

CLÁUDIO LÚCIO FERNANDES AMARAL

**MORFOGÊNESE *IN VITRO* E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA
DA ALFAVACA (*Ocimum selloi* BENTH)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2001

CLÁUDIO LÚCIO FERNANDES AMARAL

**MORFOGÊNESE *IN VITRO* E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA
DA ALFAVACA (*Ocimum selloi* BENTH)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

Aprovada em: 28 de março de 2001

Prof. Wagner Campos Otoni
(Conselheiro)

Prof. Fernando Luiz Finger
(Conselheiro)

Prof. Derly José Henriques da Silva

Prof. Ricardo Henrique Silva Santos

Prof. Vicente Wagner Dias Casali
(Orientador)

A Deus, presença marcante em minha vida,
Aos meus avós José e Margarida (**in memoriam**) e Jovino e Marieta, símbolos
de afeto,
Aos meus pais Mário e Ângela, prova de amor incondicional,
Aos meus queridos e tão amados irmãos
Adilson e Sérgio (**in memoriam**)
À Ângela, minha formosa filha, e aos meus demais familiares,
dedico.
À linda Ana Cláudia que por estar ao meu lado, com amor e carinho,
ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu guia e presença constante, por ter me capacitado para elaborar este estudo.

À Universidade Federal de Viçosa e, em particular, ao seu Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realizar o Curso.

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

Ao Professor Vicente Wagner Dias Casali, pela compreensão diária, pelo agradável relacionamento e pela constante orientação científica e profissional no decorrer de todo o Curso.

Aos Professores Wagner Campos Otoni, Fernando Luiz Finger, Derly José Henriques da Silva e Ricardo Henrique Silva Santos pelos ensinamentos, pelas críticas e pelas valiosas sugestões na elaboração deste trabalho.

Ao Sr. José Geraldo Júlio, pelas valiosas informações, pela colaboração na condução das atividades de pesquisa e, sobretudo, pela amizade.

Com imenso carinho, à minha querida namorada Ana Cláudia, pela força e pelo apoio, aos meus pais Mário e Ângela, aos meus irmãos Adilson e Sérgio, a minha filha Ângela e aos meus demais familiares, pelo incentivo.

Ao Grupo Entre-Folhas Plantas Mediciniais, pelas oportunidades de conhecer as plantas medicinais.

Aos amigos do Curso de Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa, aos colegas do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora e a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

BIOGRAFIA

CLÁUDIO LÚCIO FERNANDES AMARAL, filho de Mário Lúcio Amaral e Ângela Fernandes Amaral, nasceu em Muriaé, MG, no dia 2 de janeiro de 1972.

Concluiu seus estudos de primeiro e segundo graus nesta cidade.

Em março de 1991, ingressou na Universidade Federal de Juiz de Fora, graduando-se em Ciências Biológicas em janeiro de 1995.

No período de 1992 a 1993, foi monitor das disciplinas Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

No período de 1993 a 1994, foi Bolsista do PET, Programa Especial de Treinamento da CAPES, na Universidade Federal de Juiz de Fora.

Em março de 1995, iniciou, na Universidade Federal de Viçosa, o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, defendendo tese em fevereiro de 1997.

Em março de 1997, iniciou, na Universidade Federal de Viçosa, o Curso de Doutorado em Genética e Melhoramento, defendendo tese em março de 2001.

Em agosto de 2000, foi contratado como Professor - Substituto de Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Referências Bibliográficas.....	7
ARTIGO 1 - EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE BAP NA INDUÇÃO DE MULTIBROTAÇÕES EM SEGMENTOS CAULINARES NODAIS DE ALFAVACA (<i>Ocimum selloi</i> BENTH) CULTIVADOS <i>IN VITRO</i>	12
Introdução.....	12
Material e Métodos.....	14
Resultados e Discussão.....	15
Referências Bibliográficas.....	20
ARTIGO 2 - EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E SAIS NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE SEGMENTOS CAULINARES NODAIS DA ALFAVACA (<i>Ocimum selloi</i> BENTH).....	22

Introdução.....	22
Material e Métodos.....	24
Resultados e Discussão.....	26
Referências Bibliográficas.....	32
ARTIGO 3 - EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE ANA E BAP E DA POSIÇÃO DOS EXPLANTES NA INDUÇÃO DE ORGANOGENESE <i>IN VITRO</i> EM SEGMENTOS CAULINARES INTERNODAIS DE ALFAVACA (<i>Ocimum selloi</i> BENTH).....	
	35
Introdução.....	35
Material e Métodos.....	37
Material Vegetal e Cultivo <i>in vitro</i>	37
Meio de Regeneração.....	37
Enraizamento.....	38
Aclimação das Plantas.....	38
Delineamento Experimental.....	39
Resultados e Discussão.....	40
Referências Bibliográficas.....	51
ARTIGO 4 - EFEITO DE AGENTES GELIFICANTES NA INDUÇÃO DE ORGANOGENESE EM SEGMENTOS CAULINARES INTERNODAIS DE ALFAVACA (<i>Ocimum selloi</i> BENTH) CULTIVADOS <i>IN VITRO</i>	
	54
Introdução.....	54
Material e Métodos.....	56
Resultados e Discussão.....	57
Referências Bibliográficas.....	62

ARTIGO 5 - TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DA ALFAVACA (<i>Ocimum selloi</i> BENTH) VIA <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	66
Introdução.....	66
Material e Métodos.....	68
Material Vegetal e Cultivo <i>in vitro</i>	68
Transformação Genética.....	68
Regeneração.....	70
Aclimação.....	71
Detecção Histoquímica e Análise Molecular.....	71
Delineamento Experimental.....	72
Resultados e Discussão.....	73
Referências Bibliográficas.....	81
CONCLUSÕES GERAIS.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

ANA - Ácido Naftalenoacético

BAP - 6 - Benzilaminopurina

M. S. - Meio Murashige e Skoog

O. D. - Densidade Óptica

2iP - 2 - Isopentenil - Adenina

CIN - Cinetina

RESUMO

AMARAL, Cláudio Lúcio Fernandes, D.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2001. **Morfogênese *in vitro* e Transformação Genética da Alfavaca (*Ocimum selloi* Benth).** Orientador: Vicente Wagner Dias Casali. Conselheiros: Wagner Campos Otoni e Fernando Luiz Finger.

Foram estudados alguns fatores que influenciam a organogênese, bem como a regeneração *in vitro* desta espécie, visando fornecer subsídios à transformação genética. Analisando-se o efeito de concentrações de BAP na indução de multibrotações em segmentos caulinares nodais de *O. selloi* cultivados *in vitro*, evidenciou-se que quanto maior a concentração de BAP, tanto menor foi o comprimento dos brotos, porém maior o número de brotos. Menores concentrações de BAP relacionam-se a maiores pesos de matéria seca dos brotos. Estudando-se o efeito de concentrações de sacarose e sais no cultivo *in vitro* de segmentos caulinares nodais de *O. selloi* constatou-se que a concentração de 100 % de sais do meio MS combinada com a concentração 2 % de sacarose foi a melhor na propagação *in vitro* de *O. selloi*, em razão de se ter obtido brotos mais longos e com raízes grandes, resultando em maior peso do material vegetal. Observando-se o efeito de concentrações de ANA e BAP e da posição dos explantes na indução de organogênese *in vitro* em segmentos caulinares internodais de *O. selloi* verificou-se que o primeiro, o segundo e o

terceiro segmentos caulinares internodais apresentaram, em meio de cultivo complementado com 1,00 mg L⁻¹ de ANA e 0,25 mg L⁻¹ de BAP, frequência de calogênese de 60,00%, 50,00% e 60,00%, respectivamente. O primeiro, o segundo e o terceiro segmento caulinar internodal apresentaram, respectivamente, frequência de organogênese de 93,33%, 73,33% e 73,33%, média de órgãos produzidos de 2,80, 1,80 e 1,80 e eficiência de organogênese de 2,60, 1,32 e 1,32 em meio de cultivo suplementado com 0,10 mg L⁻¹ de ANA e 1,00 mg L⁻¹ de BAP. Verificando-se o efeito de concentrações de ANA na indução do enraizamento em brotos de *O. selloi*, obtidos a partir de segmentos caulinares internodais cultivados *in vitro*, evidenciou-se que tanto o número de raízes quanto o comprimento de raízes foram crescentes à medida que elevou-se a concentração de ANA de 0,0 a 1,0 mg L⁻¹. Avaliando-se o efeito de agentes gelificantes na indução de organogênese em segmentos caulinares internodais de *O. selloi* cultivados *in vitro*, averigou-se que o primeiro segmento caulinar internodal comportou-se melhor na indução de brotos comparado ao segundo segmento caulinar internodal e combinado ao Phytigel - “Sigma” foi superior ao associado com Agar - “Merck”. O uso de higromicina com timentin foi mais eficiente que o de canamicina com timentin para a seleção de regenerantes, pois para inibir a organogênese usou-se 10 mg L⁻¹ de higromicina com 300 mg L⁻¹ de timentin e 100 mg L⁻¹ de canamicina com 300 mg L⁻¹ timentin. A frequência de regeneração de brotos em meio seletivo contendo higromicina e timentin foi de 0,5%, enquanto que a de canamicina e timentin foi de 1,0%. Conclui-se que não foi possível obter plantas transgênicas, pois a transformação genética não foi mostrada pelo teste Gus, nem confirmada por PCR.

ABSTRACT

AMARAL, Cláudio Lúcio Fernandes, D.S., Universidade Federal de Viçosa, march 2001. ***In vitro* Morphogenesis and Genetic Transformation of Alfavaca (*Ocimum selloi* Benth)**. Advisor: Vicente Wagner Dias Casali. Committee members: Wagner Campos Otoni and Fernando Luiz Finger.

