



**EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS E
PROPRIEDADES DO PÓLEN E DO ESTIGMA
DO MANJERICÃO (CULTIVAR MARIA
BONITA) COM VISTAS À HIBRIDAÇÃO
ARTIFICIAL**

ANA CARLA BRITO

2009

ANA CARLA BRITO

**EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS E PROPRIEDADES DO PÓLEN E DO
ESTIGMA DO MANJERICÃO CULTIVAR MARIA BONITA COM
VISTAS À HIBRIDAÇÃO ARTIFICIAL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador:

DSc. Cláudio Lúcio Fernandes Amaral

Co-orientadora:

DSc. Tiyoko Nair Hojo Rebouças

VITÓRIA DA CONQUISTA
BAHIA - BRASIL
2009

B875e Brito, Ana Carla.

Emergência de plântulas e propriedades do pólen e do estigma do manjericão (cultivar Maria Bonita) com vistas à hibridação artificial / Ana Carla Brito, 2009.

69 f.: il. Col.

Orientador: Cláudio Lúcio Fernandes Amaral.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Vitória da Conquista, 2009.

Referências: f. 58-69.

1. *Ocimum*. 2. Manjericão – Biologia floral. 3. Fitotecnia - Tese. I. Amaral, Cláudio Lúcio Fernandes. II. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. T.

CDD: 633.83

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
Área de Concentração em Fitotecnia

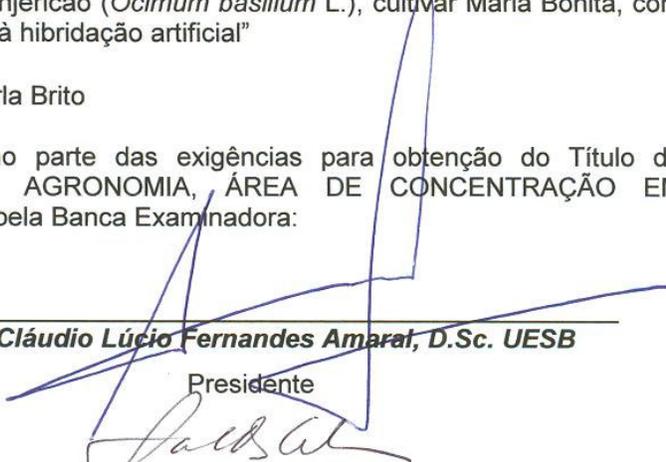
Campus de Vitória da Conquista - BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: "Propriedades do pólen e do estigma e emergência de plântulas do manjeriço (*Ocimum basilium* L.), cultivar Maria Bonita, com vistas à hibridação artificial"

Autor: Ana Carla Brito

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOTECNIA, pela Banca Examinadora:



Prof. Cláudio Lúcio Fernandes Amaral, D.Sc. UESB

Presidente

Profª. Larissa Corrêa do Bomfim Costa D.Sc. UESB



Prof. Abel Rebouças São José, D.Sc. UESB

Data de realização: 13 de fevereiro de 2009.

Estrada do Bem Querer, Km 4 – Caixa Postal 95 – Telefone: (77) 3424-8731 – Fax: (77) 3424-1059 – Vitória da Conquista – BA – CEP: 45083-900 – e_mail: mestrado.agronomia@uesb.br

Àquele que sempre foi e sempre será motivo de adoração e confiança! A ti meu Deus que me fortalece e me dá equilíbrio para enfrentar as adversidades ao longo de minha caminhada.

“Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida”

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu infinito amor, que me dá confiança e força para prosseguir sempre;

Aos meus queridos pais, Carlito e Antonia, por terem me transmitido valores imprescindíveis e terem sido o meu suporte ao longo de minha caminhada.

Aos demais familiares: Adriana, Antonio, Magno, Nilzete, Yan e Luiza pela dedicação e cuidado. Sem vocês jamais teria chegado até aqui;

Ao meu namorado Joadson, pelo amor, companheirismo e incentivo constante. Você foi essencial nesta conquista!

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pela estrutura e formação acadêmica;

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa de mestrado;

Ao meu orientador Dr. Cláudio Lúcio Fernandes Amaral pela confiança e incentivo constante;

A minha co-orientadora Dra. Tiyoko Nair Hojo Rebouças pela amizade e credibilidade;

Aos Prof^{os}. Dr. Alcebíades Rebouças São José e Dr. Quelmo Silva de Novaes pelo acolhimento e apoio em seus laboratórios;

Ao Prof. Dr. Anselmo Eloy Silveira Viana pelo auxílio estatístico;

Ao Prof. MSc. Sandro Correia Lopes pelo apoio e confiança no estágio em ensino;

Aos amigos do mestrado: Manoel, Karol, Franco, Célia, Max pelo companheirismo;

Aos amigos do laboratório de biotecnologia: Darcy, Malu, Adriano e Zorai pela amizade;

Às amigas de república: Taísa, Thereza e Gislane pela amizade e carinho;

A Daniel pela grande ajuda nos experimentos e a Danilo nas análises estatísticas;

À Diretoria de Campo e em especial a Maurício, Roberto, Beto e Márcio pela grande assistência e boa vontade sempre que precisei;

A todos os funcionários pela dedicação;

À banca pela boa vontade em participar de minha defesa;

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse sonho.

Muito Obrigada!

“Aprender é a única
coisa de que a mente
nunca se cansa, nunca
tem medo e nunca se
arrepende”.

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

BRITO, A. C. **Emergência de plântulas e propriedades do pólen e do estigma do manjeriço cultivar Maria Bonita com vistas à hibridação artificial.** Vitória da Conquista-BA: UESB, 2009. 69 p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia)*

O *Ocimum basilicum*, cv. Maria Bonita, conhecido como manjeriço, é uma espécie da família Lamiaceae, que apresenta propriedades aromáticas, condimentares e medicinais. É muito apreciado por ser rico em óleos essenciais, que são destinados para as indústrias farmacêuticas, cosméticas e de alimentos. Conhecer a biologia floral da espécie é de fundamental importância para subsidiar programas de melhoramento genético para a otimização na produção de seu óleo essencial. O objetivo deste trabalho foi estudar a emergência das plântulas e as propriedades do pólen e do estigma do manjeriço (cultivar Maria Bonita) com vistas à hibridação artificial. As investigações foram conduzidas na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-UESB, Campus de Vitória da Conquista-BA, em condições de campo e nos Laboratórios de Biotecnologia, Fitopatologia e da Biofábrica, no período de maio de 2007 a novembro de 2008. O teste de emergência foi em delineamento em blocos casualizados, com quatro tratamentos (substratos) e oito repetições, sendo os substratos utilizados o solo; solo + areia + húmus (1:1:1); vermiculita e o Topstrato®. Alguns aspectos da biologia floral foram analisados como: diagnose floral; determinação da antese; disponibilidade, viabilidade, germinação *in vitro* e conservabilidade dos grãos de pólen e receptividade dos estigmas. Foi verificado que o manjeriço apresenta antese diurna, assincrônica, e com a máxima abertura de flores entre 10:00 e 11:00 h. Os diferentes substratos utilizados não apresentaram diferenças quanto a emergência e índice de velocidade de emergência (IVE). Quanto ao estudo do pólen foi verificado que a viabilidade foi elevada ao longo do dia. Sua conservação por até 90 dias demonstrou bons níveis de viabilidade. Houve baixa percentagem de grãos de pólen formando tubos polínicos nos meios de cultura testados. O estigma apresentou receptividade desde a pré-antese. Estas informações são relevantes para os melhoristas que desejam fazer seleção de genótipos ou hibridações em programas de melhoramento, contribuindo para aumentar o potencial da espécie que já se destaca como produtora de compostos voláteis.

Palavras-chave: *Ocimum*. Cruzamentos Controlados. Fitomelhoramento. Viabilidade. Conservação.

* Orientador: Cláudio Lúcio Fernandes Amaral, D.Sc., UESB e Co-orientadora: Tiyoko Nair Hojo Rebouças, D.Sc., UESB.

ABSTRACT

BRITO, A. C. **Seedling emergence and properties of pollen and stigma of basil cultivar Maria Bonita for the artificial hybridization.** Vitória da Conquista-BA: UESB, 2009. 69 p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia)*

The *Ocimum basilicum*, cv. Maria Bonita, known as basil, is a species of the Lamiaceae family, which has aromatical, condimentar and medicinal properties. It is much appreciated for being rich in essential oils, which are used to pharmaceuticals, cosmetics and food production. To study the floral biology of the species is of fundamental importance to support breeding program to optimize the production of its essential oil. The aim of this work was to study seed germination and properties of pollen and stigma of basil (Maria Bonita cultivar) for the artificial hybridization. The investigations were conducted at the Bahia Southwest University-UESB, Campus de Vitória da Conquista-BA/ Brazil, in the field conditions and Laboratories of Biotechnology, Phytopathology and Biofactory from March 2007 to November 2008. The emergency was in randomized block design with four treatments (substrates) and eight repetitions, and the substrates used in the soil, sand+soil+humus (1:1:1), vermiculite and Topstrato®. Some aspects of floral biology have been analyzed as: floral diagnosis, determination of anthesis; disponibility, viability, *in vitro* germination, conservation of grain of pollen and the stigma receptivity. It was found that the basil presents diurnal anthesis, asynchronous, and the maximum opening of flowers between 10 and 11h. The different substrates used showed no differences in the emergence and emergence speed index (IVE). As the study of pollen was found that the viability was high throughout the day. Their preservation for up to 90 days showed good levels of viability. Low percentage of pollen grains forming pollen tubes in culture medium observed. The stigma receptivity made from pre-anthesis. This information is relevant to breeders who wish to selection of genotypes or hybridizations in breeding programs, contributing to increase the potential of the species that already stands out as producing volatile compounds.

Keywords: *Ocimum*. Artificial hybridization. Plant Breeding. Viability. Conservation.

* Adviser: Cláudio Lúcio Fernandes Amaral, D.Sc., UESB e Coadvise: Tiyoko Nair Hojo Rebouças, D.Sc., UESB.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mudas em casa de vegetação. Vitória da Conquista-BA, 2008.	34
Figura 2 - Mudas já transplantadas e com 60 dias após o plantio. Vitória da Conquista-BA, 2008.	34
Figura 3 - Plantas em vasos utilizados nos experimentos em campo. Vitória da Conquista-BA, 2008.....	35
Figura 4 - Fases de desenvolvimento da flor: (A) botão; (B) flor aberta; (C) flor em senescência; (D) frutos; (E) semente. Vitória da Conquista-BA, 2008.	36
Figura 5 - Disposição dos substratos nas bandejas para a emergência das plântulas de manjeriço. Vitória da Conquista-BA, 2008.	38
Figura 6 - Placas de Petri com meios de cultura para germinação <i>in vitro</i> dos grãos de pólen. Esquema geral do experimento (A) e de uma parcela (B). Vitória da Conquista-BA, 2008.....	40
Figura 7 - Tubos eppendorf contendo as anteras para serem armazenadas em geladeira e em congelador. Vitória da Conquista-BA, 2008.	42
Figura 8 - Inflorescência da cv. Maria Bonita com flores em diferentes estádios de desenvolvimento. Vitória da Conquista-BA, 2008.	44
Figura 9 - Flor da cv. Maria Bonita evidenciando o estigma (A) e as anteras (B). Vitória da Conquista-BA, 2008.....	45
Figura 10 - Plântulas em desenvolvimento nos diferentes substratos utilizados. A (solo); B (solo+areia+húmus); C (vermiculita); D (Topstrato®). Vitória da Conquista-BA, 2008.	48
Figura 11 - Estimativa do número de grãos de pólen disponíveis ao longo do dia, observados em 27, 28 e 29 de maio de 2008. Vitória da Conquista-BA.	49
Figura 12 - Grãos de pólen viáveis (A) e não-viáveis (B) após corados com carmim acético. Vitória da Conquista-BA, 2008.....	50
Figura 13 - Estimativa do número de grãos de pólen viáveis ao longo de 12 h de avaliação, observados em 27, 28 e 29 de maio de 2008. Vitória da Conquista-BA.	51
Figura 14 - Grãos de pólen com tubos polínicos desenvolvidos após 24 h de incubação. Vitória da Conquista-BA, 2008.	52
Figura 15 - Estigma receptivo evidenciando a formação de bolhas. Vitória da Conquista-BA, 2008.....	55
Figura 16 - Estimativa do número de estigmas receptivos ao longo de 12 h de avaliação observados em 27, 28 e 29 de maio. Vitória da Conquista-BA.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Emergência (%) e índice de velocidade de emergência (IVE) (%), de manjerição, cv. Maria Bonita, submetidas a diferentes substratos. Vitória da Conquista-BA.	47
Tabela 2 - Médias de grãos de pólen germinados em diferentes meios de cultura. Vitória da Conquista-BA.	52
Tabela 3 - Viabilidade de pólen armazenados e analisados aos 30, 60 e 90 dias em diferentes ambientes. Vitória da Conquista-BA.	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

