalidade dentro da cultura de tecidos que mais tem difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas. Entre as vantagens de sua utilização estão a possibilidade de obterem-se várias plantas a partir de um explante inicial, independentemente da estação do ano; a redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie; as melhores condições sanitárias; a reprodução do genótipo da planta-mãe com fidelidade durante a multiplicação e; a propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (Erig; Schuch, 2005).

A composição do meio de cultura, assim como a concentração dos seus componentes, é fundamental para o desenvolvimento dos tecidos (CALDAS et al., 1998).

Segundo Souza (2007), dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação do meio com sacarose, para suprir as necessidades metabólicas dos explantes cultivados *in vitro*. Porém, esta tem sido a fonte de carbono mais utilizada em meios de cultura, estando presente em concentrações que variam de 20 a 40 g.L<sup>-1</sup> (FERREIRA et al., 2004), apresentando efeito sobre o crescimento e diferenciação dos tecidos.

Dentre os inúmeros fatores explorados para aumentar a eficiência e rapidez na produção *in vitro* de plantas, destaca-se a adição de carvão ativado ao meio de cultura. Essa prática pode apresentar efeitos benéficos ou prejudiciais. Tais efeitos são atribuídos à formação de ambiente escuro no meio e também à adsorção de algumas substâncias as quais são inibitórias ou não às plantas, como fenóis, reguladores de vegetais, vitaminas e outras substâncias orgânicas (THOMAS, 2008).

Os fitohormônios se destacam no sucesso para qualquer via de regeneração *in vitro*, como os principais controladores da morfogênese. As giberelinas são uma classe de fitohormônios envolvidos na regulação da germinação de sementes, expansão foliar, florescimento e desenvolvimento de frutos. O nível celular de giberelina estimula o alongamento e a divisão celular (KENDE; ZEEVAART, 1997).

Neste trabalho objetivou-se avaliar a germinação e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de manjeriço em meio MS modificado. O trabalho foi composto por dois experimentos, no experimento I foi levado em consideração o efeito de carvão ativado em sua presença e ausência no meio, como também as doses de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e no experimento II, o efeito das concentrações do meio Murashige & Skoog (MS) e da sacarose.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Nos dias atuais, as plantas representam uma valiosa fonte de metabólitos secundários, os quais são utilizados principalmente pelas indústrias farmacêutica e alimentícia (RAO; RAVISHANKAR, 2002). Segundo Batalha et al. (2003) podem ser definidas como aquelas que possuem atividade biológica com um ou mais princípios ativos úteis à saúde humana, obtidos e elaborados exclusivamente a partir de matérias-primas ativas e vegetais.

Devido a sua ampla biodiversidade, o Brasil é considerado um verdadeiro celeiro para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos. Segundo Elzo Velani, presidente do Conselho Diretivo da Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (ABIFISA), o setor de fitoterápicos no Brasil cresce algo em torno de 12% ao ano. Porém cerca de US\$ 5 bilhões deixam de ser gerados, anualmente, por falta de investimentos para transformar a flora em medicamentos.

O mercado mundial deste segmento movimenta, em média, US\$ 44 bilhões, e a tendência é continuar a crescer. Dados da consultoria Global Industry Analysts indicam que esse setor, que utiliza plantas como matéria-prima, deve atingir US\$ 93 bilhões em 2015 (VALÉCIO, 2013).

#### 2.1.1 Descrição da espécie

O gênero *Ocimum*, possui entre 50 e 150 espécies na Ásia Tropical, África, América Central e América do Sul (PRAVUSCHI et al., 2007). Dentre essas, a espécie *Ocimum basilicum*, pertencente à família Lamiaceae, é a de maior importância comercial em muitos países para extração de óleo essencial (SAJJADI, 2006). Nos Estados Unidos da América o cultivo é de média escala para fins de extração de óleo essencial, culinários e ornamentais (BLANK et al., 2004). Já no Brasil, a produção de manjeriço ocorre na sua maioria, em pequenas propriedades com o intuito de comercialização de folhas verdes aromáticas. Sua implantação no país se intensificou após a chegada de imigrantes italianos, sendo que para este público a planta faz parte de uma tradição culinária muito forte (REIS et al., 2007).

O manjeriço é uma planta anual ou perene, dependendo do local em que é cultivado, é muito ramificada, atinge de 30 a 50 cm de altura, sua propagação pode ser feita por estaquia ou sementes, podendo ser plantado o ano todo; possui folhas simples, membranáceas, opostas com formato e tamanho variado, margens onduladas e nervuras salientes, de 4 a 7 cm de comprimento; sua inflorescência é do tipo cimeira espiciforme e suas flores são brancas, rosa ou arroxeadas; o fruto é do tipo aquênio com sementes pequenas, pretas e oblongas (COUTO, 2006; LORENZI; ABREU MATOS, 2008).