Some factors that influence the organogenesis have been studied, as well as the regeneration *in vitro* of this species, with the aim of providing a basis for genetic transformation. By analysing the effect of BAP concentrations in the induction of multishooting in nodal stem segments of *O. selloi* cultivated *in vitro*, it has become clear that the higher the BAP concentration, the shorter the shoots were, though they were in a larger number. A lower concentration of BAP is related to a higher amount of dry matter in the shoots. By studying the effect of sucrose and salt concentrations in the cultivation *in vitro* of nodal stem segments of *O. selloi*, it has been observed that the concentration of 100% of salt in a MS medium combined to a concentration of 2% of sucrose was the best one for the *in vitro* propagation of *O. selloi*, since the shoots obtained were longer and deeper-rooted, resulting in a larger amount of vegetal matter. By observing the effect of NAA and BAP concentrations and the position of explants in the induction of the organogenesis *in vitro* of the internodal stem segments of *O. selloi*, it has been verified that the first, second and third internodal stem

segments presented a calogenesis frequency of 60,00 %, 50,00% and 60,00% respectively in a medium of cultivation supplemented with 1,00 mg L⁻¹ of NAA and 0,25 mg L⁻¹ of BAP. The first, the second and the third internodal stem segments presented organogenesis frequency of 93,33%, 73,33% and 73,33%, respectively, an average of organs produced of 2,80, 1,80 and 1,80 and organogenesis efficacy of 2,60, 1,32 and 1,32 in a medium of cultivation supplemented with 0,10 mg L⁻¹ of NAA and 1,00 mg L⁻¹ of BAP. By analysing the effect of NAA concentrations in the induction of rooting in *O. selloi* shoots, obtained from internodal stem segments cultivated *in vitro*, it has become clear that both the number of roots and their length grew as the concentration of NAA was increased from 0,0 to 1,0 mg L⁻¹. By evaluating the effect of gelling agents in the induction of organogenesis in internodal stem segments of *O. selloi* cultivated *in vitro*, it has been verified that the first internodal stem segment reacted best in the induction of shoots as compared to the second internodal stem segment, and, combined to Phytigel - “Sigma”, it was better than that associated to Agar - “Merck”. The use of hygromycin combined with timetin was more effective than the use of kanamycin combined with timetin for the selection of the regenerants, since it was used 10 mg L⁻¹ of hygromycin combined to 300 mg L⁻¹ of timetin and 100 mg L⁻¹ of kanamycin combined with 300 mg L⁻¹ of timetin. The frequency of the regeneration of the shoots in a selective medium containing hygromycin and timetin was of 0,5%, whereas that of kanamycin and timetin was of 1,0%. The conclusion was that it is not possible to obtain transgenic plants, since the genetic transformation has not been shown by the GUS test, neither confirmed by PCR.

INTRODUÇÃO GERAL

O uso da biotecnologia na produção de fitofármacos tem despertado grande interesse por parte das indústrias farmacêuticas. Existem substâncias, como a digoxina e a digitoxina, cuja síntese de suas estruturas é tão complexa que só é viável obtê-las a partir das plantas, como *Digitalis lanata* e *Digitalis purpurea* (BAJAJ, 1998).

A existência de sistemas eficientes de regeneração *de novo* é pré-requisito essencial à utilização de técnicas biotecnológicas modernas no auxílio ao melhoramento genético. A biotecnologia pode conduzir à produção de órgãos transformados e/ou plantas transgênicas. Neste sentido, a tecnologia transgênica, por meio de engenharia genética, oferece enormes oportunidades ao fitomelhoramento (SCOTT, 1994). No intuito de aumentar a produção de fitofármacos com trabalhos de cultivo *in vitro* existem três linhas principais de ação: produção de metabólitos secundários *in vitro* por cultura de células, micropropagação e transformação genética (LOWE et al., 1996).

O estudo das rotas metabólicas dos fitofármacos fornece evidências da produção de metabólitos secundários *in vitro*, permitindo maximizar a produção pela seleção de linhagens e/ou transformação. A micropropagação fornece oportunidade de se reproduzir genótipos superiores selecionados em menor tempo e em grande quantidade. Estas linhas são úteis, principalmente, quando se trata de plantas com ciclo de vida muito longo ou que apresentam dificuldade de reprodução ou que se encontram em perigo de extinção (DISCOMO e MISAWA, 1995).

Os pré-requisitos ao êxito da manipulação genética são identificar, isolar e caracterizar os genes envolvidos na biossíntese de princípios ativos, bem como compreender os mecanismos de regulação espaço-temporal destes genes em fases distintas do crescimento e desenvolvimento vegetal. Concomitantemente, faz-se necessário desenvolver protocolos de regeneração *in vitro* e de transformação. Embora isto nem sempre seja possível, algum progresso tem sido alcançado. Este avanço envolve duas categorias, quais sejam: cultura de órgãos transformados e plantas transgênicas (SAITO et al., 1992; CALDENTY e HILTUNEN, 1996).

Em cultura de células, suspensões celulares podem passar por crescimento em larga escala, em biorreatores, usando-se linhas celulares superiores, estáveis e com alta produção em detrimento de linhas celulares inferiores, instáveis e com baixa produção (ZAFAR et al., 1992). Este tipo de cultura pode ser suplementado com elicitores, dentre tantos as preparações fúngicas, tal como no exemplo de *Tagetes patula*, cuja cultura de células produziu, tendo como elicitador extrato de *Phytophthora* sp., níveis significativos de polienos (BUIBELAAR e TRAMPER, 1992). Instabilidade e baixa produtividade é regra em cultura de células, enquanto que estabilidade e alta produtividade é exceção. Foram detectados em *Gardenia jasminoides* compostos, usualmente, não encontrados em plantas, tais como os tarenosídeos (UDEA et al., 1981).

Há substâncias terapêuticas obtidas via órgãos ou cultura destes, assim como em plantas inteiras, a exemplo dos alcalóides vimblastina e vincristina de

Catharanthus roseus (PARR et al., 1988). Dentre os compostos bioativos obtidos a partir de cultura de células e comercialmente viáveis, destacam-se as berberinas em *Coptis japonica*, as chiconinas em *Lithospermum erythrorhizon* e os ginsenosídeos em *Panax ginseng* (DISCOMO e MISAWA, 1995).

Na cultura de órgãos não transformados, a produção é estável e baixa, pois o crescimento é lento, há menor ramificação lateral e o meio deve ser acrescido de reguladores de crescimento. Na cultura de órgãos transformados, a produção é estável e alta, pois o crescimento é rápido, há maior ramificação lateral e como vantagem o meio não necessita de reguladores de crescimento (BAJAJ, 1998). Brotos tumorados, como os de *Mentha citrata*, são menos usados que as raízes em cabeleira, como as de *Scopolia japonica*, pois em meio líquido é mais fácil cultivar raízes do que brotos. Em geral, a vitrificação ocorre em cultura de brotos, sendo rara ou inexistente em cultura de raízes (SAITO et al., 1992).

A cultura de órgãos não é facilmente manipulada como a cultura de células, quando são alteradas as condições do meio (STABA, 1985). Entretanto, a adição de quitosano aumentou a produção de hiosciamina em *Hyosciamus multicus* (SEVON et al., 1992). A viabilidade comercial da produção de princípios ativos depende não apenas da produtividade, mas também da liberação dos princípios ativos no meio de cultivo. Em cultura de raízes de *Duboisia leichhardtii*, 75% de escopolamina é liberada no meio em quatro semanas (MURANAKA et al., 1993). Todavia, há produtos, como os fitocomplexos, que não são obtidos via órgãos, apenas em plantas intactas.

Estudos envolvendo plantas transgênicas regeneradas a partir de órgãos transformados são escassos. Tem sido, preferencialmente, usado *Agrobacterium rhizogenes* como mediador na transformação de plantas cujos princípios ativos encontram-se nas partes subterrâneas, a exemplo de gentiopicrina nas raízes de *Gentiana acaulis* (HOSOKAWA et al., 1997). *Agrobacterium tumefaciens* mediou a transformação das plantas cujos princípios ativos encontram-se nas partes aéreas, como a artemisinina das folhas de *Artemisia annua*

(VERGAUWE et al., 1996). Estes sistemas, entretanto, podem ser usados independentemente do sítio de síntese dos compostos farmacológicos nos vegetais, o que tem sido verificado em *Catharanthus roseus* (CALDENTY e HILTUNEN, 1996).

A transformação genética pode acentuar ou atenuar a produção de princípios ativos ou seus derivados. Em plantas medicinais, há exemplos de ganhos da tecnologia transgênica em plantas produtoras de alcalóides, como *Atropa belladonna* e a conversão de hiosciamina em escopolamina pela enzima 6 β -hidroxilase, cujo gene é oriundo de *Hyoscyamus niger* (HASHIMOTO et al., 1993). Nas plantas produtoras de isoprenóides, tem-se na *Mentha spicata* a conversão de limoneno em mentol pela enzima limoneno 3-hidroxilase, cujo gene é oriundo de *Mentha piperita* (LEWINSOHN, 1996).

Há também exemplos de perdas resultantes da tecnologia transgênica nas plantas produtoras de isoprenóides, como a redução do teor de glicirizina tanto em *Glycyrrhiza glabra* (CALDENTY e HILTUNEN, 1996) quanto em *Glycyrrhiza uralensis* (SAITO et al., 1990).

As plantas medicinais, atualmente, tem sido transformadas para a resistência a herbicidas. Transferiu-se a *Atropa belladonna* e *Scoparia dulcis*, o gene *bar* que codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase, que confere resistência ao herbicida fosfinotricina. Em relação à produtividade, bem como à tolerância, obteve-se correlação positiva para *Scoparia dulcis* (YAMAZAKI et al., 1996) e correlação negativa para *Atropa belladonna* (SAITO et al., 1992).

A engenharia genética contribuiu significativamente no desenvolvimento de variedades com alta produção de princípios ativos, principalmente, pelo fato de a especificidade espaço-temporal de síntese destes compostos não se constituir em fator limitante à produção de fitofármacos (LEWINSOHN, 1996).