cv	- Cultivar
CV	- Coeficiente de Variação
IVG	- Índice de Velocidade de Germinação
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PSF	- Programa de Saúde da Família
RNC	- Registro Nacional de Cultivares
SAEG	- Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas
SISVAR	- Software de análises estatísticas e planejamento de experimentos
UESB	- Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 A Fitoterapia	17
2.2 Classificação Botânica	20
2.3 Importância do <i>Ocimum basilicum</i> L.....	21
2.4 O Melhoramento Genético de Plantas Medicinais.....	22
2.5 A Cultivar Maria Bonita	24
2.6 Emergência das plântulas.....	25
2.7 Aspectos da Biologia Floral.....	26
2.7.1 Disponibilidade dos Grãos de Pólen	28
2.7.2 Viabilidade dos Grãos de Pólen	28
2.7.3 Conservação de Grãos de Pólen.....	30
2.7.4 Germinação <i>in vitro</i> de Grãos de Pólen	31
2.7.5 Receptividade dos Estigmas.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Local do Estudo	33
3.2 Material Vegetal	33
3.3 Diagnose Floral.....	35
3.4 Eventos Florais	36
3.5 Emergência de plântulas	37
3.6 Disponibilidade dos Grãos de Pólen	38
3.7 Viabilidade dos Grãos de Pólen.....	38
3.8 Germinação <i>in vitro</i> dos Grãos de Pólen	39
3.9 Conservabilidade dos Grãos de Pólen.....	41
3.10 Receptividade dos Estigmas	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 Diagnose Floral.....	43
4.2 Eventos Florais	45
4.3 Emergência de Plântulas	47
4.4 Disponibilidade dos Grãos de Pólen.....	48
4.5 Viabilidade dos Grãos de Pólen.....	50
4.6 Germinação <i>in vitro</i> dos Grãos de Pólen	51
4.7 Conservabilidade dos Grãos de Pólen.....	53
4.8 Receptividade dos Estigmas	54
5 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Acredita-se que a utilização de plantas medicinais como terapia preventiva e/ou curativa seja tão antiga quanto o próprio homem (MARTINS e outros, 1994). Com a enorme população de seres humanos na Terra, os altos índices de doenças existentes que afligem a humanidade e o aumento do número de patógenos que debelam a saúde e o bem-estar das pessoas, torna-se evidente a dependência aos efeitos terapêuticos das plantas (OLIVEIRA, J. e outros, 2001).

Algumas espécies aromáticas e condimentares, além de fornecedoras de óleos voláteis ou essenciais, são também medicinais e estão presentes no cotidiano da população. Estas plantas, ou as substâncias delas extraídas, têm sido usadas como flavorizantes, aromatizantes e terapêuticos nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (VERLET, 1992).

O gênero *Ocimum* L. (Lamiaceae) compreende, aproximadamente, 50 espécies (MIELE e outros, 2001) que se distribuem amplamente no planeta, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais (VIEIRA; SIMON, 2000), muitas das quais empregadas pelas comunidades como medicinais, na culinária e no controle de pragas na agricultura. Suas espécies são todas ricas em óleos essenciais (GRAYEY e outros, 1996). A cultivar Maria Bonita (*Ocimum basilicum* L.), também conhecida popularmente como manjeriço é utilizada como aromatizante. No Brasil, ela é cultivada, principalmente, por pequenos produtores rurais da região Nordeste para a comercialização da planta como condimento (BLANK e outros, 2004; TEIXEIRA e outros, 2002; ALBUQUERQUE; ANDRADE, 1998).

Além do uso *in natura*, o manjeriço é muito utilizado para a obtenção de óleo essencial, importante na indústria de perfumaria e na aromatização de alimentos e bebidas (FERNANDES e outros, 2004; MAROTTI e outros, 1996). Seu óleo essencial também apresenta propriedades inseticidas e repelentes

(UMERIE e outros, 1998) e, segundo Bhatnagar e outros (1993), contra os mosquitos *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Têm sido demonstradas ainda, atividades antimicrobianas e na conservação de grãos (MONTES-BELMONT; CARVAJAL, 1998).

Com a crescente utilização de plantas medicinais, torna-se necessário aprimorar o conhecimento sobre suas espécies, visando facilitar o manejo das mesmas, otimizando o aproveitamento de seus princípios ativos (CORREA Jr. e outros, 1991), vislumbrando o grande potencial de mercado, interno e externo.

O estudo da biologia floral é de fundamental importância tanto para subsidiar a condução de programas de melhoramento genético de plantas, pois auxilia na definição de métodos mais apropriados a serem usados, quanto para o correto manejo de determinada cultura (OLIVEIRA e outros, 1999).

O incremento na produção do manjeriço apresenta relevância social, uma vez que as propriedades estimulantes, anti-gripal, diurética, anti-espasmódica, etc, dos chás preparados de suas folhas e inflorescências são amplamente difundidas nas comunidades de baixa renda do semi-árido nordestino, sendo uma alternativa aos medicamentos alopáticos no tratamento de diversas enfermidades entre populações especiais em termos de atenção à saúde, como idosos e crianças recém-nascidas. Transferir tecnologia de propagação desta planta medicinal a pequenos e médios produtores interessados em cultivá-la, torna-se uma alternativa de geração de renda, para a comercialização da matéria prima para as indústrias, que utilizam o seu óleo essencial.

É notória a necessidade da indústria nacional e instituições de fomento investir em pesquisa e desenvolvimento, para que sejam alcançados os padrões de qualidade exigidos pelo mercado. Apesar de constantes estudos, ainda são poucas as informações acerca de algumas espécies, principalmente do manjeriço (cv Maria Bonita), sendo relevante aprimorar os conhecimentos sobre alguns aspectos da biologia floral.

Este trabalho tem como objetivo estudar a emergência das plântulas e as propriedades do pólen e do estigma do manjeriço cultivar Maria Bonita com vistas à hibridação artificial, dada a grande relevância farmacológica e a condição aromática e condimentar desta planta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Fitoterapia

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (ROCHA, 2002; LÓPEZ, 2006). A fitoterapia permite que o ser humano se reconecte com o ambiente, acessando o poder da natureza para ajudar o organismo a normalizar funções fisiológicas prejudicadas restaurar a imunidade enfraquecida, promover a desintoxicação e o rejuvenescimento (FRANÇA e outros, 2008).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Em contrapartida, apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais (SIMÕES e outros, 2003).

No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das ervas terapêuticas como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (AKERELE, 1993). Além disto, aproximadamente, 120 medicamentos utilizados na medicina são provenientes diretamente de plantas, enquanto que muitos outros fármacos são obtidos por semi-síntese de produtos vegetais ou por síntese baseada em moléculas vegetais precursoras (PEZZUTO, 1997).

Segundo Funari e Ferro (2005) a distribuição mundial do mercado de fitoterápicos em 2001 foi de 3,9 bilhões de dólares na América do Norte, US\$ 6,9 bilhões na Europa, US\$ 5,1 bilhões na Ásia, US\$ 2,3 bilhões no Japão, US\$

600 milhões na América do Sul e US\$ 800 milhões nos demais países e regiões, totalizando US\$ 19,6 bilhões.

Avaliando a situação deste mercado extremamente promissor, verifica-se que os processos de extração de substâncias terapêuticas de plantas medicinais brasileiras vêm sendo patenteado por empresas estrangeiras. Há enorme interesse por parte de grandes empresas multinacionais nesse setor da indústria, uma vez que elas são capacitadas tecnologicamente para a nova tendência de mercado (ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 1998).

O desenvolvimento de fitoterápicos inclui várias etapas e envolve um processo interdisciplinar, multidisciplinar e interinstitucional. Estes produtos naturais podem ser tão eficientes quanto os produzidos pela síntese química, contudo a transformação de uma planta em um medicamento deve visar a preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico. As áreas de conhecimento envolvidas vão desde a etnobotânica, botânica, agronomia, ecologia, química, fitoquímica, farmacologia, toxicologia, biotecnologia, química orgânica até a tecnologia farmacêutica (TOLEDO e outros, 2003; LÓPEZ, 2006; MIGUEL; MIGUEL, 1999).

Nos últimos anos, vem ocorrendo no Brasil um aumento acentuado no uso de plantas medicinais. Esse fato está associado não somente ao consumo pela população rural em geral, mas também, e principalmente, ao consumo associado a programas oficiais de saúde. O sistema público de saúde no Brasil não possui uma política de assistência farmacêutica capaz de suprir as necessidades medicamentosas da população, sobretudo no nordeste brasileiro, onde a população carente apresenta dificuldades para obter os medicamentos essenciais, bem como adoece muito mais (COSENDEY e outros, 2000; MATOS, 1998).

Conforme Fuzér e Souza (2003), a utilização de plantas medicinais para produção de medicamentos apresenta uma melhor relação custo/benefício quando comparada aos produtos sintéticos, pois sua ação biológica é eficaz com baixa toxicidade e efeitos colaterais, além de apresentar um custo de produção inferior e, conseqüentemente, um preço de venda menor.

Com a descentralização do poder público, atualmente no país, o município atinge a gestão plena, com autonomia para implantar programas de assistência à saúde, quando necessários (VIANA e outros, 2002; VIANNA; DAL POZ, 1998). Desta forma, alguns estados e municípios brasileiros vêm realizando nas duas últimas décadas a implantação de Programas de Fitoterapia na atenção primária à saúde, com o intuito de suprir as carências medicamentosas de suas comunidades (OGAVA e outros, 2003; MICHILIS, 2004). Nesse sentido, o estado brasileiro instituiu a Portaria nº22/1967 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e a Resolução-RDC nº17/2000 que classifica os fitoterápicos como medicamentos (MINISTÉRIO DA SAÚDE-BRASIL, 2000).

Considerando que grande parte da cobertura da atenção primária no Brasil é realizada mediante o Programa Saúde da Família (PSF), por meio das Unidades de Atenção Básicas, muitos dos programas de fitoterapia desenvolvidos no sistema público de saúde estão, atualmente, vinculados ao PSF.

Além da recomendação do uso, tais programas buscam o incentivo à exploração e/ou a produção sustentada de plantas medicinais. Trabalhos revelam a adoção de programas de incentivo ao cultivo de plantas medicinais como alternativas de diversificação de produção e de renda complementar nas pequenas propriedades rurais (PEREIRA FILHO, 2001; MAZZA e outros, 1998; LOURENZANI e outros, 2004).

2.2 Classificação Botânica

A família Lamiaceae, antiga Labiatae, apresenta ampla distribuição com cerca de 300 gêneros e aproximadamente 7500 espécies. Têm importância hortícola e são utilizadas na culinária, na medicina caseira, na indústria farmacêutica e cosmética (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Seus membros são principalmente herbáceas e arbustos, e não se conhece na família epífitas, saprófitas ou parasitas (RAMAMOORTHY; ELLIOTT, 1993). Seus caules são tetragonares, folhas simples, opostas e cruzadas sem estípulas. Com frequência as plantas estão cobertas por pêlos e de glândulas que emitem fragrâncias. O cálice é fusionado em forma de sino ou cone, algumas vezes bilabiadas; pétalas fusionadas pentâmeras; com quatro a seis estames epipétalos, ovário súpero de dois carpelos fusionados, dos quais formam 4 lóculos distintos cada um com um óvulo basal. O fruto é do tipo aquênio com uma semente (DOMINGUEZ-VÁZQUEZ e outros, 2002).