Na medicina popular e na fitoterapia é indicado no tratamento de estafa física, mental e nervosa, dores de ouvido, afecções renais, insônia, enxaqueca, afecções das vias respiratórias (faringite, laringite), digestiva, antiespasmódica, febre, anti-reumática, anti-séptica, bactericida, analgésica, carminativa e tônica (CARVALHO, 2004). Estudos de Almeida et al. (2007) demonstraram que a utilização do óleo essencial e suas substâncias purificadas demonstraram atividade anti-*Giardia lamblia*, onde o linalol destruiu 100% dos parasitas após 1 hora de incubação.

Em sua constituição química apresenta: óleos essenciais (eugenol, estragol, linalol, lineol, alcanfor, cineol, pineno e timol), taninos, saponinas, flavonóides, ácido cafeico e esculosídeo (EMBRAPA, 2001). A análise de diferentes genótipos de manjeriço estudados por Carvalho et al. (2006) mostrou que as três principais substâncias presentes em genótipos de *Ocimum basilicum*, foram o 1,8-cineol, o linalol e o geraniol.

### **2.1.2 Germinação de espécies medicinais**

A germinação é considerada um dos mais importantes estádios do biociclo vegetal (BEWLEY; BLACK, 1994). O processo germinativo tem início com a embebição de água pelos tecidos da semente (SALES, 2000), proporcionando aumento da atividade respiratória e de todos os outros eventos metabólicos necessários à retomada do crescimento do eixo embrionário (FERREIRA; BORGHETTI, 2004), sobretudo da síntese de novas enzimas e do aumento das atividades das hidrolases preexistentes (SALES, 2002), culminando com a protusão da radícula através do tegumento da semente.

O estudo da germinação das sementes de espécies medicinais tem merecido atenção especial da comunidade científica, devido ao incremento ao potencial farmacológico, aliado a necessidade de proceder a cultivos racionais destinados a produção de fitoterápico. Além

disso, a maioria das espécies apresenta sementes muito pequenas, que dificultam o manuseio e a avaliação de sua qualidade, justificando a necessidade de estudo e a recomendação, do mercado exigente, para o estabelecimento de programas contínuos de pesquisa em tecnologia de sementes (LIMA et al., 2007).

A germinação de sementes de algumas espécies medicinais pode aumentar muito quando são utilizados métodos de cultura de tecidos, principalmente quando as sementes apresentam endosperma reduzido, grande infestação de microrganismos ou dormência (FAY, 1992), mecanismo este que ocorre em sementes de manjerição, geralmente após atingirem a maturidade fisiológica, sendo um recurso utilizado pelas plantas para a perpetuação da espécie (GUIMARÃES et al., 2006).

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

## **2.2 Cultura de tecidos vegetais**

A cultura de tecidos é uma técnica amplamente utilizada como ferramenta biotecnológica para o estudo de metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas com propriedades medicinais, pois possibilita o crescimento de células, tecidos e órgãos em simples meio de cultura com nutrientes, em tubos ou placas de Petri (TAIZ; ZEIGER, 2004).

De acordo com Monfort (2010), pode ser definida como um conjunto de técnicas utilizadas para favorecer o crescimento de um grande número de células em um ambiente estéril e controlado. Baseia-se no princípio da totipotência, proposto pelo fisiologista Haberlandt, que em 1902, enunciou que cada célula vegetal possuía o potencial genético para regenerar uma planta inteira (FLORES, 2006).

Em plantas medicinais, essa tecnologia tem auxiliado na propagação clonal de diversos genótipos, permitindo a conservação do germoplasma; a obtenção de novas fontes de variabilidade através do cultivo de calos e células; na engenharia genética, na otimização da produção de metabólitos (BOTTA et al., 2001; RAO; RAVISHANKAR, 2002; ARIKAT et al., 2004) e na obtenção de uma nova cultivar em menor tempo, devido à possibilidade de multiplicação de uma planta por vários subcultivos (PASQUAL, 2000).

O maior impacto da cultura de tecidos está na área de multiplicação de plantas, conhecida como micropropagação ou propagação clonal, porque os indivíduos produzidos são geneticamente idênticos. Além disso, também proporciona meios para a obtenção de plantas isentas de doenças, devido à descontaminação dos explantes, às condições estéreis empregadas e, principalmente, ao uso da técnica de meristemas e ápices vegetativos (RAVEN et al., 2001).

Embora esta técnica tenha como desvantagem o custo elevado, a crescente demanda da indústria farmacêutica por plantas indexadas, livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e fisiológica, bem como com capacidade de síntese de metabólitos secundários potencializada, por meio do melhoramento genético, justificam a sua utilização (LIMA et al., 2007).

Vários protocolos de micropropagação têm sido estudados para diversas espécies. No entanto, o sucesso deste processo depende de alguns fatores, como meio de cultura, regulador de crescimento, condições de incubação, tipo de explante, dentre outros (Komalavalli; RAO, 2000). Stein et al, (2009) ressalta que o sucesso da micropropagação, independentemente do explante utilizado, está sujeito ao efeito do genótipo da planta-matriz na resposta aos estímulos *in vitro*.