Considerando-se os altos preços dos fármacos e o crescimento do mercado farmacêutico, várias empresas privadas e instituições públicas estão investindo na produção industrial de metabólitos especiais destinados para fins terapêuticos e

obtidos a partir de plantas, significando novas possibilidades de se obter drogas medicamentosas inovadoras (KOROLKOVAS, 1989).

A cultura não diferenciada, suspensão celular e calos, por ser desprovida de organização espacial e pela falta de especialização de suas células pode produzir quantidades ínfimas de princípios ativos ou, mesmo, metabólitos diferentes daqueles encontrados em plantas inteiras (BUITELAAR e TRAMPER, 1992). Na cultura diferenciada, brotos e raízes, não se verifica estes problemas (SAITO et al., 1990). Há casos em que os princípios ativos ou seus precursores não são produzidos em cultura de células, mas apenas em cultura de órgãos vegetais ou nas próprias plantas (SAITO et al., 1992). Cultura de células são mais instáveis do que cultura de órgãos vegetais por apresentarem, freqüentemente, variações cromossômicas estruturais e numéricas (PAAR, 1989).

O potencial biossintético da cultura de órgãos transgênicos é similar ao das plantas intactas ou significativamente superior (FLORES et al., 1987). Estudos em plantas geneticamente modificadas obtidas a partir de órgãos são escassos, por conseguinte, torna-se necessário estudar a produção de compostos fitoterápicos em plantas completas (KRENS, 1997) e não apenas em suas partes (TOIVONEN, 1993). Atualmente, alguns genes envolvidos com a produção de enzimas associadas a biossíntese de óleos essenciais têm sido identificados e caracterizados. Estes genes podem ser modificados tornando viável a manipulação da síntese desta importante classe de princípios ativos. Entretanto, é necessário a eficiência do sistema de transferência de genes e do sistema de regeneração de células (WEISING et al., 1988).

Plantas transgênicas têm sido obtidas a partir de várias espécies (SIEMENS e SCHIEDER, 1996), principalmente, as medicinais (SAITO et al., 1992; CALDENTY e HILTUNEN, 1996). A transformação genética mediada por *Agrobacterium* spp. oferece grandes oportunidades para o melhoramento de plantas medicinais (KAJIKI, 1992), destacando-se as do gênero *Ocimum* (SOBTI e PUSHANGADAN, 1982). Dentre as suas principais espécies

destaca-se a Alfavaca (*Ocimum selloi* Benth), a qual é aromática, condimentar e medicinal (AMARAL, 1997). O presente trabalho teve como principal objetivo desenvolver protocolos de regeneração e transformação da alfavaca (*Ocimum selloi* Benth).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, C.L.F., CASALI, V. W. D. Identificação e caracterização de populações de Alfavaca (*Ocimum selloi*, Benth.) por meio de marcadores isoenzimáticos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 2, n. 2, p. 9 - 15, 2000.
- BAJAJ, Y.P.S. Biotechnology for the improvement of medicinal plants. **Acta Horticulturae**, v. 457, p. 37 - 45, 1998.
- BUITELAAR, R. M., TRAMPER, J. Strategies to improve the productions of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 111 - 141, 1992.
- CALDENTEY, K. M., HILTUNEN, R. Transgenic crops for improved pharmaceutical products. **Fields Crops Research**, v. 45, n. 1 - 3, p. 57 - 69, 1996.

- DISCOMO, F., MISAWA, M. Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 3, p. 425 - 453. 1995.
- FLORES, H. E., HOY, M. W.; PICKARD, J. J. Secondary metabolites from root cultures. **Trends in Biotechnology**, v. 5, p. 64 - 68. 1987.
- HASHIMOTO, T., YUN, D.J., YAMADA, Y. Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures. **Phytochemistry**, v. 32, p. 713 - 718, 1993.
- HOSOKAWA, K., MATSUKI, R., OIKAWA, Y., YAMAMURA, M. Genetic transformation of gentian using wild type *Agrobacterium rhizogenes*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, p. 137 - 140, 1997.
- KAJIKI, F. O. Plantas Mediciniais: Abordagens Biotecnológicas. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 6, p. 21 - 27, 1992.
- KOROLKOVAS, A. Planejamento de Fármacos. **Ciência e Cultura**. v. 41, n. 6, p. 528 - 537, 1989.
- KRENS, F. A., KEIZER, L. C. P.; CAPEL, I. E. M. Transgenic caraway, *Carum carvi*: a model specie for metabolic engineering. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 39 - 43. 1997.
- LEWINSOHN, E. Molecular biology for the improvement of medical and aromatic plants. **Acta Horticulturae**, v. 426, p. 443 - 463, 1996.

LOWE, K.C. DAVEY, M.R., POWER, J.B. Plant tissue culture: past, present and future. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v.2, n.4, p.175 - 186, 1996.

MURANAKA, T., KAZUOKA, T., OHKAWA, H., YAMADA, Y. Characteristics scopolamine releasing hairy root clones of *Duboisia leichhardtii*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 57, p. 1398 - 1399, 1993.

PAAR, A. J. The production of secondary metabolites by plant cell cultures. **Journal of Biotechnology**, v.10, p. 1 - 22. 1989.

PARR, A.J., PEERLESS, A.C.J., HAMILL, J.D., WALTON, N.J., ROBINS, R.J., RHODES, M.J.C. Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 309 - 312, 1988.

SAITO, K., KANEKO, H., YAMAZAKI, M., YOSHIDA, M., MURAKOSHI, I. Stable transfer and expression of chemeric genes in licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) using an Ri-plasmid binary vector. **Plant Cell Reports**, v. 8, p. 718 - 721, 1990.

SAITO, K., YAMAZAKI, M., MURAKOSHI, I. Transgenic medicinal plants: *Agrobacterium*-mediated foreign gene transfer and production of secondary metabolites. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 2, p. 149 - 162, 1992.

SCOTT, A.I. Genetically engineered synthesis of natural products. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 5, p. 557 - 573, 1994.

SEVON, N., HILTUNEN, R., OKSMAN-CALDENTEY, K.M. Chitosan increases hyoscyamine content in hairy root cultures of *Hyoscyamus muticus*. **Pharmacology Letters**, v. 2, p. 96 - 99, 1992.

SIEMENS, J., SCHIEDER, O. Transgenic plants: genetic transformation - recent developments and the state of the art. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 66 - 75, 1996.

SOBTI, S. N. PUSHPANGADAN, P. Studies in the genus *Ocimum*: cytogenetics, breeding and production of new strains of economic importance. In: Atal, C. K., Kapur, B. M. **Cultivation and Utilization of Aromatic Plants**. Jammu - Tawi, India: Council of Scientific & Industrial Research, 1982. p. 457 - 472.

STABA, E.J. Milestones in plant tissue culture systems for the production of secondary products. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 2, p. 203 - 209, 1985.

TOIVONEN, L. Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites. **Trends in Biotechnology**, v. 9, p. 12 - 20. 1993.

UDEA, S.K., KOBAYASHI, T., MURAMATSU, T., INOUE, H. Studies on monoterpene glucosides and related natural products. XL. iridoid glucosides of cultured cells of *Gardenia jasminoides*. **Planta Medica**, v. 41, p. 186 - 191, 1981.

VERGAUWE, A., CAMMAERT, R., VANDENBERGHE, D., GENETELLO, C., INZE, D., MONTAGU, M.V., EECKHOUT, V.D. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Artemisia annua* L. and regenerations of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 929 - 933, 1996.

YAMAZAKI, M., SON, L., HAYASHI, T., MORITA, N., ASAMIZU, T., MOURAKOSHI, I., SAITO, K. Transgenic fertile *Scoparia dulcis* L., a folk medicinal plant, conferred with a herbicide-resistant trait using an Ri binary vector. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 317 - 321, 1996.

WEISING, K., SCHELL, J. KAHL, G. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression, and applications. **Annual Review of Genetics**, v. 22, p. 421 - 477, 1988.

ZAFAR, R., AERI, V., DATTA, A. Application of plant tissue and cell culture for production of secondary metabolites. **Fitoterapia**, v. 63, n. 1, p. 33 - 38, 1992.

Efeito de concentrações de BAP na indução de multibrotações em segmentos caulinares nodais de alfavaca (*Ocimum selloi* Benth) cultivados *in vitro*.

Amaral, C. L. F¹.; Casali, V. W. D².; Otoni, W.C³, Finger, F. L.⁴

¹Professor, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil. CEP: 36036 - 330.

Introdução

Em cultura de tecidos, usa-se as citocininas objetivando produzir grandes quantidades de gemas, sem haver formação de calos, removendo-se a dominância apical e estimulando a produção de ramos axilares como foi observado em *Zingiber officinale* (WANG, 1989). Há diferenças na utilização das citocininas como fitorreguladores; pois o BAP, ao contrário de CIN e 2iP, é fundamental na indução de multibrotações. O BAP é bastante eficaz na indução de ramos múltiplos, provavelmente, pelo fato de que os tecidos vegetais têm a capacidade de metabolizar de forma mais eficiente os fitorreguladores naturais em detrimento dos artificiais (RAJEEVAN e PANDEY, 1986).

A alfavaca (*Ocimum selloi* Benth) é uma planta largamente utilizada com fins terapêuticos; sendo grande o interesse em se pesquisar esta espécie devido a seu potencial medicinal como antidiarréico, antiespasmódico, e antiinflamatório (AMARAL e CASALI, 2000). Entretanto, apesar de seu enorme valor fitoterapêutico, são escassos os estudos em cultura de tecidos nesta espécie. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de concentrações de BAP na indução de multibrotações em segmentos caulinares nodais de *O. selloi* cultivados *in vitro*.

²Professor, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. CEP: 36571 - 000.

³Professor, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. CEP: 36571 - 000

⁴Professor, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. CEP: 36571 - 000.