Existe uma ampla variedade de corola e posição estaminal dentro dessa família, normalmente com uma clara divisão entre o lábio superior e o inferior (STANDLEY; WILLIAMS, 1973).

No Brasil, ocorrem cerca de 350 espécies distribuídas em 26 gêneros (SOUZA, 2005) e muitas espécies de importância econômica, como o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.), hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), lavanda (*Lavandula* spp.), manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.), sálvia (*Salvia officinalis* L.), segurelha (*Satureja hortensis* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) dentre outras (KRUPPA e outros, 2008).

2.3 Importância do *Ocimum basilicum* L.

O gênero *Ocimum* é um importante grupo de plantas aromáticas que produzem óleo essencial rico em constituintes como: ácidos fenólicos, linalol, geraniol, citral, alcanfor, eugenol, timol 1,8-cineol, acetato de nerila, estragol ou metilchavicol, metileugenol, cinamato de metila, farnesol, borneol, safrol e outros compostos (GOVIN e outros, 2000), cuja demanda é muito grande para a fabricação de produtos farmacêuticos, alimentícios e de perfumaria (GUPTA, 1994).

Estes compostos, por sua vez, apresentam as mais variadas atividades farmacológicas, tais como: bactericida, fungicida (CHAO; YOUNG, 2000), antiparasitária e, até mesmo, como repelente de insetos (BAIS e outros, 2002; WANNISSORN e outros, 2005). Segundo trabalhos realizados por Kéita (2001), verificaram ainda efeitos como bioinseticida fumigante.

Entre as espécies do gênero *Ocimum* de maior importância econômica destacam-se *Ocimum basilicum* L., *Ocimum gratissimum* L., *O. americanum* L.; *O. campechianum* L.

O *Ocimum basilicum* L., popularmente chamado de manjerição, alfavaca, alfavaca-cheirosa ou basílico é a espécie da família Lamiaceae mais intensamente cultivada (MIELE e outros, 2001; ÖZCAN e outros, 2002; SILVA e outros, 2005). No Brasil, o manjerição é cultivado principalmente por pequenos produtores rurais para a comercialização da planta como condimento (TEIXEIRA e outros, 2002).

É uma planta anual ou perene, dependendo do local em que é cultivada (BLANK, 2005), e que vem sendo utilizada para os mais diferentes fins: erva aromática e medicinal, inseticida, antiparasitária, repelente de insetos, e como insumo de alto valor para a indústria de perfumaria, cosmética e farmacêutica, além da aromatização de alimentos e bebidas (VENÂNCIO, 2006; LABRA e

outros, 2004; DI CESARE e outros, 2003; MAROTTI e outros, 1996; LOUGHRIN; KASPERBAUER, 2001). É freqüente a utilização de espécies de *Ocimum* na medicina popular como febrífugo, estomáquico, anti-hemético, analgésico, estimulante, anti-tussígeno e emenagogo. Extrai-se do *Ocimum basilicum* L., óleo essencial que possui propriedades estimulantes, antiespasmódicas, digestivas, carminativas e antitussígenas (CERONI, 1989). Além de ter propriedades antifúngicas, antibacterianas e repelente de insetos (BAIS e outros, 2002; WANNISSORN e outros, 2005).

Esta hortaliça foi mais amplamente plantada após a vinda de imigrantes italianos para o Brasil, sendo utilizada como folhas verdes em massas, condimento *in natura* e processado como folhas secas inteiras ou moídas e, ainda, como matéria-prima para a indústria de óleos essenciais (VIEIRA; SIMON, 2000).

O termo “óleo essencial” é empregado para designar líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte quase sempre agradável extraídos de plantas por alguns processos específicos, sendo o mais freqüente a destilação com arraste de vapor d’água (CRAVEIRO e outros, 1981). Estes são provenientes do metabolismo secundário, existentes em quase duas mil espécies de plantas dispersas em 60 famílias (LEAL, 1998). Na família Lamiaceae, gênero *Ocimum*, são produzidos por estruturas secretoras especializadas, tais como glândulas capilares (BRADY e outros, 1981).

2.4 O Melhoramento Genético de Plantas Mediciniais

O melhoramento genético vegetal proporcionou importantes conquistas produtivas nas últimas décadas (BORÉM, 2001). É a mais valiosa estratégia para o aumento da produtividade de forma sustentável e ecologicamente equilibrada e para padronizar princípios ativos, no caso de plantas medicinais e

aromáticas. Estima-se que metade do incremento da produtividade das principais espécies agronômicas, nos últimos 50 anos, seja atribuída ao melhoramento genético (BUENO e outros, 2001).

O melhoramento de plantas nasceu com o início da agricultura. Na verdade é difícil precisar se foi a agricultura que incentivou a prática do melhoramento de plantas pelos primeiros agricultores ou vice-versa. Provavelmente, ambos evoluíram paralelamente na direção de aumentos na qualidade e na produtividade das culturas domesticadas pelo homem (BORÉM; MILACH, 1999).

No momento que se fazem reflexões, surgem muitas indagações a respeito de como e para onde continuará evoluindo o melhoramento de plantas. O certo é que o século XX presenciou grandes avanços na prática do melhoramento, como a automatização de plantio, a colheita de experimentos com maquinaria especializada; a informatização da maioria dos programas de melhoramento no mundo e a rapidez no processamento e divulgação de dados. Também os conhecimentos de genética, estatística, bioquímica e fisiologia associados às práticas da genética quantitativa, da mutagênese, da cultura de células e tecidos e, mais recentemente, da biologia molecular, representam auxílios para o melhoramento de plantas. Todos esses avanços no conhecimento ocorridos no final deste milênio geraram grande expectativa a respeito do que está por vir no próximo milênio (BORÉM; MILACH, 1999).

De acordo com Oliveira e outros (1999), o objetivo do melhoramento em plantas medicinais é obter, em mesmo local de cultivo, aumento de massa seca e/ou fresca ou, ainda, aumento do teor de princípios ativos em determinado órgão vegetal; de modo que estas características sejam mantidas na geração seguinte, permitindo obter ganhos adicionais nas gerações subseqüentes. Assim, o produto do melhoramento em plantas medicinais é o princípio ativo (composto

químico com efeito terapêutico) ou o fitocomplexo (conjunto de princípios ativos).

2.5 A Cultivar Maria Bonita

Blank e outros (2004) constataram a variabilidade genética de *Ocimum* sp., ao realizar a caracterização morfológica e agrônômica de 55 acessos. Esses autores observaram variações genotípicas em relação ao teor e rendimento do óleo essencial, e notaram genótipos promissores para o desenvolvimento de cultivares com alto teor e rendimento de óleo essencial rico em linalol e outros princípios ativos.

O programa de melhoramento genético da Universidade Federal de Sergipe vem, desde o ano 2000, realizando ensaios de avaliação de comportamento de acessos de manjeriço, a fim de identificar materiais de alta produção de óleo essencial rico em linalol (BLANK e outros, 2007). O objetivo, ao melhorar espécies medicinais e aromáticas, é obter maior produtividade expressada pelos caracteres quantitativos, que inclui o teor de princípios ativos, e pelos caracteres qualitativos, que inclui os tipos de princípios ativos e seus principais constituintes químicos (KAMADA e outros, 1999).

O estudo começou com a caracterização morfológica, agrônômica e química de acessos de manjeriço que resultou na seleção do PI-197442 (acesso obtido do Banco de Germoplasma North Central Regional PI Station, Iowa, State University, EUA), utilizando o método da auto-fecundação, após quatro ciclos e seleção para o alto rendimento do óleo essencial rico em linalol, recebendo o nome de Maria Bonita (VENÂNCIO, 2006), que é a primeira cultivar de manjeriço registrada no RNC (Registro Nacional de Cultivares) pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no Brasil em 29 de agosto de 2007, sob o número 22019 (BLANK, 2005).

A cv. Maria Bonita possui altura média de 45,50 cm, copa arredondada e hábito de crescimento ereto, o que, em conjunto, favorece a sua colheita, tanto manual como mecanizada. Suas folhas possuem comprimento médio de 6,5 cm e largura de 2,8 cm, largura média de copa de 45,70 cm, diâmetro médio do caule de 1,32 cm. Com ciclo médio de 80 dias para o florescimento, peso de sementes médio de 1,90 g por planta e peso médio de 1.000 sementes de 0,90 g (BLANK e outros, 2007).

2.6 Emergência das plântulas

O conhecimento das condições ideais para a germinação da semente de uma determinada espécie é de fundamental importância, principalmente, pelas respostas diferenciadas que ela pode apresentar em função de diversos fatores, como viabilidade, dormência, condições de ambiente, envolvendo água, luz, temperatura, oxigênio e ausência de agentes patogênicos, associados ao tipo de substrato para sua germinação (BRASIL, 1992; BEWLEY; BLACK, 1994; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Os substratos em geral têm como principal função dar sustentação às sementes, tanto do ponto de vista físico como químico, e são constituídos por três frações, a física, a química e a biológica. As frações físico-químicas são formadas por partículas minerais e orgânicas, contendo poros que podem ser ocupados por ar e/ou água e, a fração biológica pela matéria orgânica (AGUIAR e outros, 1993). Em função do tamanho e exigências ecofisiológicas das sementes quanto à umidade e luz, cada substrato é utilizado de maneira que ofereça maior praticidade nas contagens e avaliação das plântulas, mantendo a capacidade de suprir as condições ideais no decorrer do teste de germinação (POPINIGS, 1985).

O processo germinativo é bastante influenciado pelo substrato, pois fatores como aeração, estrutura, capacidade de retenção de água, grau de infestação de patógenos, entre outros; podem variar de um substrato para outro, favorecendo ou prejudicando a germinação das sementes. O substrato deve manter uma proporção adequada entre disponibilidade de água e aeração, não devendo permanecer umedecido em excesso para evitar que uma película de água envolva a semente, restringindo a entrada de oxigênio (SCALON e outros, 1993). Portanto, a escolha do tipo de substrato deve ser feita de acordo com as exigências da semente em relação ao seu tamanho e formato (BRASIL, 1992).

Por outro lado, a determinação do substrato é importante tanto para a produção de mudas como para a padronização de testes de germinação. A padronização visa a uniformidade dos resultados, permitindo a comparação entre diferentes laboratórios (LIMA; DORNELLES, 2002).

O substrato ideal deve ser de fácil disponibilidade de aquisição e transporte, ausência de patógenos e plantas daninhas, riqueza em nutrientes essenciais, pH adequado, boa textura estrutura e aeração (SILVA e outros, 2001; POPINIGIS, 1985).

Em função disso, tem-se observado maior interesse por parte dos produtores e viveiristas conhecerem técnicas de manejo adequado para obtenção de mudas, bem como do desenvolvimento adequado das mesmas.

2.7 Aspectos da Biologia Floral

Trabalhos de domesticação de plantas medicinais são escassos ou inexistentes para a maioria das espécies, sendo necessário o desenvolvimento de estudos relacionados à adaptação destas plantas às condições de cultivo, principalmente em virtude do aumento da demanda por parte das indústrias farmacêutica e cosmética (COSTA e outros, 2007).

Apesar de existirem espécies do gênero *Ocimum* que se hibridizam facilmente, há espécies em que a promoção da hibridação se constitui em um sério problema ao melhoramento genético, portanto, para estas, o estudo da biologia floral torna-se uma meta básica a ser alcançada (NATION e outros, 1992).

A partir do estudo da biologia floral, pode-se ainda fazer inferências sobre os mecanismos de herança, estimar a expressão e a determinação genética do sexo, estudar os padrões de herança, a fisiologia e os mecanismos envolvidos na auto-incompatibilidade e na macho-esterilidade e, finalmente, determinar a taxa de cruzamentos naturais (FRANKEL; GALUN, 1977), por meio do plantio de genótipos com gene marcador recessivo, intercalados com genótipos apresentando o correspondente alelo dominante. As sementes são colhidas das plantas com características recessivas e a taxa de cruzamento natural é calculada a partir de indivíduos com caracteres recessivos e dominantes nas progênes (ALLARD, 1971).