### **2.2.1 Meios de cultura**

Meios de cultura são combinações de sais minerais (macro e micronutrientes), carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento. Podem ser sólidos (adicionando-se ágar ou outro agente para solidificação) ou líquidos, de acordo com o protocolo para o sistema de cultivo (MONFORT, 2010).

Os minerais incluídos na maioria dos meios utilizados hoje foram definidos por White em 1951 e utilizados, durante anos, como meio básico para a cultura de uma grande variedade de tecidos de diferentes espécies. O meio MS (Murashige; Skoog, 1962) foi desenvolvido a partir de testes de suplementação do meio de White com extratos de folha de fumo, sendo utilizado na cultura de diversas espécies (CALDAS et al., 1998) como meio básico. Devido sua alta concentração de amônia e nitrato, de modo geral, resulta em melhor crescimento de células e tecidos.

Os meios nutritivos utilizados para as culturas fornecem as substâncias essenciais para o desenvolvimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão do desenvolvimento *in*

*vitro* (TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A, 1998). A constituição do meio é baseada nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações genótipo-específicas realizadas no chamado meio básico, com a intenção de aperfeiçoar metodologias para o melhor desenvolvimento da espécie estudada.

Os fitorreguladores são comumente adicionados ao meio para suprir possíveis carências endógenas, já que o explante encontra-se isolado das regiões produtoras de hormônios de sua planta matriz (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), e se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro*.

A giberelina, importante regulador endógeno de crescimento, tem como principal representante o ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), produz diversos efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas, destacando-se indução da germinação em sementes, promoção do alongamento do hipocótilo e caule e regulação do desenvolvimento do pólen e indução floral (PENG; HARBERD, 2000; RICHARDS et al., 2001).

As células, tecidos e plântulas cultivadas *in vitro* não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO<sub>2</sub> e, às vezes, não apresentam teores de clorofila suficientes para realizar a fotossíntese que sustenta o crescimento (DALTON; STREET, 1977; SOLÍS et al., 1989; GRO et al., 1993). Consequentemente as plantas cultivadas *in vitro* requerem a adição de carboidratos para suprir suas necessidades metabólicas, e compensar sua baixa capacidade fotossintética. Sendo assim, a sacarose tem sido a fonte de carbono mais utilizada, estando presente em meios de cultura em concentrações que variam de 20 a 40 g L<sup>-1</sup>. Vale lembrar que a fonte e dose de açúcares no meio de cultura também podem interferir no desenvolvimento *in vitro* de algumas espécies medicinais (MORAIS et al., 2012).

O carvão ativado é outro componente que tem sido utilizado com sucesso em meios de cultura, entre 0,2% a 3%, por promover a adsorção de substâncias inibitórias do meio ou produtos tóxicos liberados pelos explantes, possibilita o crescimento de embriões (PASQUAL et al., 2001). Além disso, tem como propriedade, a redução da quantidade de luz que chega à região de formação de raízes, fato que contribui com o processo de enraizamento.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### **Experimento I: Carvão ativado e ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) na germinação *in vitro* de manjericão.**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. Sementes de manjericão da marca Isla® foram desinfestadas em álcool 70% durante um minuto e em solução de hipoclorito de sódio 30% por vinte minutos. Em seguida, em câmara de fluxo laminar passaram por tríplice lavagem com água destilada e autoclavada, e posteriormente inoculadas em meio MS (Murashige; Skoog, 1962) suplementado com 0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, na presença (2 g L<sup>-1</sup>) e ausência de carvão ativado, e em adição de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e em seguida autoclavado a 121°C e 1,2 atm durante 20 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram inoculadas em frascos de 200 mL, contendo 30 mL do meio de cultivo MS. Os frascos foram vedados com tampas de polipropileno e mantidos em sala de crescimento convencional, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C, com intensidade luminosa de 52,5W 76 m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com os tratamentos distribuídos em esquema fatorial 4x2, totalizando oito tratamentos. Cada tratamento consistiu de quatro repetições de três frascos cada, sendo que cada frasco continha quatro sementes.

Aos 30 dias após inoculação das sementes foram avaliadas as seguintes características: taxa de germinação (%) (sendo consideradas germinadas sementes que apresentavam protrusões de radícula e epicótilo), comprimento (cm), número de folhas, biomassa fresca (g) e seca (g) das plântulas desenvolvidas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa estatístico Sisvar 4.3 (Ferreira, 2000). O teste de Scott-Knott foi utilizado para comparações entre médias e a regressão polinomial para estudo das doses de GA<sub>3</sub>, ambos a 5% de significância.

**Experimento II: Meio MS e sacarose na germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de manjeriço.**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. Adotou-se os mesmos procedimentos em relação à assepsia das sementes, condições de pH, autoclavagem do meio e condições ambientais na sala de crescimento, citado anteriormente no experimento I. Posteriormente as sementes de manjeriço da marca Isla® foram inoculadas em meio contendo as concentrações do meio MS pleno e meio MS/2, em adição a 10; 20 e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com os tratamentos distribuídos em esquema fatorial 3x2, totalizando seis tratamentos. Cada tratamento consistiu de quatro repetições de três frascos cada, sendo que cada frasco continha quatro sementes.