Material e Métodos

Os segmentos caulinares nodais foram obtidos de plantas de *O. selloi* produzidas *in vitro* e manuseados como explantes, inoculados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com cinco concentrações de BAP (0,00; 0,50; 1,00; 1,50 e 2,00 mg L⁻¹), 3% (p/v) de sacarose e 7 g L⁻¹ de Ágar

“Merck”; sendo o pH ajustado a $5,7 \pm 0,1$ com HCl ou NaOH a 0,1N. As culturas foram mantidas em sala de crescimento à $26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 tratamentos (níveis de BAP), 10 repetições, 1 tubo de ensaio por parcela e 1 explante em cada tubo de ensaio. Os tratamentos foram avaliados aos 30 dias após instalação, quantificando-se: o número de brotos, o comprimento de brotos (cm) e o peso da matéria fresca e seca dos brotos (mg).

Resultados e Discussão

A análise de variância do número de brotos, comprimento de brotos, peso da matéria fresca e seca dos brotos; bem como do número de folhas dos brotos em função das concentrações de BAP está sumarizada na Tabela 1. Houve diferença, pelo teste F, a 5% de probabilidade, entre os níveis de BAP quanto ao número de folhas dos brotos e peso da matéria seca dos brotos; enquanto que para o número e

comprimento dos brotos ocorreu diferença, a 1% de probabilidade. Por outro lado, não houve diferença, a 5% de probabilidade, pelo teste F, no peso da matéria fresca dos brotos. Foram testados, os modelos de regressão linear e quadrático, verificando-se que o modelo linear apresentou melhor ajuste aos dados do número e comprimento dos brotos e o modelo quadrático, do peso da matéria seca dos brotos.

Constatou-se que o número de brotos foi crescente à medida que elevou-se a concentração de BAP (Figura 1); o que foi condizente com o estudo feito por PEREIRA (1998) com *Maytenus aquilifolium* e *Maytenus ilicifolia*. A promoção de ramos múltiplos em *O. selloi* foi similar àquela observada em estudo com indução de ramificações em *Citrus mitis* por SIM et al. (1989). Conforme SAKA et al. (1980), a formação de multibrotações pode estar associada à eficiência de regeneração *in vitro*, o que foi confirmado por BARWARE et al. (1986) em *Glycine max* e *Glycine soja*. Observou-se que quanto maior a concentração de BAP, tanto menor foi o comprimento dos brotos (Figura 2). Estes resultados comparados aos de BERGMAN et al. (1985) em cinco clones de *Salix* spp. mostraram que a relação entre o número e o comprimento dos brotos foi inversamente proporcional em três dos cinco clones utilizados.

Evidenciou-se que com a elevação da concentração de BAP, houve diminuição no peso da matéria seca dos brotos (Figura 3); o que segundo SHARMA e SINGH (1997) pode ter ocorrido, provavelmente, pela redução do comprimento dos brotos.

De acordo com POLANCO e RUIZ (1997) à medida que se aumenta a concentração de BAP diminui a formação de raízes, o que também foi observado neste trabalho. Altas concentrações de citocininas (0,5 - 10 mg L⁻¹) bloqueiam a rizogênese ao inibirem os efeitos das auxinas (BEN-JAACOV et al., 1991).

Tabela 1 - Resumo da análise de variância do número de brotos (NB), comprimento dos brotos (CB) e peso da matéria fresca (PF) e seca dos brotos (PS) de *Ocimum selloi* em função das concentrações de BAP. UFV, Viçosa / MG, 1999.

F.V.	G.L.	Quadrados Médios			
		NB	CB	PF	PS
Tratamento	4	32,199990**	0,490333**	0,000946 ^{ns}	0,000008*

Resíduo	45	2,871112	0,1148168	0,000262	0,000003
C. V. (%)		38,51	27,22	44,87	42,40

^{ns} - Não significativo.

* e ** - Significativo respectivamente, a 5 e 1 % de probabilidade, pelo teste F.

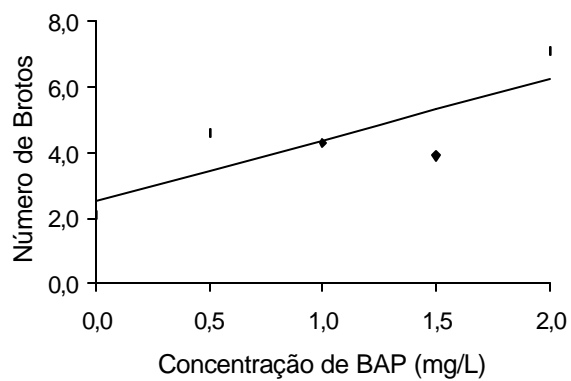


Figura 1 - Efeito de concentrações de BAP sobre o número dos brotos provenientes de segmentos caulinares nodais de *Ocimum selloi* Benth cultivados *in vitro*. UFV, Viçosa / MG, 1999.

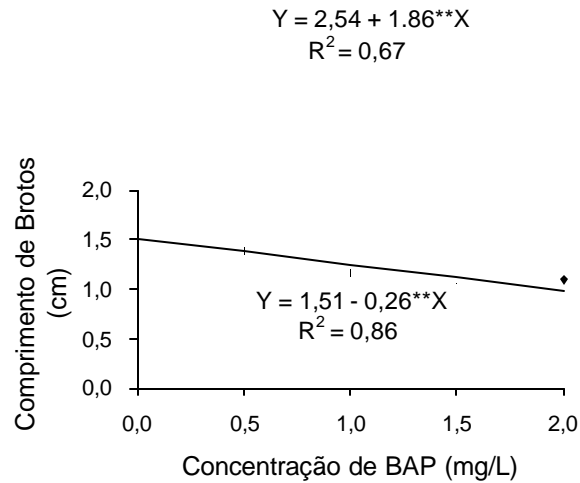


Figura 2 - Efeito de concentrações de BAP sobre o comprimento dos brotos provenientes de segmentos caulinares nodais de *Ocimum selloi* Benth cultivados *in vitro*. UFV, Viçosa / MG, 1999.

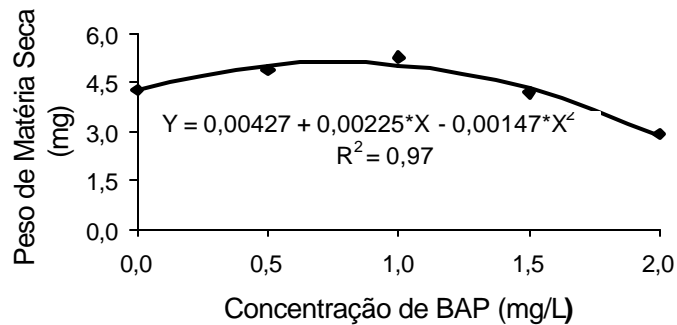


Figura 3 - Efeito de concentrações de BAP sobre o peso da matéria seca dos brotos provenientes de segmentos caulinares nodais de *Ocimum selloi* Benth cultivados *in vitro*. UFV, Viçosa / MG, 1999.

Referências Bibliográficas

- AMARAL, C.L.F., CASALI, V. W. D. Identificação e caracterização de populações de Alfavaca (*Ocimum selloi* Benth.) por meio de marcadores isoenzimáticos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 2, n. 2, p. 9 - 15, 2000.
- BARWARE, U. B., MEYER, M. M., WIDHOLM, J. M. Screening of *Glycine max* and *Glycine soja* genotypes for multiple shoot formation at the cotyledonary node. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 72, p. 423 - 428, 1986.

- BEN - JAACOV, J., ACKERMAN, A., TAL, E., JACOB, G. Vegetative propagation of *Aberta magna* by tissue culture and grafting. **HortScience**, v. 26, p. 74 -77, 1991.
- BERGMAN, L., ARNOLD, S. V., ERIKSSON, T. Effects of N₆-benzyladenine on shoots of five willow clones (*Salix* spp.) culture *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 4, p. 135 - 144, 1985.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473 - 497, 1962.
- PEREIRA, A. M. S. Micropropagação de *Maytenus aquilifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. **Scandinavian Journal of Forest Research**, v. 8, p. 487 - 492, 1998.
- POLANCO, M. C., RUIZ, M. L. Effect of benzylaminopurine on *in vitro* and *in vivo* root development in lentil, *Lens culinaris* Medik. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 22 - 26, 1997.
- RAJEEVAN, M. S., PANDEY, R. M. Lateral bud culture of papaya (*Carica papaya* L.) for clonal propagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 6, p. 181 - 188, 1986.
- SAKA, H. T., VOQUI-DINH, T. H., CHENG, T. Y. Stimulation of multiple shoot formation on soybean stem nodes in culture. **Plant Science Letters**, v. 19, p. 193 - 201, 1980.
- SIM, G. E., GOH, C. J., LOLT, C. S. Micropropagation of *Citrus mitis* multiple bud formation from shoot and root explants in the presence of 6 - benzylaminopurine. **Plant Science**, v. 59, p. 203-210, 1989.

SHARMA, T. R.; SINGH, B. M. High frequency in vitro multiplication of disease-free *Zinziber officinale* Rosc. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 68 - 72, 1997.

WANG, H. *In vitro* clonal propagation of ginger sprouts. **Acta Botanica Yunnanica**, v. 11, p. 231 - 233, 1989.

Efeito de concentrações de sacarose e sais no cultivo *in vitro* de segmentos caulinares nodais da alfavaca (*Ocimum selloi* Benth).

Amaral, C. L. F¹.; Casali, V. W. D²; Otoni, W. C³. Finger, F. L.⁴

¹Professor, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil. CEP: 36036 - 330.

²Professor, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. CEP: 36571 - 000.

³Professor, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. CEP: 36571 - 000.

Introdução

As células, tecidos e plântulas cultivadas *in vitro* além de não encontrarem condições adequadas de iluminação e concentração de CO₂, normalmente, não apresentam teores de clorofila suficientes para realizarem fotossíntese que sustente o crescimento *in vitro*. Assim, as células possuem o potencial para a fotossíntese *in vitro*, mas o crescimento das culturas é promovido por fontes de carboidratos adicionados ao meio (YAMADA e SATO, 1978). Contudo, ao mesmo tempo, reconhece-se que a presença de carboidratos no meio inibe a síntese de clorofila e, portanto, reduz a capacidade fotossintética das culturas (EDELMAN e HANSON, 1971).

Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos a todos os compostos orgânicos necessários ao crescimento e desenvolvimento celular. A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, sendo que este açúcar suporta, normalmente, as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies. Como foi observado em *Prunus cerasus*, a sacarose influencia tanto a organogênese por multiplicação dos brotos quanto por indução de raízes (BORKOWSKA e SZCZERBA, 1991). Entretanto, outras fontes de carbono podem apresentar resultados superiores na promoção de morfogênese *in vitro*. A embriogênese somática é estimulada pela frutose e rafinose em *Spinacia oleracea* (KOMAI et al., 1996), pela lactose e galactose em *Citrus deliciosa* (CABASSON et al., 1995) e pela maltose em *Abies nordmanniana* (NORGAARD, 1997). Além dos carboidratos, os sais minerais são também importantes estimuladores dos processos morfogenéticos (EEUWENS, 1976).

⁴Professor, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. CEP: 36571 - 000.

Espécies da família Lamiaceae, principalmente, as do gênero *Ocimum*, são amplamente empregadas na indústria farmacêutica mundial. Por suas propriedades aromáticas, condimentares e medicinais, destaca-se entre elas a alfavaca (*Ocimum selloi* Benth) (SOBTI e PUSHANGADAN, 1982). Entretanto, apesar de seu grande valor, existem estudos ainda incipientes relacionados, principalmente, à cultura de tecidos. Deste modo, desenvolveu-se este trabalho, visando obter informações a respeito da influência das concentrações de sacarose e sais na qualidade dos ramos obtidos a partir de segmentos caulinares nodais de *O. selloi* cultivados *in vitro*.

Material e Métodos

As plantas matrizes foram obtidas a partir de sementes que geraram mudas em canteiros do Grupo Entre - Folhas / Plantas Medicinais do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. As plantas foram cultivadas ao ar livre em vasos com capacidade de oito litros de substrato com três partes de solo e uma parte de composto orgânico.

As sementes das plantas matrizes foram colhidas e lavadas em água corrente. Em seguida foram colocadas em solução de benomil a 2 mg L⁻¹ por 15 minutos,

posteriormente, foram lavadas 8 vezes em água deionizada e autoclavada; mergulhadas em álcool 70% (v/v) por 30 segundos e transferidas a solução hipoclorito de sódio de 2,5% (v/v) e 0,1% (v/v) de Tween 20, por 10 minutos; em seguida foram novamente lavadas 7 vezes em água deionizada e autoclavada. A inoculação das sementes foi realizada em tubos de ensaio contendo meio “MS” (MURASHIGE e SKOOG, 1962), sendo feita na capela de fluxo laminar, em condições assépticas. As sementes germinadas originaram plantas, das quais aos 30 dias de cultivo *in vitro* foram coletados os segmentos caulinares nodais que foram manuseados como explantes.

As inoculações dos explantes foram realizadas em capela de fluxo laminar, em condições assépticas. As combinações de sacarose e sais usadas foram: 3% (p/v) de sacarose e 100% (p/v) de sais de “MS”, 3% (p/v) de sacarose e 50% (p/v) de sais de “MS”, 2% (p/v) de sacarose e 100% (p/v) de sais de “MS” e 2% (p/v) de sacarose e 50% (p/v) de sais de “MS”. Neste meio, o pH foi ajustado a $5,7 \pm 0,1$, com HCL ou KOH a 0,1N; sendo solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar “Merck”, distribuindo-se 15 mL do meio por tubo de ensaio (25 x 150 mm), vedado com tampa de polipropileno. A esterilização do meio de cultura foi feita por autoclavagem, à temperatura de 121°C e pressão de 1atm, durante 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento à $26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 31 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 2 (concentrações de sacarose) x 2 (concentrações de sais) com 7 repetições; totalizando 28 parcelas. Cada parcela continha 4 segmentos caulinares nodais, sendo 1 explante por tubo de ensaio. Foram avaliadas as seguintes variáveis: comprimento dos brotos (cm), número de brotos, comprimento das raízes (cm), número de raízes, peso da matéria fresca e seca dos brotos (mg) e número de folhas.

Resultados e Discussão

A análise de variância conjunta encontra-se no Tabela 1. Houve interação significativa quanto aos caracteres comprimento de brotos, comprimento de raízes, peso da matéria fresca e seca dos brotos obtidos de segmentos caulinares nodais de *O. selloi* cultivados *in vitro*, indicando que o efeito relativo da concentração de sais no meio MS sobre estas variáveis depende da concentração de sacarose. Esta interação tornou-se evidente quando se analisa os quadros 2 e 3; uma vez que, para as referidas variáveis, o efeito dos sais do meio MS foi não significativo na concentração de 3 % de sacarose (Tabela 2) e significativo na concentração de 2 % de sacarose (Tabela 3).

Quanto aos caracteres número de brotos, número de folhas e número de raízes, os efeitos da concentração de sacarose, sais e interação foram não significativos (Tabela 1), indicando que os tratamentos empregados não influenciaram estas variáveis.

De acordo com a Tabela 4, pode-se inferir que, dentro da concentração de 2 % de sacarose, o meio com 100 % de sais de MS proporcionou médias superiores para os caracteres comprimento de brotos, comprimento de raízes, peso da matéria fresca e seca. Entretanto, na concentração de 3 % de sacarose, os dois níveis de sais de MS proporcionaram médias estatisticamente iguais, uma vez que o teste F foi não significativo (Tabela 2).

Comparando-se os tratamentos, pode-se concluir que de todas as combinações entre concentrações de sais e de sacarose, a que foi melhor na propagação *in vitro* de *O. seloi* em razão dos melhores resultados é a concentração de 100 % de sais do meio “MS” combinada com a concentração 2 % de sacarose, a partir da qual foram obtidos brotos longos com raízes grandes, resultando em maior peso do material vegetal. Estes dados condizem com o estudo de BRANDT (1992) em *Campanula isophylla* e contradizem ao trabalho de KOZLINA et al. (1997) em *Fibigia triquetra*.

Segundo o estudo de PREMACHANDRA et al. (1992) em *Sorghum bicolor*, o aumento de concentração de sacarose no meio de cultivo não apenas eleva o suprimento de carbono disponível à cultura, como também estimula o crescimento do material vegetal. Contudo, o potencial osmótico do meio diminui, o que talvez tenha inibido o crescimento *in vitro*. Este fato foi verificado em numerosas espécies, a exemplo de: *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum* e *Lycopersicon esculentum* (BROWN, 1982). De acordo com PREMACHANDRA et al. (1992), açúcares solúveis, tais como: sacarose, glicose e frutose são responsáveis pelo ajustamento osmótico de tecidos vegetais sob condições estressantes.

Conforme IRIGOYEN (1992), o crescimento de plantas cultivadas *in vitro* é fortemente influenciado por açúcares adicionados ao meio, principalmente

sacarose. Assim, segundo HYNDMAN et al. (1982) e LIPAVSKA e VREUGDENHIL (1996), há correlação positiva entre a concentração de açúcares e o acúmulo de matéria seca total, o que reflete em crescimento das plantas, ao aumentar a taxa de divisão celular. Esta influencia a capacidade de regeneração *in vitro*. Entretanto, de acordo com GALZY e COMPAN (1992), esta associação só é válida em baixas concentrações de açúcares.

Tabela 1 - Resumo da análise de variância conjunta dos dados de número de brotos (NB), comprimento dos brotos (CB), número de folhas dos brotos (NF), número de raízes dos brotos (NR), comprimento das raízes (CR) e peso da matéria fresca (PF) e seca (PS) dos brotos de *Ocimum selloi* Benth em função das concentrações de sacarose (SAC) e sais (MS). UFV, Viçosa / MG, 1999.

F.V	G.L	Quadrados Médios						
		NB	CB	NF	NR	CR	PF	PS
SAC	1	12,893 ^{ns}	113,727*	16,509 ^{ns}	6,509 ^{ns}	39,176*	0,140*	0,003*
MS	1	0,080 ^{ns}	38,964 ^{ns}	25,080 ^{ns}	6,036 ^{ns}	11,341 ^{ns}	0,040 ^{ns}	0,001 ^{ns}
SAC MS	1	1,509 ^{ns}	78,189*	84,009 ^{ns}	16,509 ^{ns}	22,143*	0,063*	0,001*
Resíduo	24	4,531	10,287	54,887	5,365	3,347	0,009	0,001
C.V. (%)		31,367	44,859	54,091	52,728	54,266	47,666	38,183

^{ns} - Não significativo.

* - Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 2 - Análises de variância individuais dos caracteres comprimento dos brotos (CB), comprimento das raízes (CR), peso da matéria fresca (PF) e seca (PS) dos brotos de *Ocimum selloi* dentro da concentração de 3% de sacarose.

Quadrados Médios					
F.V.	G.L.	CB	CR	PF	PS
Sais de "MS"	1	3,3800000 ^{ns}	0,9000000 ^{ns}	0,0013710 ^{ns}	0,0000006 ^{ns}
Resíduo	12	14,5500000	4,1300000	0,0067170	0,0000727
C.V. (%)		74,29	92,83	62,77	44,71

^{ns} - Não significativo.

Tabela 3 - Análises de variância individuais dos caracteres comprimento dos brotos (CB), comprimento das raízes (CR), peso da matéria fresca (PF) e seca (PS) dos brotos de *Ocimum selloi* dentro da concentração de 2% de sacarose.

Quadrados Médios					
F.V.	G.L.	CB	CR	PF	PS
Sais de MS	1	113,7700000*	32,5900000**	0,0100000*	0,0010710*
		*			
Resíduo	12	5,5400000	1,9000000	0,0120000	0,0001580
C.V. (%)		25,68	30,27	40,19	32,62

* e ** - Significativo respectivamente, a 5 e 1 % de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 4 - Médias de comprimento dos brotos (CB), comprimento das raízes (CR), peso da matéria fresca (PF) e seca (PS) dos brotos obtidos a partir de segmentos caulinares nodais de *O. selloi* cultivados *in vitro*, em duas concentrações de sacarose e de sais no meio MS.