Paterniani (1974) afirma que a reprodução constitui-se em uma das características fundamentais dos seres vivos. Dentre as suas finalidades, pode-se mencionar a perpetuação dos sistemas vivos, a reprodução de tipos semelhantes aos ascendentes e a produção de variação suficiente para que novos indivíduos possam ser adequadamente aptos a se reproduzir e propagar seus genes.

Anderson (1995) concorda que, além de definir estratégias adequadas de melhoramento, o conhecimento acerca da biologia floral das espécies vegetais permite também, compreender melhor sua história evolutiva e os mecanismos envolvidos (DOBZHANSKY, 1970) e pode ser uma importante ferramenta no estabelecimento de programas de conservação da espécie.

Alguns dos aspectos da biologia floral mais importantes a serem avaliados em um programa de melhoramento são a disponibilidade, a viabilidade, a emergência das plântulas e a conservabilidade dos grãos de pólen;

além da receptividade dos estigmas. Pois, de acordo com Sousa e outros (2005), o pólen é o material básico utilizado nas técnicas de hibridação.

2.7.1 Disponibilidade dos Grãos de Pólen

A disponibilidade é obtida, conforme Almeida e outros (2004), por meio da quantificação dos grãos de pólen obtidos após a deiscência das anteras em diferentes estádios de desenvolvimento floral. Este parâmetro é utilizado para saber o quanto do pólen da espécie está disponível para ser utilizado em programas de melhoramento ou de conservação, visando a determinação do melhor período para as coletas.

2.7.2 Viabilidade dos Grãos de Pólen

A avaliação do desenvolvimento biológico de grãos de pólen é fundamental para os trabalhos de biologia reprodutiva e melhoramento genético, pois permite obter maior sucesso nos cruzamentos, realizados com a finalidade de obter novos híbridos e/ou aumentar a variabilidade (NUNES e outros, 2001).

A palinologia, ciência que estuda os grãos de pólen e esporos possui íntima relação com outros ramos da ciência como por exemplo, a citologia e a genética. Dentre as inúmeras aplicações da palinologia, destaca-se a utilização prática no melhoramento de plantas, notadamente nos estudos de quantidade e viabilidade de pólen e substâncias químicas que estimulam o desenvolvimento do tubo polínico, oferecendo perspectivas para o aumento da produção de várias culturas através da obtenção do índice máximo de fertilização (OLIVEIRA JÚNIOR, 1999).

Para assegurar o sucesso nas hibridações controladas é importante que o pólen a ser utilizado tenha boa viabilidade. Em geral, o pólen colhido de flores

em adequado estágio de desenvolvimento e corretamente preparado não necessita de testes de viabilidade. Entretanto, não são raras as situações em que o pólen a ser usado tenha sido colhido em outra região, ou mesmo, fornecido via intercâmbio com outros países. Por outro lado, devido a não-coincidência de floração, é preciso, muitas vezes, armazenar o pólen colhido em um ano, para ser utilizado no ano seguinte. Neste caso é recomendável testar a viabilidade do mesmo antes de sua utilização (EINHARDT, 2006). Assim, a viabilidade do pólen é um parâmetro de grande importância no estudo de plantas, pois além de evidenciar a potencialidade reprodutora masculina da espécie, contribui em estudos taxonômicos, ecológicos, palinológicos, fornecendo informações básicas para a aplicação prática na conservação genética, bem como na agricultura, para o planejamento de algum tipo de melhoramento ou cultivo (ALEXANDER, 1980; ARROYO, 1981; GUINET, 1989).

Programas de melhoramento envolvendo a produção de sementes por polinização controlada dependem grandemente de um eficiente sistema de manipulação de pólen. Como principal característica deste sistema, pode-se considerar a manutenção da viabilidade do pólen, que deverá sempre estar prontamente disponível quando requerido. O controle das condições ideais de armazenamento torna-se, assim, de vital importância quando se deseja garantir uma adequada viabilidade. O armazenamento de pólen justifica-se para os programas de hibridação, quando há defasagem no florescimento entre as espécies e o pólen apresenta baixa longevidade sob condições naturais (SOUSA; PINTO JR, 1992).

A viabilidade do pólen pode ser determinada através de um grande número de técnicas (FONSECA e outros, 2007; DAFNI, 1992; KEARNS; INOUE, 1993). É considerada uma medida de fertilidade masculina muito empregada no monitoramento de pólen armazenado, de modo a garantir a fecundação, tornando possíveis cruzamentos entre genótipos de potencial

econômico que apresentam floração em épocas distintas (KEARNS; INOUE 1993; MIRANDA, 1993).

Dentre os fatores mais importantes para o sucesso desses programas destacam-se a seleção de genótipos e os cruzamentos. A eficácia dos cruzamentos, tanto entre variedades e cultivares de uma espécie como entre espécies, depende diretamente da viabilidade do pólen (TECHIO e outros, 2006).

2.7.3 Conservação de Grãos de Pólen

A conservação de grãos de pólen é importante para a preservação da variabilidade genética, facilita o intercâmbio de germoplasma e contribui muito na geração de variabilidade obtida por meio de cruzamentos artificiais aumentando a eficiência dos programas de melhoramento. Uma das alternativas para manutenção de linhagens híbridas em uma cultura pode ser mediante o armazenamento do pólen, o que acaba por possibilitar cruzamentos de interesse, sem que haja a necessidade de cultivo alternativo destas linhagens polinizadoras em campo (GOMES e outros, 2003; VARGAS, 2006), onde a reposição periódica se faz necessária em função da queda de sua viabilidade (SOUSA e outros, 2005).

Os fatores mais importantes para que a conservação dos grãos de pólen seja bem sucedida, independentemente da duração do período de armazenamento, depende principalmente de fatores como a temperatura e umidade relativa do ambiente. Com a redução de ambos, a viabilidade dos grãos de pólen tende a aumentar (PICKERT, 1988; GOMES e outros, 2003). Inúmeras técnicas são utilizadas para o armazenamento do grão de pólen, entre os métodos destacam-se a conservação sob baixas temperaturas, o congelamento ou a criopreservação pelo uso de nitrogênio líquido (-196°C) (VARGAS, 2006).

2.7.4 Germinação *in vitro* de Grãos de Pólen

Dentre inúmeras técnicas existentes para se observar a germinação do pólen, destacam-se como as mais utilizadas a coloração e a germinação *in vitro* (DUTRA e outros, 2000). Este método consiste na germinação de uma pequena amostra de pólen em meio apropriado e observar em microscópio, depois de um período pré-estabelecido, o número de grãos de pólen que formaram tubo polínico.

A composição do meio é um fator que afeta a germinação (SALLES e outros, 2006). Diferentes níveis de sacarose e tempos de incubação têm sido testados para verificar a germinação dos grãos de pólen, como em trabalho realizado por Lacerda e outros (1995). Assim como diferentes tipos de açúcares em concentrações variadas têm sido um dos principais componentes do meio de cultura que viabiliza a emissão de tubo polínico, já que proporciona o equilíbrio osmótico entre o pólen e a solução de germinação, além de fornecer energia para auxiliar o processo de desenvolvimento do tubo polínico (SALLES, e outros 2006).

O meio básico usado nos testes de germinação *in vitro* é constituído de açúcar e de ácido bórico (MIRANDA; CLEMENT, 1990), podendo variar ainda a combinação de outros nutrientes (GALLETTA, 1983). A presença de boro no meio estimula o crescimento do tubo polínico, sendo a resposta variável de acordo com a espécie. O boro interage com o açúcar formando um complexo açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares (PFAHLER, 1967). Segundo Luza e Polito (1985), pequenas quantidades de boro adicionado ao meio melhoram a germinação e o crescimento do tubo polínico e diminuem a probabilidade destes se romperem.

2.7.5 Receptividade dos Estigmas

A receptividade dos estigmas é um fator fundamental para se determinar o melhor período de deposição do pólen na flor. Normalmente produz substâncias viscosas que facilitam a aderência do mesmo, garantindo, provavelmente a fertilização, com formação de frutos e sementes. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) indica a receptividade por meio da formação de bolhas de ar, é um método simples e barato (MAUÉS; COUTURIER, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do Estudo

Os estudos foram conduzidos, em área experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-UESB, localizada no Campus de Vitória da Conquista - BA (14° 51' S e 40° 50' W, altitude média de 928 m), bem como, nos Laboratórios de Biotecnologia, Fitopatologia e no Laboratório da Biofábrica da mesma universidade.

Comumente as temperaturas máxima e mínima apresentam médias de 25,3 e 16,1°C, respectivamente, a umidade relativa média é de 70%, com índice pluviométrico anual de 733,9mm, sendo a maior concentração de chuva entre os meses de novembro e abril. A vegetação predominante na região é a Mata-de-Cipó, zona de transição entre a Caatinga e a Mata Atlântica (ALMEIDA, 2007).

3.2 Material Vegetal

As plantas utilizadas no experimento foram oriundas de mudas cultivadas em casa de vegetação (Figura 1), e transplantadas, aproximadamente, com 45 dias para vasos com capacidade de 6 litros de substrato com solo e húmus de minhoca (3:1). Após o transplântio os vasos permaneceram até 60 dias aclimatando-se em casa de vegetação (Figura 2) e levados posteriormente para o campo à plena luz. Foram utilizados 56 indivíduos em campo da cv. Maria Bonita, perfazendo uma área total de 21 m² com espaçamento de 1,0m x 0,5m (Figura 3).



Figura 1 - Mudas em casa de vegetação. Vitória da Conquista-BA, 2008.
Foto: BRITO, A. C. (2008).



Figura 2 - Mudas já transplantadas e com 60 dias após o plantio. Vitória da Conquista-BA, 2008.

Foto: BRITO, A. C. (2008).



Figura 3 - Plantas em vasos utilizados nos experimentos em campo. Vitória da Conquista-BA, 2008.

Foto: BRITO, A. C. (2008).

3.3 Diagnose Floral

A descrição das flores e inflorescências (Figuras 4 e 8) da cultivar Maria Bonita foi baseada no estudo do material vivo conduzido no Laboratório de Biotecnologia da UESB, Campus de Vitória da Conquista-BA. A morfologia externa e interna foi observada com auxílio de estereomicroscópio e a morfologia descrita com auxílio do manual de organografia de Vidal e Vidal (2000).

3.4 Eventos Florais

Para determinação da antese, foram feitas observações diárias da abertura de 50 botões florais de 10 inflorescências escolhidas aleatoriamente e, previamente, marcadas no período de 7:00 até às 18:00h durante 15 dias, não consecutivos, e assim com isso, possam ser correlacionados os estádios de desenvolvimento da flor com a maturação dos órgãos sexuais, bem como a determinação da fase ideal de coleta de grãos de pólen para subsidiar programas de hibridações artificiais em programas de melhoramento genético vegetal.