Aos 30 dias após inoculação das sementes foram avaliadas as seguintes características: taxa de germinação (%) (sendo consideradas germinadas sementes que apresentavam protrusões de radícula e epicótilo), comprimento (cm), número de folhas, biomassa fresca (g) e seca (g) das plântulas desenvolvidas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa estatístico Sisvar 4.3 (Ferreira, 2000). O teste de Scott-Knott foi utilizado para comparações entre médias dos fatores analisados, ambos a 5% de significância.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Experimento I: Carvão ativado e ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) na germinação *in vitro* de manjericão.

Não houve diferença significativa para as características de comprimento, número de folhas e biomassa fresca das plântulas desenvolvidas, sendo que a média apresentada foi de 2,40 cm; 6,15 e 0,4546 g, respectivamente.

As características, taxa de germinação e biomassa seca foram influenciadas significativamente pela interação entre os fatores estudados (carvão ativado e GA<sub>3</sub>).

De maneira geral, a adição de carvão ativado ao meio de cultura não interferiu na taxa de germinação das sementes de manjericão, exceto quando associado à dose de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (Tabela 1).

**Tabela 1.** Percentual de germinação de sementes de manjericão cultivadas *in vitro* em função da suplementação do meio de cultura com carvão ativado e ácido giberélico (mg L<sup>-1</sup>). Uberlândia, UFU, 2012.

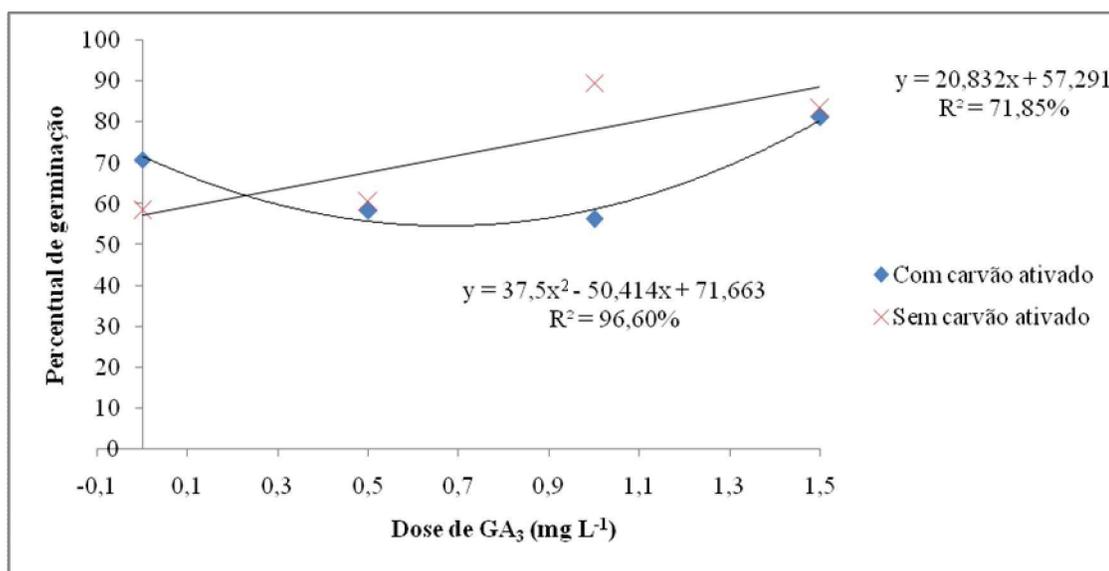
Doses de GA <sub>3</sub>	Carvão ativado	
	Ausência	Presença
0	58,33 a	70,83 a
0,5	60,41 a	58,33 a
1,0	89,58 a	56,25 b
1,5	83,33 a	81,25 a

As médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Com relação ao efeito do ácido giberélico sobre a germinação das sementes *in vitro*, notou-se, no meio de cultura sem adição de carvão ativado, que à medida que a concentração desse regulador vegetal aumentava, incrementava linearmente o percentual de sementes de manjericão germinadas. De acordo Levitt (1974), as giberelinas estão envolvidas tanto na superação da dormência como no controle de hidrólise das reservas, pela indução da síntese

da  $\alpha$ -amilase, enzima responsável pela hidrólise do amido e da qual depende o eixo embrionário em crescimento, sendo, portanto, considerado um ativador enzimático endógeno, promotor da germinação.

Quando se acrescentou o carvão ativado ao meio de cultura a quantidade de sementes de manjeriço germinadas *in vitro* reduziu até a dose de  $0,67 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$ , configurando percentual mínimo de germinação equivalente a 54,7. A partir dessa dose, a taxa de germinação tendeu a aumentar (Figura 1).