3% de Sacarose					
Médias					
Sais de "MS"	CB	CR	PF	PS	
100% de Sais	4,16	1,94	0,12	0,019	
50% de Sais	5,63	2,44	0,14	0,019	
2% de Sacarose					
Médias					

Sais de "MS"	CB	CR	PF	PS
100% de Sais	12,02	6,08	0,36	0,05
50% de Sais	6,31	3,03	0,19	0,03

Figura 1 - Cultivo *in vitro* de segmentos caulinares nodais da Alfavaca (*Ocimum selloi* Benth) em meio MS contendo A - 3 % de sacarose e 100 % de sais, B - 3 % de sacarose e 50 % de sais, C - 2 % de sacarose e 100 % de sais, D - 2 % de sacarose e 50 % de sais. UFV, Viçosa / MG. Escala = 1 cm.

Referências Bibliográficas

- BORKOWSKA, B., SZCZERBA, J. Influence of different carbon sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. **Journal of Experimental Botany**, v. 42. p. 911 - 915, 1991.
- BRANDT, K. Micropropagation of *Campanula isophylla* Moretti. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 29, p. 31 - 34, 1992.
- BROWN, D. C. W. The role of osmotic regulation in morphogenesis. **In Vitro**, n. 18, p. 318 - 320, 1982.
- CABASSON, C., OLLITRAULT, P., COTE, F. X., MICHAUX-FERRIERE, N., DAMBIER, D., DALNIC, R., TEISSON, C. Characteristics of *Citrus* cell

- cultures during undifferentiated growth on sucrose and somatic embryogenesis on galactose. **Physiologia Plantarum**, v. 93, p. 464 - 470, 1995.
- EDELMAN, J.; HANSON, A. D. Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in carrot callus cultures. **Planta**, v. 98, p. 150 - 156, 1971.
- EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 36, p. 23 - 28, 1976.
- GALZY, R.; COMPAN, D. Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of *Vitis* plantlets cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 31, p. 239 - 244, 1992.
- HYNDMAN, S. E., HASEGAWA, P. N., BRESSAN, R. A. The role of sucrose and nitrogen in adventitious root formation on cultured rose shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 1, p. 229 - 238, 1982.
- IRIOGYEN, J. J., EMERICH, D. W.; SANCHEZ-DIAZ, M. Water stress induces changes in concentration of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. **Physiologia Plantarum**, v. 84, p. 55 - 60, 1992.
- KOMAI, F., OKUSE, I., SAGA, K., HARADA, T. Improvement on the efficiency of somatic embryogenesis from spinach root tissues by applying various sugars. **Journal of Japanese Society of Horticultural Science**, v. 65, p. 67 - 72, 1996.
- KOZLINA, B. P., VRANJES, V. K., SLADE, D. *In vitro* propagation of *Fibigia triquetra* (D.C.) Boiss., a rare stenoendemic species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, p. 141 - 143, 1997.

- LIPAVSKA, H., VREUDENHIL, D. Uptake of mannitol from the media by in vitro grown plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, p. 103 - 107, 1996.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473 - 497, 1962.
- NORGAARD, J., Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies nordmanniana* LK. **Plant Science**, v. 124, p. 211 - 221, 1997.
- PREMACHANDRA, G. S., SANEOKA, H., FUJITA, K., OGATA, S. Leaf water relations, osmotic adjustment, cell membrane stability, epicuticular wax load and growth as affected by increasing water deficits in sorghum. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, p. 1569 - 1576, 1992.
- SOBTI, S. N. PUSHPANGADAN, P. Studies in the genus *Ocimum*: cytogenetics, breeding and production of new strains of economic importance. In: Atal, C. K., Kapur, B. M. (Eds.) **Cultivation and Utilization of Aromatic Plants**, Jammu - Tawi, India: Council of Scientific & Industrial Research, 1982. p. 457 - 472.
- YAMADA, Y.; SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. **Plant Cell Physiology**, v. 19, p. 691 - 699, 1978.

Efeito de concentrações de ANA e BAP e da posição dos explantes na indução de organogênese *in vitro* em segmentos caulinares internodais de alfavaca (*Ocimum selloi* Benth). Amaral, C. L. F¹; Casali, V. W. D²; Otoni, W. C³, Finger, F. L.⁴

Introdução

A existência de eficiente sistema de regeneração *de novo* a partir de células, tecidos e órgãos vegetais é pré-requisito essencial à aplicação de técnicas biotecnológicas modernas no melhoramento genético de diversas plantas, dentre as quais destacam-se as medicinais (SAITO et al, 1992; CALDENTEY e HILTUNEN, 1996).

Em geral, na regeneração *in vitro* são usadas citocininas afim de se promover a formação de brotos; sendo que, conforme SNIR e EREZ (1980), as raízes podem surgir, espontaneamente, ou, segundo HASEGAWA (1980), terem sua produção induzida por uma auxina. De acordo com WRIGHT et al. (1986) pode-se, ainda, utilizar-se de combinação simultânea de citocinina e auxina na regeneração de órgãos vegetais. Assim, no protocolo de regeneração a fase de indução de brotos é tão importante quanto a etapa de indução de raízes. A alfavaca (*Ocimum selloi* Benth) além de medicinal, é aromática e condimentar

¹Professor, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil. CEP: 36036 - 330.

²Professor, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. CEP: 36571 - 000.

³Professor, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. CEP: 36571 - 000

⁴Professor, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. CEP: 36571 - 000.

(SOBTI e PUSHPANGADAN, 1982). Face ao exposto e devido a carência de estudos abrangendo a cultura de tecidos nesta espécie, foi objetivo deste trabalho estudar o efeito de concentrações de ANA e BAP em função das posições dos explantes na indução de organogênese *in vitro* em *O. selloi* Benth, com vistas a fornecer subsídios a transformação genética desta espécie, tal a sua relevância farmacológica.

Material e Métodos

Material Vegetal e Cultivo *in vitro*

As plantas matrizes foram obtidas a partir de sementes que geraram mudas em canteiros do Grupo Entre - Folhas / Plantas Medicinais do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. As plantas foram cultivadas ao ar livre em vasos com capacidade de oito litros de substrato com três partes de solo e uma parte de composto orgânico. As sementes das plantas matrizes foram colhidas e lavadas em água corrente. Em seguida foram colocadas em solução 2 mg L⁻¹ de benomil por 15 minutos, posteriormente, foram lavadas 8 vezes em água deionizada e autoclavada; mergulhadas em álcool 70% (v/v) por 30 segundos e transferidas a solução hipoclorito de sódio de 2,5% (v/v) e 0,1% (v/v) de Tween 20, por 10 minutos; em seguida foram novamente lavadas 7 vezes em água deionizada e autoclavada. A inoculação das sementes foi realizada em tubos de ensaio contendo meio “MS” (MURASHIGE e SKOOG, 1962), sendo feita na capela de fluxo laminar, em condições assépticas. As sementes germinadas originaram plantas, das quais aos 45 dias de cultivo *in vitro* foram coletados o primeiro, segundo e terceiro segmentos caulinares internodais que foram manuseados como explantes. As culturas foram mantidas em sala de crescimento a 26 ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 31 μmol m⁻² s⁻¹.

Meio de Regeneração

O meio de cultura utilizado tanto na formação de brotos quanto de raízes foi o “MS” proposto por MURASHIGE e SKOOG (1962). Na produção de ramos, este meio foi acrescido de 2% (p/v) de sacarose e suplementado com as seguintes combinações de ANA/BAP em mg L⁻¹: 0,01/0,00, 0,01/0,25, 0,01/0,50, 0,01/0,75, 0,01/1,00, 0,10/0,00, 0,10/0,25, 0,10/0,50, 0,10/0,75, 0,10/1,00, 1,00/0,00, 1,00/0,25, 1,00/0,50, 1,00/0,75, 1,00/1,00. Este meio teve o pH ajustado a 5,7 ± 0,1, com HCL

ou KOH a 0,1N; sendo solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar “Merck”, distribuindo-se 15mL do meio por tubo de ensaio, com dimensões de 25 x 150 mm; vedado, posteriormente, com tampa de polipropileno. A esterilização do meio de cultura foi feita por autoclavagem, à temperatura de 121°C e pressão de 1atm, durante 15 minutos.

Enraizamento

Os brotos foram empregados como explantes, sendo inoculados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com quatro concentrações de ANA (0,00, 0,01; 0,10; 1,00 mg L⁻¹), 3% (p/v) de sacarose e 7 g L⁻¹ de Ágar “Merck”; sendo o pH ajustado a $5,7 \pm 0,1$ com HCl ou NaOH a 0,1N. As culturas foram mantidas em sala de crescimento à $26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Aclimação das Plantas

Após o processo de enraizamento, as plantas foram retiradas dos tubos de ensaio e as raízes foram lavadas com água deionizada e autoclavada. Em seguida, foram acondicionadas em béqueres contendo água deionizada e autoclavada, envolvidos por um saco plástico e mantidas sob condições de ambiente. Orifícios pequenos foram feitos nos sacos plásticos a cada dois dias, sendo que após o décimo dia, as plantas foram transferidas para vasos plásticos e conduzidas em casa de vegetação.

Delineamento Experimental

O experimento de regeneração *in vitro* foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 3 x 5 x 3 (concentrações de ANA, concentrações de BAP e posições dos explantes) com 3 repetições; totalizando 135 parcelas. Cada parcela continha 8 segmentos caulinares internodais, sendo 1 explante por tubo de ensaio. As culturas foram inspecionadas semanalmente. Após 45 dias de cultivo foram feitas avaliações qualitativas e quantitativas.

As variáveis das análises qualitativas foram: presença e ausência de calos, bem como de órgãos produzidos de forma direta ou indireta; respectivamente, sem e com formação de calos.