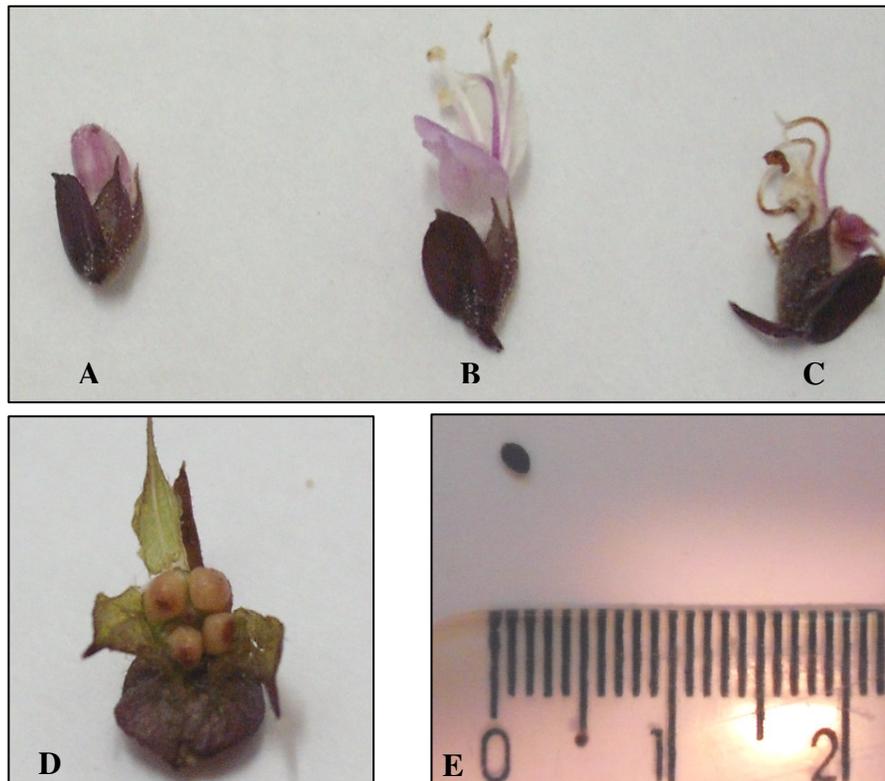


Figura 4 - Fases de desenvolvimento da flor: (A) botão; (B) flor aberta; (C) flor em senescência; (D) frutos; (E) semente. Vitória da Conquista-BA, 2008.

Fotos: BRITO, A. C. (2008).

3.5 Emergência de plântulas

O experimento foi realizado em casa de vegetação da UESB, campus de Vitória da Conquista-BA, no período de 28 de maio a 18 de junho de 2008.

As sementes foram pré-selecionadas com base no comprimento, na uniformidade da cor e no aspecto fitossanitário. Foi utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro tratamentos (substratos) e oito repetições. Os substratos utilizados foram: solo; solo + areia + húmus (1:1:1); vermiculita e o substrato comercial Topstrato®. Todos foram dispostos em bandejas de isopor com 128 células. Cada bandeja constituía 1 bloco que continha os 4 tratamentos. Totalizando 256 sementes por tratamento (Figura 5).

Os tratos culturais foram realizados conforme a necessidade. As avaliações dos testes de emergência foram realizadas por meio de contagens diárias, computando-se o número de plântulas emergidas para a determinação do Índice de Velocidade de Emergência (IVE), que foi calculado segundo a fórmula de Maguire (1962):

$IVE = G1/N1 + G2/N2 + \dots Gn/Nn$ onde,

$G1, G2, Gn = n^\circ$ de plântulas normais computadas nas 1ª, 2ª e última contagem

$N1, N2, Nn = n^\circ$ de dias após a implantação do teste

Os dados de emergência e do IVE foram verificados quanto à homocedasticidade ou homogeneidade das variâncias pelo teste de Cochran e Bartlett; além do teste de normalidade de Lilliefors pelo SAEG 9.1, procedendo-se posteriormente a análise de variância e o teste Tukey.



Figura 5 - Disposição dos substratos nas bandejas para a emergência das plântulas de manjericão. Vitória da Conquista-BA, 2008.

Foto: BRITO, A. C. (2008).

3.6 Disponibilidade dos Grãos de Pólen

Foi obtida por meio da contagem dos grãos de pólen, advindos de uma antera de uma flor colhida aleatoriamente. Esta antera foi macerada sobre uma lâmina e seus grãos corados com carmim acético 1%, cobertos com uma lamínula e levados para observação e contagem em microscópio óptico utilizando objetivas de 10x e 40x. Este experimento foi conduzido nos dias 27, 28 e 29 de maio de 2008, totalizando 3 dias de observação para que possa ser estimada a disponibilidade polínica até a pós-antese. Os dados foram analisados por meio de análise de regressão.

3.7 Viabilidade dos Grãos de Pólen

Este parâmetro foi analisado pela observação grãos de pólen corados com carmim acético, segundo a técnica de Linsley e Cazier (1963), em diferentes estádios de desenvolvimento floral.

A viabilidade polínica é considerada uma medida de fertilidade masculina, determinada através de várias metodologias, entre elas a técnica de coloração. Esta é bastante empregada no monitoramento de pólen *in vitro* e *in vivo* e está baseada na reação de coloração de grãos de pólen amiláceos indicando pólen maduros com protoplasma vivo (OLIVEIRA, M. e outros, 2001; GUERRA; SOUZA, 2002).

Para esta avaliação os grãos de pólen foram retirados das anteras provenientes de flores coletadas aleatoriamente em diferentes estádios de desenvolvimento floral, compreendidos nos horários de 7:00 às 18:00 h em intervalos de uma hora, nos dias 27, 28 e 29 de maio de 2008.

O pólen foi disposto sobre lâmina de vidro e corado com carmim acético na concentração de 1%, coberto com lamínula e observado sob microscópio óptico, utilizando-se as objetivas de 10x e 40x. As lâminas foram fotografadas com câmera digital de 7.1 mega pixels. Os grãos de pólen foram classificados como normais/viáveis, quando apresentaram coloração avermelhada ou anormais/inviáveis, quando apresentaram coloração amarronzada, baseado na reação dos mesmos com a solução do corante utilizado. A temperatura média nos 3 dias de avaliação variou entre 18 e 25°C.

Os efeitos da viabilidade nos diferentes estádios de desenvolvimento floral foram demonstrados por análise de regressão.

3.8 Germinação *in vitro* dos Grãos de Pólen

O pólen foi coletado de flores escolhidas aleatoriamente e em estágio de balão ou de flores recém abertas. Foram testados os seguintes meios de cultura para germinação *in vitro* do pólen:

- 1) 2,5g sacarose + 0,5g ágar + 50ml água destilada
- 2) 5,0g sacarose + 0,5g ágar + 50ml água destilada (testemunha);

- 3) 10g sacarose + 0,5g ágar + 50ml água destilada
- 4) 15g sacarose + 0,5g ágar + 50ml água destilada
- 5) 5,0g sacarose + 0,5g ágar + 50ml água destilada + 5mg de H₃BO₃
- 6) 10g sacarose + 0,5g ágar + 50ml água destilada + 5mg de H₃BO₃

Os elementos constituintes dos meios de cultura foram dissolvidos em água destilada e aquecidos em forno de microondas até a completa dissolução do ágar. Os meios de cultura ainda quentes foram distribuídos em placas de Petri pequenas (diâmetro de 6 cm). Após esfriar, o pólen foi aspergido sobre o meio e estas placas foram acomodadas em câmara úmida, feita com placas de Petri maiores (diâmetro de 12cm) e com papel filtro e umedecida com água destilada. As placas foram deixadas à temperatura ambiente, 25°C±1C° (Figura 6).

Na avaliação dos resultados, cada placa representou uma repetição. A formação do tubo polínico foi verificada 24 h após instalação do experimento, considerando-se germinados os que apresentavam o comprimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen.

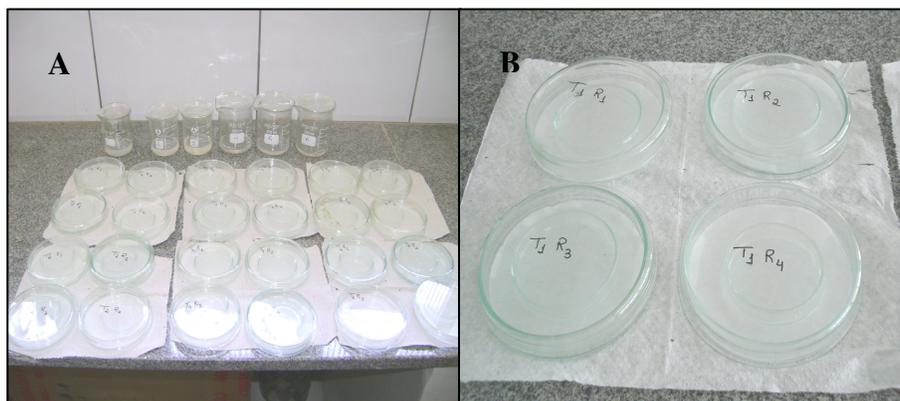


Figura 6 - Placas de Petri com meios de cultura para germinação *in vitro* dos grãos de pólen. Esquema geral do experimento (A) e de uma parcela (B). Vitória da Conquista-BA, 2008.

Foto: BRITO, A. C. (2008).

O experimento ocorreu no mês de outubro de 2008 e compreendeu 6 tratamentos e 4 repetições em delineamento inteiramente casualizado.

O número de tubos polínicos formados foram verificados quanto à homocedasticidade ou homogeneidade das variâncias pelo teste de Cochran e Bartlett; além do teste de normalidade de Lilliefors pelo SAEG 9.1, procedendo posteriormente a análise de variância e o teste Tukey.

3.9 Conservabilidade dos Grãos de Pólen

Foram utilizados 60 tubos eppendorf contendo 2 anteras por tubo. Este foi preparado previamente com uma camada de sílica gel, para reter a umidade, e coberto com um pouco de algodão para sustentar as anteras (Figura 7). Dos tubos, 30 deles ficaram em geladeira à temperatura de $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e os outros 30 no congelador com temperatura média de $-10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. De 30 em 30 dias foram montadas lâminas com macerados das anteras contendo os grãos de pólen, que foram corados com carmim acético a 1% e observados sob microscópio óptico com objetivas de aumento de 10X e 40X. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 3x2 (tempo de armazenamento x temperatura) com 10 repetições. Os dados foram analisados pelo SISVAR 4.0 (FERREIRA, 2000).



Figura 7 - Tubos eppendorf contendo as anteras para serem armazenadas em geladeira e em congelador. Vitória da Conquista-BA, 2008.

Foto: BRITO, A. C. (2008).

3.10 Receptividade dos Estigmas

A receptividade foi verificada pelo seu aspecto viscoso e umectante (ALMEIDA, 1986) e testada utilizando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% (KEARNS; INOUE, 1993). As flores foram coletadas em diferentes estádios de desenvolvimento floral, três estigmas por hora, no período de 7:00 às 18:00 h, nos dias 27, 28 e 29 de maio de 2008. Sobre os estigmas foi gotejado o peróxido de hidrogênio a 3% e os que apresentaram formação de bolhas foram considerados receptivos (Figura 15). Os efeitos da receptividade nos diferentes estádios de desenvolvimento floral ao longo do dia foram demonstrados por análise de regressão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Diagnose Floral

Nas condições, época e local dos estudos *O. basilicum* L., cv Maria Bonita, apresentou florescimento o ano todo, iniciando sua floração em média com 65 dias, contrastando com resultados obtidos por Blank e outros (2007) que obteve ciclo médio de 80 dias. Esta floração mais precoce pode ser atribuída devido ao experimento ter sido conduzido em vasos, o que provavelmente diminuiu o ciclo da planta pela restrição de espaço ocasionado pelos mesmos, e assim a obtenção de flores em tempo menor. Este pode ser considerado um aspecto positivo dada as condições de temperaturas mais amenas, como as registradas no município de Vitória da Conquista-BA, onde o experimento foi realizado.

A espécie é herbácea, de aroma forte e doce. Possui inflorescências terminais, plurifloras simples do tipo indefinida ou racimosa (Figura 8). As flores estão situadas em pedicelos, saindo de diversos níveis no eixo primário e atingindo diferentes alturas, com 6 flores por eixo, e em média de 46 flores por inflorescência. Pré-floração do tipo valvar, pedunculadas e pediceladas, diperiantadas, heteroclamídeas, hipóginas e hermafroditas. A duração da flor é em média de 24 h, período no qual a flor vai gradativamente perdendo a cor, bem como as anteras ficam secas e marrons, até cair.



Figura 8 - Inflorescência da cv. Maria Bonita com flores em diferentes estádios de desenvolvimento. Vitória da Conquista-BA, 2008.

Foto: BRITO, A. C. (2008).

O cálice é de coloração roxa, persistente, gamossépalo, pentâmero e zigomorfo, A corola é rósea, gamopétala, pentâmera, zigomorfa e caduca, e assim como o cálice, apresenta tricomas em toda sua extensão.