**Figura 1.** Percentual de germinação de sementes de manjeriço cultivadas *in vitro* em função da suplementação do meio de cultura com ácido giberélico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) na presença e ausência de carvão ativado Uberlândia, UFU, 2012.

Na ausência da giberelina, o carvão ativado reduziu a biomassa seca das plântulas de manjeriço germinadas *in vitro*. O carvão ativado pode adsorver auxinas e nutrientes do meio, necessários ao enraizamento e desenvolvimento normal da parte aérea (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PASQUAL, 2001; PINTO; LAMEIRA, 2001; ALOUFA, 2003). Possivelmente, os nutrientes adicionados ao meio de cultura foram adsorvidos e, portanto, sua assimilação pelas plantas foi comprometida. Por outro lado, na presença do regulador vegetal, o efeito inibitório do carvão ativado foi anulado, refletido pela manutenção das biomassas secas (Tabela 2).

No cultivo de embriões imaturos de citros, resultados satisfatórios no comprimento da parte aérea são observados utilizando-se  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  na presença de  $0,5$  ou  $1,5 \text{ g L}^{-1}$

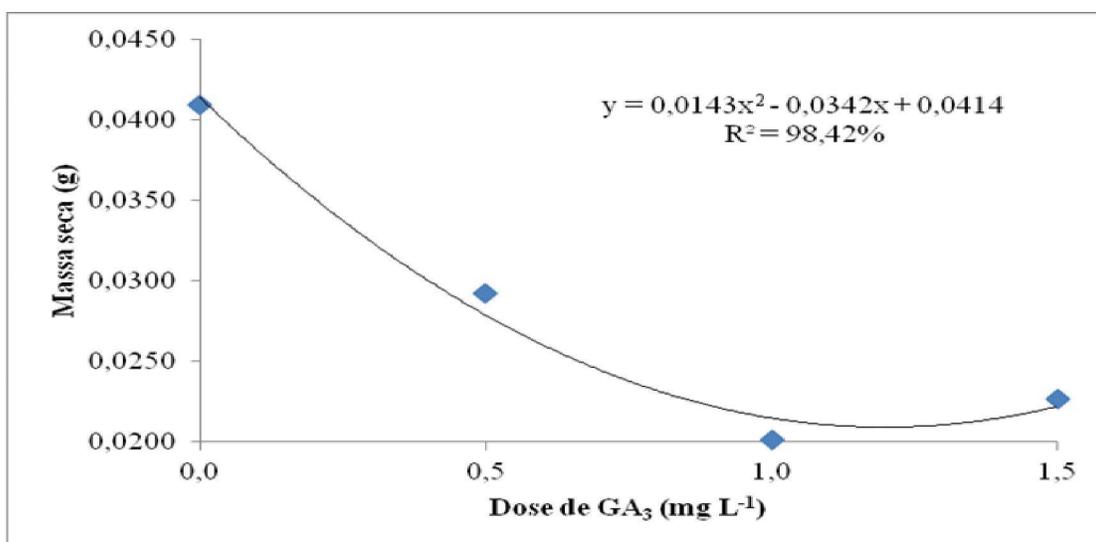
de carvão ativado (CHAGAS et al., 2002). Esses mesmos autores concluíram nesse trabalho que quando não se adicionou giberelina, observou-se o menor para o comprimento da parte aérea de plântulas de citros.

**Tabela 2.** Massa seca (g) de plântulas de manjeriço germinadas *in vitro* na ausência e presença de carvão ativado e submetidas a diferentes doses de ácido giberélico ( $\text{mg L}^{-1}$ ). Uberlândia, UFU, 2012.

Doses de $\text{GA}_3$	Carvão ativado	
	Ausência	Presença
0	0,0409 a	0,017 b
0,5	0,0290 a	0,021 a
1,0	0,020 a	0,024 a
1,5	0,022 a	0,020 a

As médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Apesar de estimular a germinação das sementes de manjeriço no meio MS pleno sem carvão ativado, as doses de giberelina inibiram o desenvolvimento das plântulas, demonstrado pelo menor acúmulo da biomassa seca. Apenas a partir da dose de  $1,2 \text{ mg L}^{-1}$  do regulador constatou-se comportamento contrário (Figura 2). Resultados contraditórios foram observados por Shedeed et al. (1990), onde aplicações de  $\text{GA}_3$  em *Ocimum basilicum* L., aumentaram a massa fresca das plantas e a massa seca, sendo 100 ppm a melhor concentração.



**Figura 2.** Massa seca (g) de plântulas de manjeriço germinadas *in vitro* em função da suplementação do meio de cultura com ácido giberélico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) na ausência de carvão ativado. Uberlândia, UFU, 2012.

**Experimento II: Meio MS e sacarose na germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de manjeriço.**

Não houve interação significativa entre os fatores concentração do meio MS e concentração de sacarose, para nenhuma das características analisadas (germinação, taxa de comprimento, número de folhas, biomassa fresca e seca das plântulas).