As variáveis quantitativas foram: frequência de calogênese, frequência de organogênese, média de órgãos produzidos e eficiência de organogênese. Apenas os brotos foram considerados na ocorrência de órgãos, bem como na sua contagem. As frequências de calogênese e organogênese, média de órgãos produzidos e eficiência de organogênese foram obtidas, respectivamente, pelas relações: número de explantes calogênicos / número total de explantes (calogênicos e não - calogênicos) x 100, número de explantes organogênicos / número total de explantes (organogênicos e não - organogênicos) x 100, número de órgãos / número total de explantes e, finalmente, frequência de organogênese x média de órgãos produzidos.

No enraizamento, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos (níveis de ANA), 10 repetições, 1 tubo de ensaio por parcela e 1 explante em cada tubo de ensaio. O experimento foi avaliado aos 30 dias após instalação, determinando-se comprimento das raízes (cm) e número de raízes.

Resultados e Discussão

Por não haver homogeneidade dos dados, bem como variância e distribuição normal; foi adotado, apenas no experimento de regeneração *de novo*, estatística descritiva. Assim, nas tabelas 1, 2 e 3, estão apresentados os efeitos da suplementação do meio de cultura com concentrações de ANA e BAP em função das posições dos explantes na indução de calogênese e de organogênese *in vitro* em *O. selloi* Benth.

Em relação a organogênese, melhores resultados foram obtidos com o primeiro segmento caulinar internodal que apresentou, em meio de cultivo suplementado com 0,10 mg L⁻¹ de ANA e 1,00 mg L⁻¹ de BAP, frequência de organogênese de 93,33 %, média de órgãos produzidos de 2,80 e eficiência de organogênese de 2,60 (Tabela 1); não havendo diferença na organogênese do segundo e terceiro segmento caulinar internodal, os quais possuíram frequência de organogênese de 73,33 %, média de órgãos produzidos de 1,80 e eficiência de organogênese de 1,32 (Tabelas 2 e 3). Quanto a calogênese, os melhores resultados foram obtidos com o primeiro e o terceiro segmento caulinar internodal que mostraram, em meio de cultivo complementado com 1,00 mg L⁻¹ de ANA e 0,25 mg L⁻¹ de BAP, a frequência de calogênese de 60,00 % (Tabelas 1 e 3). De acordo com TRAN THANH VAN (1981), em geral, a relação auxina / citocinina inferior a 1 estimula a indução de brotações e, superior a 1, promove a indução de raízes; podendo surgir calos. Altas concentrações destes fitoreguladores foram prejudiciais ao crescimento e desenvolvimento vegetal (Tabelas 1, 2 e 3), o que conforme KUMAR et al. (1985) pode ter ocorrido, provavelmente, devido ao caráter tóxico apresentado por estes compostos em doses excessivas.

Em função das combinações de fitoreguladores e das posições dos explantes nas plantas, houve grande variação nas respostas morfogênicas, pois dependendo das combinações ANA / BAP ocorreu apenas formação de brotos ou somente de raízes ou, ainda, de ambos (Figura 1) Segundo HAMMERSCHLAG (1982) um balanço adequado entre auxinas e citocininas é, freqüentemente, necessário na formação de brotos e / ou raízes; sendo que a concentração de cada tipo destas

substâncias difere de acordo com a espécie, as condições do meio de cultivo e a composição de seus elementos. Portanto, de acordo com YUAN et al., (1994), a base do controle hormonal da morfogênese pode ser dada, principalmente, pela manipulação da relação entre estas classes de substâncias reguladoras do crescimento.

Neste trabalho, foi observado a ocorrência de organogênese direta, não havendo organogênese indireta (Tabelas 1, 2 e 3). A organogênese sem que se evidencie a formação de calos, segundo STABA (1985), por ter promovido a regeneração *de novo*, é favorável a transformação desta espécie. Conforme LOWE et al. (1996), a cultura de tecidos não é um pré-requisito indispensável na transferência gênica entre as espécies; mas é empregada em quase todo sistema de transformação, sendo usada na seleção e regeneração de possíveis indivíduos transgênicos. De acordo com SIEMENS e SCHIEDER (1996) no sistema de cultura de tecidos destinado à transformação vegetal, o mais importante é o número de células regeneradas acessíveis a transferência gênica e que retenham a capacidade de regeneração após serem transformadas.

A análise de variância do comprimento das raízes e do número de raízes obtidas de segmentos caulinares nodais de *O. selloi* cultivados *in vitro* em função das concentrações de ANA está sumarizada na Tabela 1. Houve diferença, a nível de 5 % de probabilidade, pelo teste F, tanto no comprimento das raízes quanto no número de raízes. Foram testados, os modelos de regressão linear e quadrático, verificando-se que o modelo linear apresentou maior ajuste aos dados do número de raízes e o modelo quadrático do comprimento de raízes.

Com relação ao enraizamento dos brotos recém - regenerados, constatou-se que tanto o número de raízes (Figura 2) quanto o comprimento de raízes (Figura 3) foram crescentes à medida que elevou-se a concentração de ANA (Figura 4). A formação de raízes em *Ocimum selloi* ocorreu de forma espontânea na ausência de substâncias reguladoras de crescimento, o que condiz com o estudo de MOMCILOVIC et al., (1997) com *Gentiana acaulis*, *Gentiana cruciata*, *Gentiana*

lutea e *Gentiana purpurea*. Determinadas espécies enraizam em meio sem substâncias reguladoras de crescimento (ANDERSON, 1984). Neste caso, os brotos são fontes de produção de auxinas que, ao serem translocadas do ápice para a base, estimulam a rizogênese. Contudo, é muito comum os explantes necessitarem de auxina suplementar no meio para enraizarem (SNIR e EREZ, 1980).

Em geral, os tipos e os teores de auxinas são as variáveis que mais influenciam na indução de raízes *in vitro*. Sendo assim, normalmente, não é necessário o uso de outros fitoreguladores, os quais podem ser até prejudiciais. No entanto, já foram relatados estudos em que o acréscimo de citocininas (NEMETH, 1979) ou giberelinas (QUOIRIN et al., 1974) no meio de cultivo foi favorável ao enraizamento de certas espécies. Verificou-se, ainda, que em *Ocimum selloi*, a produção de raízes ocorreu sem que houvesse a formação de calos, o que contradiz com o trabalho feito por SUDHA e SEENI (1996) em *Rauwolfia micrantha*.

Tabela 1 - Efeito de concentrações de ANA e BAP na indução de brotos a partir de cultivo *in vitro* do primeiro segmento caulinar internodal de *Ocimum selloi* Benth.

Concentrações de ANA\BAP (mg L ⁻¹)	Frequência de Calogênese (%)	Frequência de Organogênese (%)		Média de Órgãos Produzidos		Eficiência de Organogênese	
		Direta	Indireta	Direta	Indireta	Direta	Indireta
0,01\0,00	-	-	-	-	-	-	-
0,01\0,25	-	-	-	-	-	-	-
0,01\0,50	-	13,33	-	0,33	-	0,04	-
0,01\0,75	-	33,33	-	0,66	-	0,22	-
0,01\1,00	-	-	-	-	-	-	-
0,10\0,00	-	-	-	-	-	-	-
0,10\0,25	-	12,50	-	0,25	-	3,13	-
0,10\0,50	-	13,33	-	0,33	-	0,04	-
0,10\0,75	-	26,67	-	0,47	-	0,13	-
0,10\1,00	-	93,33	-	2,80	-	2,60	-
1,00\0,00	47,00	53,00	-	1,60	-	0,85	-
1,00\0,25	60,00	40,00	-	1,20	-	0,48	-
1,00\0,50	-	13,33	-	0,33	-	0,04	-
1,00\0,75	-	-	-	-	-	-	-
1,00\1,00	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 2 - Efeito de concentrações de ANA e BAP na indução de brotos a partir de cultivo *in vitro* do segundo segmento caulinar internodal de *Ocimum selloi* Benth.

Concentrações de	Frequência	Frequência de	Média de	Eficiência de
------------------	------------	---------------	----------	---------------

ANA\BAP (mg L ⁻¹)	de Calogênese (%)	Organogênese (%)		Órgãos Produzidos		Organogênese	
		Direta	Indireta	Direta	Indireta	Direta	Indireta
0,01\0,00	-	-	-	-	-	-	-
0,01\0,25	-	-	-	-	-	-	-
0,01\0,50	-	-	-	-	-	-	-
0,01\0,75	-	40,00	-	0,73	-	0,29	-
0,01\1,00	-	66,67	-	1,33	-	0,88	-
0,10\0,00	-	-	-	-	-	-	-
0,10\0,25	-	-	-	-	-	-	-
0,10\0,50	-	13,33	-	27,00	-	0,04	-
0,10\0,75	-	33,33	-	1,00	-	0,33	-
0,10\1,00	-	73,33	-	1,80	-	1,32	-
1,00\0,00	20,00	-	-	-	-	-	-
1,00\0,25	50,00	-	-	-	-	-	-
1,00\0,50	-	-	-	-	-	-	-
1,00\0,75	-	-	-	-	-	-	-
1,00\1,00	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3 - Efeito de concentrações de ANA e BAP na indução de brotos a partir de cultivo *in vitro* do terceiro segmento caulinar internodal de *Ocimum selloi* Benth.

Concentrações de	Frequência	Frequência de	Média de	Eficiência de
------------------	------------	---------------	----------	---------------

ANA\BAP (mg L ⁻¹)	de Calogênese (%)	Organogênese (%)		Órgãos Produzidos		Organogênese	
		Direta	Indireta	Direta	Indireta	Direta	Indireta
0,01\0,00	-	-	-	-	-	-	-
0,01\0,25	-	-	-	-	-	-	-
0,01\0,50	-	-	-	-	-	-	-
0,01\0,75	-	-	-	-	-	-	-
0,01\1,00	-	66,67	-	0,73	-	0,29	-
0,10\0,00	-	-	-	-	-	-	-
0,10\0,25	-	-	-	-	-	-	-
0,10\0,50	-	-	-	-	-	-	-
0,10\0,75	-	33,33	-	1,00	-	0,33	-
0,10\1,00	-	73,33	-	1,80	-	1,31	-
1,00\0,00	47,00	53,33	-	1,60	-	0,85	-
1,00\0,25	60,00	40,00	-	1,00	-	0,40	-
1,00\0,50	-	-	-	-	-	-	-
1,00\0,75	-	-	-	-	-	-	-
1,00\1,00	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 1 - Resumo da análise de variância do comprimento das raízes e do número de raízes de segmentos caulinares nodais de *Ocimum selloi*. UFV, Viçosa / MG, 1999.