O androceu é didínamo, dialistêmone, com quatro estames simples e livres. As anteras são dorsifixas, diteca com deiscência longitudinal; o filete e antera são brancos. O gineceu é gamocarpelar e bicarpelar, com estigma bífido de cor branca, estilete ginobásico e de coloração rósea (Figura 9). O ovário é plurilocular e súpero. Os frutos são tetraquênios, apresentando quatro sementes, uma por fruto, pequenas e pretas.



Figura 9 - Flor da cv. Maria Bonita evidenciando o estigma (A) e as anteras (B). Vitória da Conquista-BA, 2008.

Foto: BRITO, A. C. (2008).

4.2 Eventos Florais

A atividade floral compreendeu os estádios de pré-antese, quando os botões apresentavam-se fechados e intumescidos, período denominado também como estágio de balão; a antese, na qual os botões florais abrem-se assincronicamente deixando totalmente expostos o estigma e os estames; e pós-antese, quando ocorre a distensão das pétalas e sépalas totalmente.

As flores não se abrem ao mesmo tempo nas inflorescências, sendo possível encontrar flores em diferentes estádios de desenvolvimento na mesma planta, durante um dia. De acordo com Siqueira (2008) em trabalho realizado com *Mangifera indica* L., a abertura assincrônica das flores, associada à produção constante de néctar em pequenas quantidades é vantajosa porque assim

mantém a oferta deste recurso de forma contínua, garantindo a visitação dos insetos ao longo do dia, bem como possibilitando que os mesmos visitem maior número de flores, garantindo, com isso, a transferência de pólen entre flores e entre plantas, o que favorece a polinização cruzada e, conseqüentemente, a produção de híbridos.

Na pré-antese, embora a flor permaneça fechada, ocorre liberação de grãos de pólen sobre o estigma, que já se encontra visualmente viscoso. Ao final deste estágio as bordas laterais do labelo do cálice dobram sobre si mesmas, formando a abertura da flor.

A antese ocorre com maior freqüência entre 10:00 e 11:00h, com anteras já deiscentes e grãos de pólen disponíveis, os quais podem ser conduzidos por eventuais polinizadores que iniciam e intensificam suas atividades neste período, principalmente de abelhas que buscam o néctar e o pólen como recursos alimentares, além da emissão agradável de odor neste período, que favorece a freqüência das visitas. Conforme Barth (1985), o odor emitido pelas flores provavelmente contribui para aumentar a transferência de pólen entre os indivíduos, uma vez que o olfato é um dos sentidos mais importantes para os insetos.

Na pós-antese ocorre a polinização, com provável formação de tubo polínico e posterior formação de frutos e sementes. A longevidade floral (período entre a antese e a senescência da corola) na cv. Maria Bonita foi de aproximadamente 24h. Esse período é um atributo variável entre as angiospermas e que pode assegurar o sucesso da polinização (PRIMACK, 1985).

4.3 Emergência de Plântulas

As sementes começaram a emergir com oito dias após a instalação do experimento, sendo as avaliações feitas aos vinte dias após a semeadura e estabilização.

Nos quatro substratos ocorreu emergência. Apresentaram médias em ordem decrescente, respectivamente: a vermiculita (35,94); solo (35,59); solo+areia+húmus (33,97) e o Topstrato® (32,42). Tanto para a emergência quanto para o índice de velocidade de emergência (IVE) não foram observadas diferenças estatísticas entre as médias (Tabela 1).

Tabela 1 - Emergência (%) e índice de velocidade de emergência (IVE) (%), de manjeriço, cv. Maria Bonita, submetidas a diferentes substratos. Vitória da Conquista-BA.

Parâmetros	S	S+A+H	V	T	Média	CV (%)
Emergência	35,59 a	33,97 a	35,94 a	32,42 a	33,98	42,12
IVE	1,024 a	0,913 a	1,156 a	1,042 a	1,034	47,65

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferiram estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. S (solo); S+A+H (solo+ areia+húmus); V(vermiculita); T (Topstrato®).

Segundo Ramos e outros (2002), um bom substrato é aquele que objetiva proporcionar condições adequadas à germinação e emergência. De acordo com os resultados, os quatro substratos utilizados proporcionaram condições para germinação e desenvolvimento inicial da plântula (Figura 10), embora a emergência tenha alcançado baixos valores. Este fato pode ser atribuído, possivelmente, a uma característica ainda não melhorada para esta cultivar e que torna seu estudo em outras condições adequado para outras observações. Aparentemente o tempo nas avaliações foi suficiente, mas é interessante que o teste seja conduzido em um maior período para analisar se

este fator pode contribuir com uma maior porcentagem de emergência. Entretanto, Blank e outros (2004) em trabalho realizado e caracterizando acessos de manjeriço obteve emergência aos 7 dias da sementeira e já transplantou para o campo as mudas com 30 dias. Resultados bem próximos aos obtidos neste trabalho, o qual obteve-se emergência no oitavo dia e estabilização aos vinte dias.

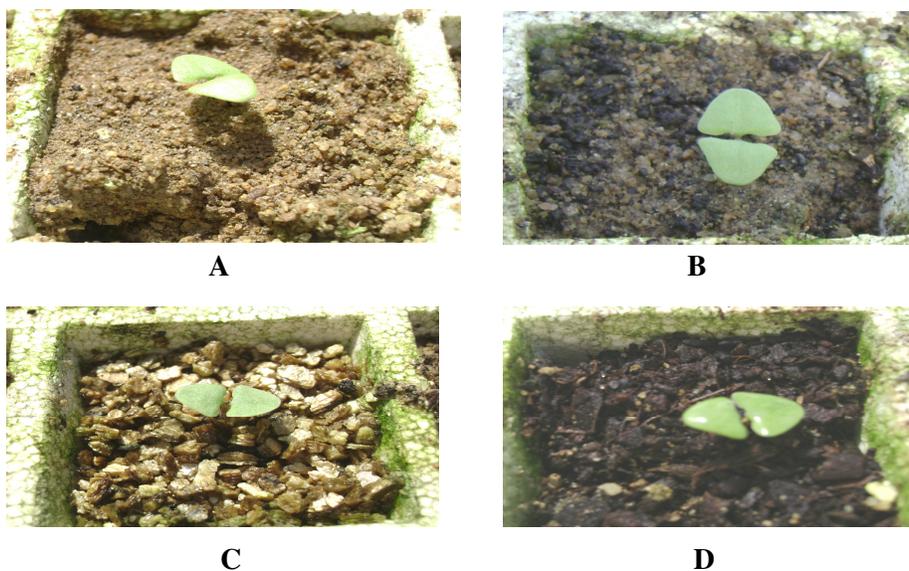


Figura 10 - Plântulas em desenvolvimento nos diferentes substratos utilizados. A (solo); B (solo+areia+húmus); C (vermiculita); D (Topstrato®). Vitória da Conquista-BA, 2008.

Foto: BRITO, A. C. (2008).

4.4 Disponibilidade dos Grãos de Pólen

A disponibilidade dos grãos de pólen foi verificada após a deiscência das anteras, o que ocorreu a partir da antese (10:00 h). Nos dias avaliados houve um declínio ao longo do dia, principalmente nas horas finais de avaliação

(Figura 11), concordando com trabalho realizado por Almeida (2007) em *O. sanctum* L.

A escassez do pólen no decorrer da análise pode ser, provavelmente, considerada como um aspecto positivo, pois devido a eficácia de algum agente polinizador no transporte do pólen. A presença de abelhas era comum ao longo de todo o dia e mais intensamente a partir das 10 h. Harder e Barret (1996) afirmam que a atividade dos visitantes florais afeta diretamente o fluxo de pólen; permitindo a ocorrência tanto da autopolinização, quanto da fecundação cruzada, o que é uma característica de interesse na formação de híbridos.

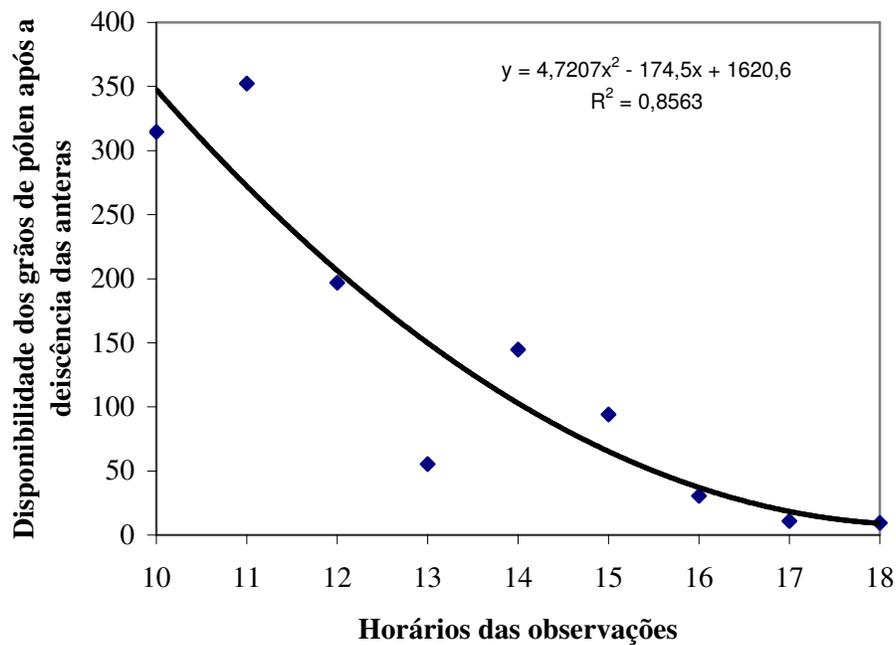


Figura 11 - Estimativa do número de grãos de pólen disponíveis ao longo do dia, observados em 27, 28 e 29 de maio de 2008. Vitória da Conquista-BA.

4.5 Viabilidade dos Grãos de Pólen

Os grãos de pólen viáveis são facilmente percebidos devido à coloração exibida, com a utilização do corante carmim acético. De modo que foram considerados viáveis os grãos que apresentaram cor vermelha e, não-viáveis os que apresentaram cor amarronzada (RIGAMOTO; TYAGI, 2002) (Figura 12). O pólen viável apresentou-se avermelhado e com suas membranas íntegras, os inviáveis de coloração marrom e dos quais muitos se rompiam.

Durante os três dias de avaliação a viabilidade mostrou-se elevada ao longo do dia (Figura 13), com valores superiores a 80%. Resultados semelhantes foram obtidos por Gonçalves e outros (2008) em *Ocimum gratissimum* L. e por Almeida (2004) em *Ocimum officinalis* L. De acordo com Souza (2002) e Domingues e outros (1999) valores acima de 70% são considerados como de alta viabilidade, de 31 a 69% como média e até 30% baixa.

Para a cv. Maria Bonita, assim como para outras espécies, essa alta viabilidade dos grãos de pólen é uma característica altamente desejada pelos melhoristas para iniciarem um programa de melhoramento genético, nas quais outras características são buscadas para aprimorar ou lançar novas cultivares promissoras.



Figura 12 - Grãos de pólen viáveis (A) e não-viáveis (B) após corados com carmim acético. Vitória da Conquista-BA, 2008.

Foto: BRITO, A. C. (2008).