As características comprimento e biomassa fresca de plântulas foram influenciadas significativamente para ambos os fatores estudados separadamente, enquanto as demais características foram alteradas apenas em relação a concentração do meio pleno.

Em relação à taxa de germinação, o meio MS pleno apresentou melhores resultados (81,66%), quando comparado ao meio MS/2 (68,33%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Percentagem da taxa de germinação de sementes *in vitro* de *Ocimum basilicum*, em diferentes concentrações do meio MS.

Meio MS	Taxa de Germinação
50%	68,33 b
100%	81,66 a

As médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Reis et al. (2008) em trabalhos realizados com *Melissa officinalis* L., chegaram a resultados em que a interação entre os tipos de meio e concentrações de sacarose não foi significativa para todas as variáveis estudadas. Esses mesmos autores obtiveram valores distintos quanto à porcentagem de germinação de sementes, onde o maior número de sementes germinadas (64,75 %) ocorreu no meio MS/4 e a menor porcentagem de germinação no meio MS (37 %). Isso mostra que uma menor concentração no meio proporciona melhores taxas de germinação, provavelmente devido o menor potencial osmótico do meio, que não prejudica a absorção de água pela semente durante o processo de germinativo.

No entanto, Naves (2001) avaliou a germinação de sementes *in vitro* de bromélia imperial, utilizando meio MS em diferentes concentrações (0, 25, 50, 75, 100 e 125%) e

observou uma maior velocidade e percentagem de germinação nas sementes presentes nos meios com concentrações superiores a 75% do MS, sendo o mesmo observado para altura final das plântulas. Dessa forma, fica claro a importância de estudos específicos para cada espécie, a fim de se avaliar as necessidades ideais para a germinação *in vitro* das mesmas.

Para todas as demais variáveis analisadas o meio MS/2, apresentou melhores resultados do que o meio MS. Em relação ao comprimento de plântulas, esses valores foram de 2,19 e 1,55 cm respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 – Comprimento das plântulas cultivadas *in vitro* de *Ocimum basilicum*, em diferentes concentrações do meio MS.

Meio MS	Comprimento das plântulas
50%	2,19 a
100%	1,55 b

As médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Ainda se tratando do comprimento de plântulas, a concentração de sacarose 20 g L<sup>-1</sup> foi a que apresentou melhor resultado (2,18 cm), seguido da concentração de 10 g L<sup>-1</sup> (2,10 cm) e por último a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> (1,33 cm) que obteve valores inferiores (Tabela 5). Monfort (2010) obteve interações significativas entre os fatores concentração de sacarose e meio, para o crescimento de plântulas de *Ocimum selloi*, sendo que para 1,5% de sacarose, a maior altura das plântulas foi observada em MS/2 e MS/4.

Nota-se que apesar da diferença estatística, em relação ao comprimento de plântulas, entre as concentrações de sacarose de 10 e 20 g L<sup>-1</sup>, uma diferença de apenas 0,08 cm das plântulas, quando comparado os valores absolutos, para uma redução pela metade da concentração de sacarose utilizada. Este fator pode ser levado em consideração quando se pensar em trabalhos realizados em grandes escalas, devido à redução dos custos com materiais.

Tabela 5 – Comprimento das plântulas cultivadas *in vitro* de *Ocimum basilicum*, em diferentes concentrações de sacarose.

Concentração de sacarose	Comprimento das plântulas
10 g L <sup>-1</sup>	2,10 b
20 g L <sup>-1</sup>	2,18 a
30 g L <sup>-1</sup>	1,33 c

As médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Quanto à característica biomassa fresca de plântulas, o meio MS/2 obteve valores de 0,33 g, enquanto o meio MS resultou em 0,14g (Tabela 6).

Monfort (2010) recomenda o uso do MS/2, para cultivo *in vitro* de *Ocimum selloi* tanto pela economia de material quanto pelo tempo de manutenção da plântula *in vitro*, pois, com menores concentrações de sais, a transferência da plântula para outro tubo com o meio de cultura será realizada em um espaço de tempo menor.

Tabela 6 – Biomassa fresca das plântulas cultivadas *in vitro* de *Ocimum basilicum*, em diferentes concentrações do meio MS.

Meio MS	Biomassa fresca das plântulas
50%	0,33 a
100%	0,14 b

As médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

A melhor concentração de sacarose para esta característica foi de 10g L<sup>-1</sup> (0,32 g), seguido pela concentração de 20g L<sup>-1</sup> (0,22 g) e 30 g L<sup>-1</sup> (0,15 g) (Tabela 7).

Para o desenvolvimento da biomassa fresca de parte aérea e de raízes, a concentração de 3,0% de sacarose foi a que apresentou pior resposta. As concentrações de 0,0% e 1,5% não diferenciaram entre si, sendo esses os tratamentos com maior incremento de biomassa fresca (Monfort, 2010).