F. V.

G. L.

Quadrados Médios

		Comprimento de Raízes	Número de Raízes
Tratamentos	3	4,140250*	3,225000*
Resíduo	36	0,045250	0,521296
C.V.(%)		22,101	44,431

* - Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Figura 1 - Regeneração de brotos (a), raízes (b) ou brotos e raízes (c) obtidos a partir do cultivo *in vitro* do primeiro segmento caulinar internodal da Alfavaca (*Ocimum selloi Benth*) em meio MS suplementado com 0,10 mg L⁻¹ de ANA e 1,00 mg L⁻¹ de BAP. UFV, Viçosa / MG, 1999.

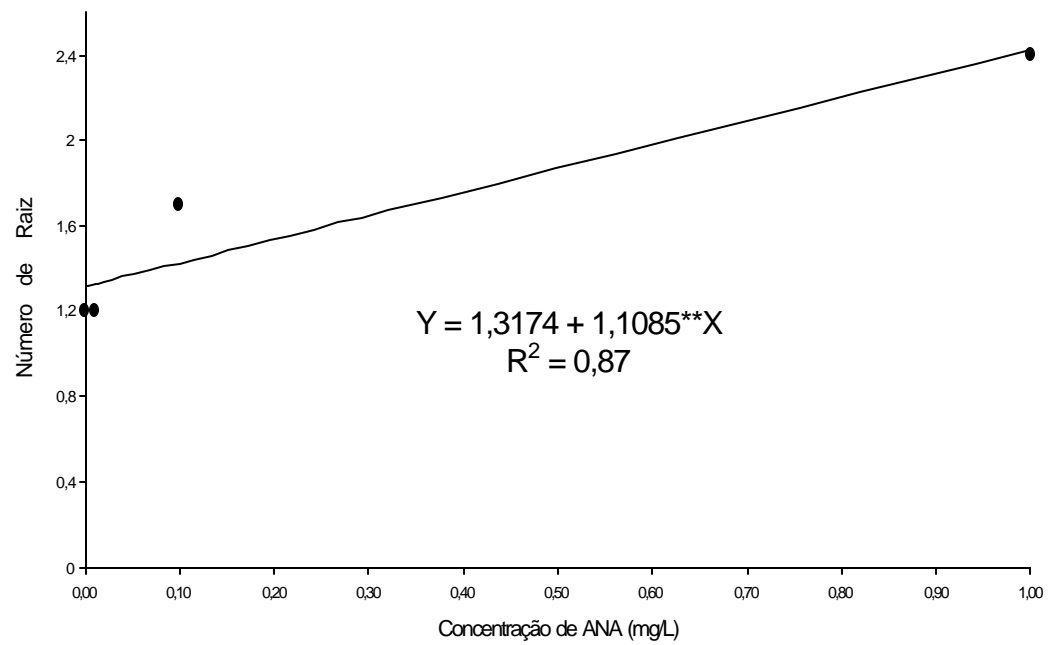


Figura 2 - Efeito de concentrações de ANA sobre o número de raízes provenientes de segmentos caulinares nodais de *Ocimum selloi* Benth cultivados *in vitro*. UFV, Viçosa / MG, 1999.

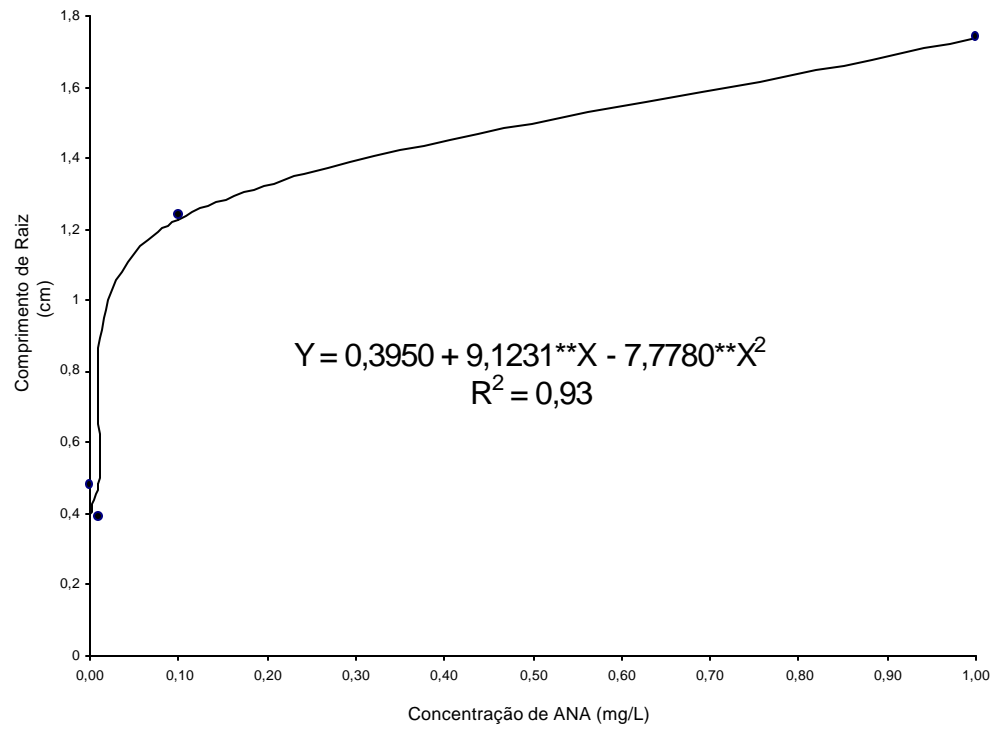


Figura 3 - Efeito de concentrações de ANA sobre o comprimento de raízes (cm) provenientes de segmentos caulinares nodais de *Ocimum selloi* Benth cultivados *in vitro*. UFV, Viçosa / MG, 1999.

Figura 4 - Efeito de concentrações de ANA sobre o comprimento de raízes e o número de raízes provenientes de segmentos caulinares nodais de *Ocimum selloi* Benth cultivados *in vitro*. UFV, Viçosa / MG, 1999.

Referências Bibliográficas

ANDERSON, W. C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 109, p. 343 - 347, 1984.

- CALDENTY, K.M.O., HILTUNEN, R. Transgenic crops for improved pharmaceutical products. **Fields Crops Research**, v.45, p.57 - 69, 1996.
- HAMMERSCHLAG, F. Factors affecting establishment and growth of peach shoots *in vitro*. **HortScience**, v. 17, p. 85 - 86. 1982.
- HASEGAWA, P. M. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 105, p. 216 - 220, 1980.
- KUMAR, K. B., PRAKASHKUMAR, P., BALACHANDRAN, S. M.; IYER, R. D. Development of clonal plantlets from immature panicles of cardamom. **Journal of Plant Crops**, v. 13, p. 31 - 34, 1985.
- LOWE, K.C. DAVEY, M.R., POWER, J.B. Plant tissue culture: past, present and future. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 175 - 186, 1996.
- MOMCILOVIC, I., GRUBISIC, D., NESKOVIC, M. Micropropagation of four *Gentiana* species (*G. lutea*, *G. cruciata*, *G. purpurea* and *G. acaulis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 141 - 144, 1997.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473 - 497, 1962.
- NEMETH, G. Benzyladenine - stimulated rooting in fruit - tree rootstocks cultured *in vitro*. **Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie**, v. 95, p. 389 - 396, 1979.
- QUOIRIN, M. BOXUS, P. GASPAR, T. Root initiation and isoperoxidases of stem tip cuttings from mature *Prunus* plants. **Physiologie Vegetale**, v. 12, p. 165 - 174, 1974.

- SAITO, K., YAMAZAKI, M., MURAKOSHI, I. Transgenic medicinal plants: *Agrobacterium*-mediated foreign gene transfer and production of secondary metabolites. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 149 - 162, 1992.
- SIEMENS, J., SCHIEDER, O. Transgenic plants: genetic transformation - recent developments and the state of the art. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 2, n. 2, p.66 - 75, 1996.
- SNIR, I., EREZ, A. *In vitro* propagation of Malling Merton apple rootstocks. **HortScience**, v. 15, p. 597 - 598, 1980.
- SUDHA, C. G., SEENI, S. *In vitro* propagation of *Rauwolfia micrantha*, a rare medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 243 - 248, 1996.
- SOBTI, S. N. PUSHPANGADAN, P. Studies in the genus *Ocimum*: cytogenetics, breeding and production of new strains of economic importance. In: Atal, C. K., Kapur, B. M. (Eds.) **Cultivation and Utilization of Aromatic Plants**. Jammu - Tawi, India: Council of Scientific & Industrial Research, 1982. p. 457 - 472.
- STABA, E.J. Milestone in plant tissue culture systems for the production of secondary products. **Journal of Natural Products**, v. 48, p. 203 - 209, 1985.
- TRAN THANH VAN, K. Control of morphogenesis *in vitro* cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 32, p. 291 - 311, 1981.

WRIGHT, M. S., KOEHLER, S. M., HINCHEE, M. A. CARNES, M. G. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max.* **Plant Cell Reports**, v. 5, p. 150 - 154, 1986.

YUAN, Y. J., HU, T. T., YANG, Y. M. Effects of auxins and cytokinins on formation of *Catharanthus roseus* G. Don multiple shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 37, n. 2, p. 193 - 196, 1994.