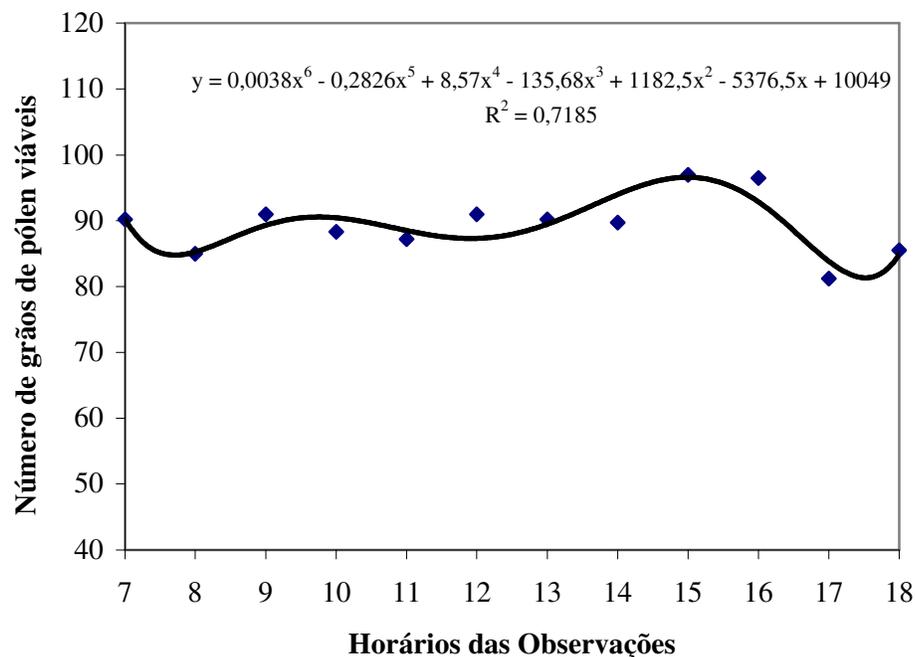


Figura 13 - Estimativa do número de grãos de pólen viáveis ao longo de 12 h de avaliação, observados em 27, 28 e 29 de maio de 2008. Vitória da Conquista-BA.

4.6 Germinação *in vitro* dos Grãos de Pólen

A germinação dos grãos de pólen (Figura 14) entre os diferentes meios utilizados foi baixa e não houve diferenças estatísticas entre eles. As médias variaram entre 1,25% e 2,5% (Tabela 2).

Scorza e Sherman (1995) consideram que um bom pólen deve apresentar 50 a 80% de grãos germinados com tubos bem desenvolvidos e que ainda que o pólen pareça fraco, a presença de alguns tubos polínicos vigorosos indicam que o mesmo ainda é suficientemente bom para assegurar, pelo menos, uma moderada frutificação efetiva, apesar da baixa porcentagem de germinação.

A germinação *in vitro* simula condições naturais para o crescimento e desenvolvimento do tubo polínico, assim ajustes são necessários para se atingir uma taxa elevada. Um aumento da germinação pode ser conseguido com tentativas em alterar as concentrações de sacarose ou outros meios de cultura, ou ainda aumentando o tempo de incubação, pois é necessário que o pólen mantenha elevados níveis de germinabilidade.

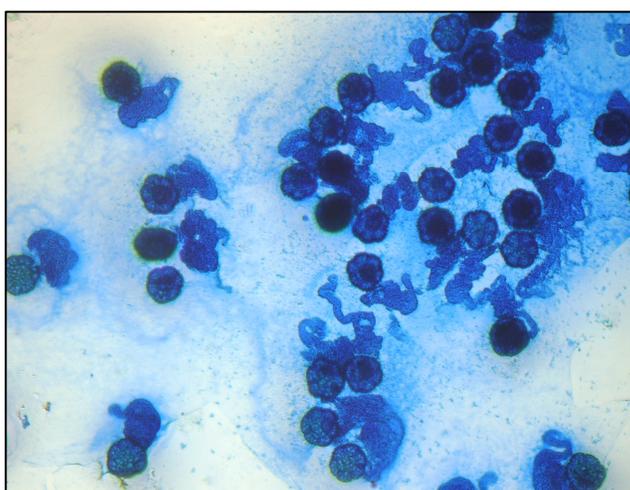


Figura 14 - Grãos de pólen com tubos polínicos desenvolvidos após 24 h de incubação. Vitória da Conquista-BA, 2008.

Foto: BRITO, A. C. (2008).

Tabela 2 - Médias de grãos de pólen germinados em diferentes meios de cultura. Vitória da Conquista-BA.

MEIOS DE CULTURA	MÉDIAS
2,5g sacarose	1,5 a
Testemunha	2,5 a
10g sacarose	1,75 a
15g sacarose	1,25 a
5g sacarose+H3BO3	2,5 a
10g sacarose+H3BO3	1,75 a
CV(%)	121,39
Média geral	1,87

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.7 Conservabilidade dos Grãos de Pólen

Foi observada nesta etapa do experimento que os grãos de pólen armazenados conservaram-se viáveis ao longo dos 90 dias de análise. Médias acima de 79% foram alcançadas tanto para o pólen conservado em geladeira, quanto ao conservado em congelador. (Tabela 3). No ambiente geladeira o pólen avaliado aos 90 dias diminuiu sua viabilidade significativamente quando comparado às demais épocas de avaliação. Já no ambiente freezer as maiores médias foram alcançadas aos 60 dias (91,60%), entretanto, não diferiu estatisticamente em relação as outras épocas de avaliação.

Com relação ao tempo de armazenamento, aos 90 dias o ambiente freezer proporcionou uma maior viabilidade do pólen. Com isso observou-se que, de acordo com o período de armazenamento, quanto mais baixa a temperatura utilizada maior a chance de se obter altos níveis de viabilidade. Esta é uma importante ferramenta em programas de melhoramento em que nem sempre quando se deseja utilizar o pólen ele está disponível para o uso, assim o armazenamento torna-se uma alternativa para que se tenha sempre que necessário, um pólen disponível e com alta viabilidade.

Resultados semelhantes alcançados por Pio e outros (2007) com o pólen de laranjas doce revelaram que os grãos de pólen armazenados em congelador apresentaram maior porcentagem de germinação que o conservado em geladeira. O emprego de baixas temperaturas normalmente encontra-se ligado à redução do metabolismo do pólen, o que propicia maior longevidade. Oliveira e outros (2001) também enfatizaram a maior longevidade do pólen congelado em açazeiro.

O armazenamento de grãos de pólen é importante para a preservação de germoplasma bem como para o auxílio de pesquisas que utilizem este material biológico em estoques para promover intercâmbio de germoplasma e

potencializar programas de melhoramento (GOMES e outros, 2003), onde a reposição periódica se faz necessária em função da queda de sua viabilidade (SOUZA e outros, 2002), sendo considerado um das principais alternativas para conservação de genótipos importantes em cruzamentos, pois possibilitaria a realização dos mesmos sem a necessidade do cultivo alternado dessas linhagens polinizadoras em campo.

Tabela 3 - Viabilidade de pólen armazenados e analisados aos 30, 60 e 90 dias em diferentes ambientes. Vitória da Conquista-BA.

ARMAZENAMENTO	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS
Geladeira	89,80 aA	88,30 aA	79,90 bB
Freezer	88,50 aA	91,60 aA	89,90 aA
Média	88,00		
CV(%)	5,92		

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.8 Receptividade dos Estigmas

A receptividade dos estigmas foi verificada durante todo o período avaliado, desde a pré-antese até a pós-antese. Flores com longos períodos de receptividade aumentam a probabilidade de ocorrência da polinização (RATHCKE; LACEY, 1985). E este dado é importante para o melhorista, pois permite a ele fazer os cruzamentos no período adequado.

Com o uso do peróxido de hidrogênio a 3%, houve o borbulhamento na cavidade estigmática (Figura 15), indicando a atividade da peroxidase, tanto em flores em estágio de balão (pré-antese), quanto em flores completamente abertas. A presença dessa enzima indica a receptividade do estigma (KEARNS; INOUE 1993).



Figura 15 - Estigma receptivo evidenciando a formação de bolhas. Vitória da Conquista-BA, 2008.

Foto: BRITO, A. C. (2008).

Foi observado que, geralmente, em flores a partir da antese ocorreu um maior número de estigmas receptivos (Figura 16). Resultado semelhante foi obtido por Manju e Rawat (2006), quando observaram que os estigmas de flores de lima variedade Kagzi estavam mais receptivos na antese, ou seja, no momento da abertura das anteras e liberação dos grãos de pólen.

Para o sucesso da fertilização é desejável que o pólen seja transferido para o estigma receptivo de uma outra flor. Em muitos casos, a fertilização também pode ocorrer quando o grão de pólen é depositado antes do período receptivo dos estigmas, desde que permaneça viável em tempo suficiente para poder germinar assim que a flor se torne receptiva (RAMOS e outros, 2008).

Por apresentar receptividade antes da deiscência das anteras, a cultivar Maria Bonita é caracterizada como protogínica, concordando com resultados obtidos por Almeida (2007) em *Ocimum sanctum* e Almeida (2004) em *Ocimum officinalis*.

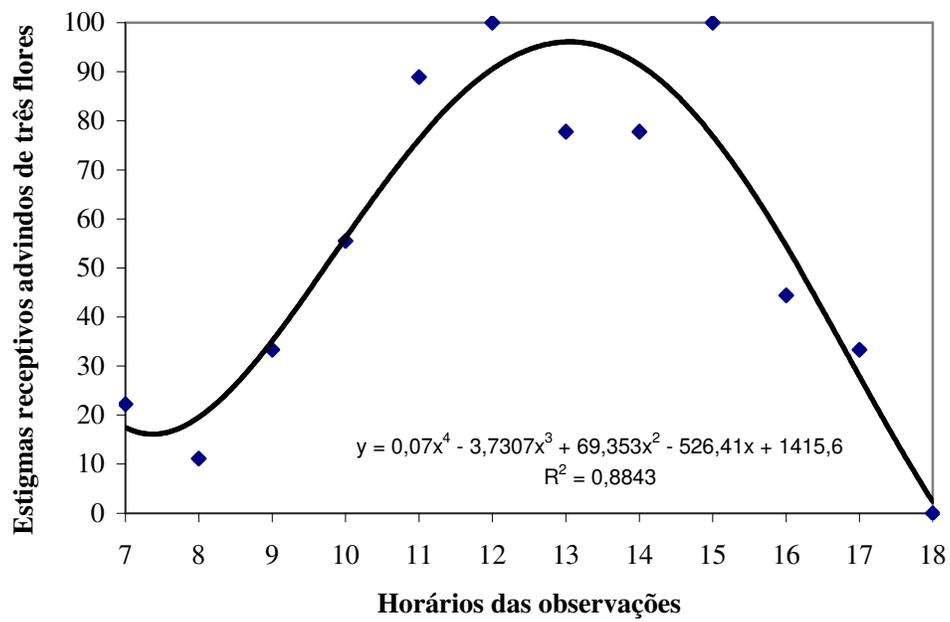


Figura 16 - Estimativa do número de estigmas receptivos ao longo de 12 h de avaliação observados em 27, 28 e 29 de maio. Vitória da Conquista-BA.

5 CONCLUSÕES

De acordo com o local e épocas das avaliações conclui-se que:

- No tempo avaliado não observa-se diferenças na emergência das plântulas nos diferentes substratos testados;
- Há redução na disponibilidade do pólen ao longo do dia;
- A viabilidade do pólen é elevada ao longo do dia;
- Não há diferenças quanto aos meios de cultura testados na germinação *in vitro* dos grãos de pólen;
- O pólen mantém sua viabilidade durante o período de armazenamento;
- Os estigmas estão receptivos desde a pré-antese, com maior frequência a partir da antese.

REFERÊNCIAS

- ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS. **Medicamentos a partir de Plantas Medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: 1998. 132 p.
- AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. 350 p.
- AKERELE, O. Summary of who guidelines for the assessment of herbal medicines. **HerbalGram**, v.28, p.13-19, 1993.
- ALBUQUERQUE, U. P; ANDRADE, L. H. C. Etnobotánica del género *Ocimum* L. (Lamiaceae) en las comunidades afrobrasileñas. **Anales del Jardim Botânico de Madrid**, v.56, n.1, p.107-118, 1998.
- ALEXANDER, M.P.A. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacterium. **Stain Tecnology**, v.1, n.5, p.13-8, 1980.
- ALLARD, R W. Sistemas reprodutivos e métodos de melhoramento de plantas. In: _____. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. São Paulo. Edgard Blucher, 1971. Cap. 4, p. 25-35.
- ALMEIDA, E. C. Biologia Floral e mecanismos de reprodução em *Crotaria mucrota*, Desv. **Ceres**, v.33, n. 190, p. 528-540, 1986.
- ALMEIDA, O.S.; SILVA, A.H.B.; SILVA, A.B.; SILVA, A.B.; AMARAL, C.L.F. Estudo da biologia floral e mecanismos reprodutivos do alfavacão (*Ocimum officinalis* L.) visando o melhoramento genético. **Acta Scientiarum Biological Sciences**. Maringá, v. 26, n.3, p. 343-348, 2004.
- ALMEIDA, O.S. **Biologia floral. Tendências reprodutivas e efeito alelopático da tulase** (*Ocimum sanctum* L.). 2007. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração em fitotecnia), UESB, Vitória da Conquista, BA.
- BARTH, F.G. **Insects and flowers: the biology of a partnership**. Princeton University Press, Princeton, 1985.
- ANDERSON, G. J. Systematics and reproductive biology. In: _____. HOCH, P.C.; STEPHENSON, A.G. (Eds.). Experimental and molecular approaches to

plant biosystematics. **Monographs in Systematics. Missouri Botanical Garden** v.53, p. 263-272, 1995.