Tabela 7 – Biomassa fresca das plântulas cultivadas *in vitro* de *Ocimum basilicum*, em diferentes concentrações de sacarose.

Concentração de sacarose	Biomassa fresca das plântulas
10 g L <sup>-1</sup>	0,32 a
20 g L <sup>-1</sup>	0,22 b
30 g L <sup>-1</sup>	0,15 c

As médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Para a biomassa seca das plântulas, o meio MS/2 foi significativamente superior ao meio MS pleno apresentando valores de 0,019 e 0,0019 g, respectivamente.

Com relação à biomassa seca da parte aérea e de raízes, a melhor resposta foi observada no tratamento que utilizou 1,5% de sacarose, seguido das concentrações de 0,0% e 3,0%, que não tiveram diferença significativa (Monfort, 2010).

Tabela 8 – Biomassa seca das plântulas cultivadas *in vitro* de *Ocimum basilicum*, em diferentes concentrações de sacarose.

Meio MS	Massa seca das plântulas
50%	0,019 a
100%	0,009 b

As médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

## 7. CONCLUSÃO

Concluiu-se com este trabalho que o regulador vegetal promotor de germinação ( $GA_3$ ) favorece maior taxa germinativa *in vitro* de sementes de manjeriço, na dosagem  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ , não havendo necessidade de adicionar carvão ativado ao meio.

Para germinação das sementes de manjeriço o meio MS pleno é o mais indicado. Porém para o desenvolvimento de plântulas a melhor concentração do meio é o MS/2.

A concentração de  $10 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose apresenta resultados satisfatórios para o desenvolvimento de plântulas *in vitro* de *Ocimum basilicum*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, I. et al. Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. **Parasitology Research**, Berlin, v.101, n.2, p.443-452, 2007.

ALOUFA, M.A.I. Enraizamento in vitro de plantas lenhosas: dificuldades e soluções. In: Congresso brasileiro de floricultura e plantas ornamentais, 14., Congresso brasileiro de cultura de tecidos de plantas, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras, 2003. p.3-5.

ARIKAT, N. A. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticulosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v.100, n. 4, p.193-202, 2004.

AZEVEDO, V. M.; FONSECA, V. S. Plantas medicinais e ritualísticas vendidas em feiras livres no Município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil: estudo de caso nas zonas Norte e Sul. **Acta Bot. Bras**, Rio de Janeiro, p. 263-275. 2007.

BATALHA, M.O. et al. Plantas medicinais no estado de São Paulo: Situação atual, perspectivas e entraves ao desenvolvimento. **Florestar estatístico**, v.6, n.15, p. 27-35, ago. 2003.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BLANK, A. F. et al. Maria Bonita: cultivar de manjerição tipo linalol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.12, p.1811-1813, dez. 2007.

BLANK, A.F. et al. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjerição e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, p. 113-116, jan-mar. 2004.

BORA, K. S.; ARORA, S.; SHIRI, R. Role of *Ocimum basilicum* L. in prevention of ischemia and reperfusion-induced cerebral damage, and motor dysfunctions in mice brain. **Journal Of Ethnopharmacology**, Solan, p. 1360-1365. 11 oct. 2011.

BOTTA, B. et al. Cultura de tecidos vegetais: doze anos de experiência. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, p.354 – 379, 2001.

BRANT, R. S. et al. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de melissa cultivada sob malhas fotoconversoras. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.5, p.1401-1407, 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde)

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v. 1. p. 87-132.

CARVALHO, A. F. **Cultivo de plantas medicinais**. Raul Soares. 2004. 54p. Apostila

CARVALHO FILHO, J. L. S. et al. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v.16, n.1, p.24-30, 2006.

CHAGAS, E. A. et al. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de Pera Rio Tardia x Poncã em diferentes concentrações do meio MT e da sacarose. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 11.,2002, Lavras, MG. **Anais...** Lavras: UFLA, 2002.

CHAVES, F. C. M. **Produção de biomassa, rendimento e composição de óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) em função da adubação orgânica e épocas de corte**. 2002. 153f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Unesp, Botucatu, 2002.

COUTO, M. E. O. **Coleção de plantas medicinais aromáticas e condimentares**. Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 2006. 91p.

DALTON, C.C.; STREET, H.E. The influence of applied carbohydrates on the growth and greening of cultured spinach (*Spinacea oleracea* L.) cells. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v.10, p.157-164, 1977.

DAVID, E. F. S.; MISCHAN, M. M.; BOARO, C. S.F. Desenvolvimento e rendimento de óleo essencial de menta (*Mentha x piperita* L.) cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de fósforo. **Biotemas**, Florianópolis, v.20, n.2, p.15-26, 2007.

EMBRAPA-HORTALIÇAS. **Manjeriço: *Ocimum basilicum* L.** Porto Velho, 2001. (Série: “Plantas Mediciniais” do Subprojeto de horto-matriz de plantas medicinais em Porto Velho – Rondônia).

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

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

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

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323p.

FERREIRA DF. 2000. **Sisvar 4.3: sistema de análises de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos**. Lavras: UFLA/DEX

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de B-ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (AMARANTHACEAE)**. 2006. 164 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, RS, 2006.

- GUIMARÃES, R. M.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, A. R. Aspectos fisiológicos de sementes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 232, p. 40-50, maio/jun. 2006.
- GONZÁLES, J. A. et al. Traditional plant-based remedies to control insect vectors of disease in the Arribes del Duero (western Spain): an ethnobotanical study. **J Ethnopharmacol**, Bethesda, p. 595-601. 18 set. 2011.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas**. Brasília: ABCTP, 1998. p. 610-612.
- GROB, U. et al. The influence of sucrose and an elevated CO<sub>2</sub> concentration of photosynthesis of photoautotrophic peanut (*Arachis hypogea* L.) cell cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.33, n. 2, p.143-150, 1993.
- GUIMARÃES, **Aspectos fisiológicos de sementes**. Informe Agropecuário, v.27, n.232, p.40, 2006.
- KENDE H; ZEEVAART JAD. The five “classical” plant hormones. **The Plant Cell**, Michigan, v. 9, p.101-153, 1997.
- 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.
- LEVITT, J. **Introduction to plant physiology**. 2. ed. Saint Louis: The C. V. Mosby Company, 1974. 447p.
- LIMA, C. S. M. et al. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre , v.5, n.2, p.669-71, 2007.
- LORENZI, H.; ABREU MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 554p.
- MAIA, J. T. L. S. et al. Influência do cultivo em consórcio na produção de fitomassa e óleo essencial de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) e hortelã (*Mentha x villosa* Huds.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.11, n.2, p.137-140, 2009.
- MERCIER, H.; NIEVOLA, G. B. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: BAJAJ, Y. P. S. (Org.). **Biotechnology in agriculture and forestry**, Berlin: Springer Verlag, v. 4, p. 43-57. 1997
- MONFORT, L. T. F. **Micropropagação e aclimatização de *Ocimum selloi* Benth, uma planta medicinal**. 2010. 95f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- MORAIS, T.P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.14, n.1, p.110-121, 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco

tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NALEPA, T.; CARVALHO, R. I. N. Produção de biomassa e rendimento de óleo essencial em camomila cultivada com diferentes doses de cama-de-aviário. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.8, n.2, p.161-167, 2007.

NAVES, V, C. **Propagação in vitro de bromélia imperial *Alcanterea imperialis* (Carrière) Harms**. 2001. 76f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

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

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

PENG, J.; HARBERD, N.P. The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.5, p.376-381, 2000.

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e metabólitos secundários in vitro de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 80 p., 2001.

PRAVUSCHI, P. R.; RIGOLIN, B. H. M.; MARQUES, P. A. A. **Manjericão irrigado: alternativa à extração predatória do pau-rosa**. In: FÓRUM AMBIENTAL DA ALTA PAULISTA, 2007. Disponível em: <<http://www.amigosdanatureza.org.br/noticias/358/trabalhos/215.paulo.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2013.

RAMOS, S. J. et al. Produção de matéria seca e óleo essencial de menta sob diferentes doses de fósforo. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.8, n.1, p.9-12, 2005.

RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, Ishikawa, v. 20, n. 2 p. 101-153, 2002.

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

REIS, A. et al. Murcha do manjericão (*Ocimum basilicum*) no Brasil: agente causal, círculo de plantas hospedeiras e transmissão via semente. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.2, p.137-141, 2007.

REIS, E. S. et al. Influência do meio de cultura na germinação de sementes in vitro e taxa. **Ceres**, Lavras, v. 55, n. 3, p.160-167, 2008.

RICHARDS, D.E.; KING, K.E.; AIT-ALI, T.; HARBERD, N.P. How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signaling. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.52, p.67-88, 2001.

SAJJADI, S. E. Analysis of the essential oil of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.). **Daru**, Iran, v.14, n.3, p.128-130, 2006.

SALES, J. de F. **Atividade da celulase sobre o processo germinativo de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2002. 38f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

SOLÍS, C. et al. The biogenesis of chloroplasts in tissue cultures of a C3 and C4 plant. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.30, n. 5, p.609-616, 1989.

SOUZA, A. V. de. et al. In vitro propagation of *Lychnophora pinaster* (Asteraceae): a threatened endemic medicinal plant. **Hortscience**, Alexandria, v.42, n.7, p.1665-1669, dec. 2007.

STEIN, V.C. et al. Efeito do genótipo na propagação *in vitro* de *Plantago* sp. **Revista Verde**, v.4, n.2, p.68-75, 2009.

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

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, Singapore, v. 26, n. 6, p.618-631, 2008.

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

VALÉCIO, M. **Fitoterápicos: crescer e aparecer**. [2013]. Disponível em: <<http://www.guiadafarmacia.com.br/fito-2013/fitoterapicos-crescer-e-aparecer>>. Acesso em: 08. abr. 2013.