ARROYO, M.T.K. Breeding systems and pollination biology in leguminosae. In:_____. POLHILL, M.; RAVEN, P.H. (Eds.). **Advances in legumes systematics**, Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p.723-69.

BAIS, H.P.; WALKER, T.S.; SCHWEIZER, H.P.; VIVANCO, J.M. Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. **Plant Physiology and Biochemistry.**, v.40, n. 100, p.983-995, 2002.

BHATNAGAR, M.; KAPUR, K. K.; JALEES, S.; SHARMA, S. K. Laboratory evaluation of insecticidal properties of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum sanctum* L. Plants, essential oils and their major constituents against vector maosquito species. **Journal of Entomological Research**, v.17, p. 21-26, 1993.

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

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

_____. Influência da adubação orgânica e mineral no cultivo de manjerição cv. Genovese. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, n. 2, p. 175-180, maio/ago. 2005.

_____. Maria Bonita: cultivar de manjerição tipo linalol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.12, p.1811-1813, dez. 2007.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. p. 300.

_____.; MILACH, S.K. O Melhoramento de plantas na virada do milênio. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.7, p. 68-72, jan./fev. 1999.

BRADY, L.R.; ROBBERS, J.E. **Pharmacognosy**. 8. ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1981. p.480.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 17** de 24 de fevereiro de 2000.

BUENO, L.C.S.; MENDES, A.N.G.; CARVALHO, S.P. **Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos**. Lavras: UFLA, 2001. p.282.

CARVALHO FILHO, J.L.S.; *et.al.* Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.24-30, 2006.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. Germinação de sementes. In:_____. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. p.128-166.

CERONI, M. **El Cultivo Moderno y Rentable de las Plantas Aromáticas y Medicinales**. Ed. De Vecchi, 1989.

CHAO, S. C.; YOUNG, D. G. Screening for inhibitory activity of essential oils ou selected bacteria, fungi and viruses. **Journal Essentials Oil Research**, [S.l.], v. 12, p. 630–649, 2000.

CORREA JR., C., MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Curitiba: EMATER-PR, 1991.

COSENDEY, M.A.E.; *et al.* Assistência farmacêutica na atenção básica de saúde: a experiência de três estados brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p.171-182, 2000.

COSTA, L.C.B.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V. Comprimento da estaca e tipo de substrato na propagação vegetativa de atoveran. **Ciência Rural**, v.37, n.4, jul./ago. 2007.

CRAVEIRO, A.A. *et al.* **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981. 210 p.

DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach** (the practical approach series). New York, Oxford: University press. 1992. 250 p.

DI CESARE, L. F.; FORNI, E.; VISCARDI, D.; NANI, R. C. J. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.3575, 2003.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A.. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Unesp, 2002.

DOBZHANSKY, T.G. **Genetics of the Evolutionary Process**. New York, Columbia University Press, 1970.

DOMINGUES, E.T; TULMANN NETO, A.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Viabilidade do pólen em cultivares de laranja doce. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n.2, p.265-272,1999.

DOMÍNGUEZ-VÁZQUEZ, G.; BERLIN, B.; RAMÍREZ, A. E. C.; ESTRADA-LUGO, E.J.I. Revisión de la diversidad y patrones de distribución de Labiatae en Chiapas **Anales del Instituto de Biología**, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica v.73, n.1, p. 39-80. 2002.

DUTRA, G.A.P.; SOUZA, M.M.; RODRIGUES, R.; SUDE, C.P.; PEREIRA, T.N.S. Viabilidade em grãos de pólen frescos e armazenados em acessos de pimenta. **Horticultura Brasileira**, v.18, p. 229-230, 2000.

EINHARDT, P.M.; CORREA, E.R.; RASEIRA, M.C.B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 28, n. 1, p. 5-7, 2006.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000. UFSCar, São Carlos, SP, Julho de 2000. p.255-258.

FERNANDES, P.C.; FACANALI, R.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; MARQUES, M.O.M. Cultivo de manjeirão em hidroponia e em diferentes substratos sob ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.260-264, abr./jun. 2004.

FONSECA, T.C.; CARMELLO, A.C. de C.; MORETI, A.C.C.C.; ALMEIDA, J.E.; OTSUK, I.P. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 405-407, jul. 2007.

FRANÇA, I.S.X.; SOUZA, J.A.; BAPTISTA, R.S.; BRITTO, V.R.S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 61, n. 2, abr. 2008.

FRANKEL, R.; GALUN, E. **Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding**. Berlin, Springer-verlang, hiedelberg, 1977, p.281.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.2, p. 178-82, 2005.

FUZÉR, L.; SOUZA, I. IBAMA dá início a núcleo de plantas medicinais. **Bionotícias**, Rio de Janeiro, n. 57, p.6-7, jan./fev. 2003.

GALLETTA, G.J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (Ed.). **Methods in fruit breeding**. Indiana: Purdue University Press, 1983. p. 23-47.

GOMES, P.R.; RASEIRA, M. DO C.B.; BAUDET, L.L.; PESKE, S.T. Armazenamento do grão de pólen de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n.1, p. 14-17, 2003.

GOVIN, E. S.; LÓPEZ, I.M.L.; HERNÁNDEZ, F.L; FERRADA, R.C.A. Estúdio farmacognóstico de *Ocimum basilicum* L. (albahaca blanca). **Revista Cubana de Farmácia**, v. 34, n. 3, p.187-195, 2000.

GRAYNER, R. J. *et al.* Infraespecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. **Phytochemistry**, v.4, p. 10033-1039, 1996.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. de. **Como observar cromossomos** - um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. p.131.

GUINET, P.H. **Advances in legume biology**: structure evolution, and biology of pollen in Leguminosae. St. Louis: Missouri Botanical Garden, 1989. 842p.

GUPTA, R. Basil (*Ocimum spp.*) G-5 Gene Banks for Medicinal and Aromatic Plants. **Newsletter**, v.1, n.5/6, p. 1-3, 1994.

HARDER, L.D.; BARRET, S.C.H. Pollen dispersal and mating patterns in animal-pollinated plants. In:_____. **Floral biology, studies on floral evolution in animal-pollinated plants**. New York: Chapman & Hall, 1996, p. 140-190. (eds D.G. Lloyd & S.C.H. Barret).

KAMADA, T. *et al.* Plasticidade fenotípica do óleo essencial em acessos de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.1, p.13-22, 1999.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologists**. University Press of Colorado, Niwot, 1993. p.579.

KÉITA, M. S. *et al.* Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) [Coleoptera: Bruchidae]. **Journal of Stored Products Research**, v. 37, p. 339-349, 2001.

KRUPPA, P.C.; RUSSOMANNO, O.M.R. Ocorrência de fungos em sementes de plantas medicinais, aromáticas e condimentares da família Lamiaceae. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 1, p. 72-75, 2008.

LABRA, M. *et al.* DNA genotyping, morphological and essential oil characterisation of *Ocimum basilicum* L. cultivars. **Plant Science**, v. 167, p.725-731, 2004.

LACERDA, C.A.; OLIVEIRA, L.M.; ALMEIDA, E.C.; LIMA, J.O.G. Meio de cultura e condições ideais para germinar o pólen de *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Santa Cruz Kada. **Ceres**, v. 42, n. 241, p. 308-318, 1995.

LEAL, T.C.B.; **Produção do óleo essencial de capim cidreira (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) em função de fatores endógenos e exógenos**. 1998. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro.

LIMA, A. L.; DORNELLES, A. L. C. Germinação de três espécies de *Annona* em diferentes substratos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18, 2002, Belém. **Resumos...** Belém: SBF/Embrapa Amazônia Oriental, 2002. CD-ROM.

LINSLEY, E. C.; CAZIER, M. A. Further observation on bees which take pollen from plants of genus *Solanum*. **Pan Pacific Entomologist**, v.39, n.1, p. 1-18, 1963.

LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v. 1, n.1, p. 19-27. 2006.

LOUGHRIN, J.H.; KASPERBAUER, M.J.L. Light reflected from colored mulches affects aroma and phenolic content of sweet basil (*Ocimum basilicum*

L.) leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.49, n.3, p.1331-1335, 2001.

LOURENZANI, A.E.B.S.; LOURENZANI, W.L.; BATALHA, M.O. Barreiras e Oportunidades na Comercialização de Plantas Medicinais Provenientes da Agricultura Familiar. **Informações Econômicas**, SP, v.34, n.3, mar. 2004.

LUZA, J.G.; POLITO, V.S. *In vitro* germination and storage of english walnut pollen. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 27, p. 303-316, 1985.

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

MANJU I; RAWAT, S.S. Studies on floral biology of Kagzi lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) under valley conditions of Garhwal Himalaya. **Adv. Plant Sci.** v.19, p.11-17, 2006.

MAROTTI, M., PICCAGLIA, R., GIOVANELLI, E. Differences in essential oil composition of Basil (*Ocimum basilicum* L.) italian cultivars related to morfological characteristics. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.44, n.12, p.3926- 3929, 1996.

MARTINS, E.R., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 1994. 220 p.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas**. Fortaleza: Ed. da Universidade Federal do Ceará, 1998.

MAUÉS, M.M.; COUTURIER, G. Biologia floral e fenologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) no Estado Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 4, p. 441-448, 2002.

MAZZA, M.C.; RODIGHIERI, H.R.; CONTO, A.; MAZZA, C. A. S.; STEENBOCK, W.; DOSSA, D. A relevância das plantas medicinais no desenvolvimento de comunidades rurais no município de Guarapuava, Paraná. In: Encontro da Sociedade Brasileira de Sistemas de Produção, 2., 1998. **Anais...** Florianópolis, SC, 1998.

MICHILIS, E. Diagnóstico situacional dos serviços de fitoterapia no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.14 (Supl. 1): 16-19, 2004.

MIELE, M.; DONDERO, R.; CIARALLO, G.; MAZZEI, M. Methyleugenol in *Ocimum basilicum* L. Cv. Genovese Gigante. **Journal of Agricultural Food Chemistry.**, v.49, p.517-521, 2001.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, G. O. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe, 1999.

MIRANDA, I. P. A. A importância da conservação *in vitro* do pólen da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) Arecaceae para o melhoramento genético. p. 361-171. In: _____. FERREIRA, E. J. G; SANTOS, G. M.; LEÃO, E. L. M.; OLIVEIRA, L. A. (Eds.). **Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia**. v. 2, SCT/INPA, Manaus, 1993.

MIRANDA, P.A.; CLEMENT, C.R. Germination and storage of pejibaye (*Bactris gasipaes*) Palmae pollen. **Revista de Biologia Tropical**, San Jose, v. 38, n. 1, p. 29-33, 1990.

MONTES-BELMONT, R.; CARVAJAL, M. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. **Journal of Food Protection**, v.61, n.5, p.616-619, 1998.

NATION, G. R; JANICK, J.; SIMON, E. J. Estimation of outcrossing in basil. **HortScience**, v.27, n. 11, p. 1221-1222, 1992.

NUNES, J.C.O. *et al.* Germinação de pólen *in vitro* e receptividade do estigma em macieira cvs. Fuji e Golden Delicious. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.35-39, 2001.

OGAVA, S.E.N. *et al.* Implantação do programa de fitoterapia "Verde Vida" na Secretaria de Saúde de Maringá (2000-2003). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 13 (Supl.1): 58-62, 2003.

OLIVEIRA, J. E. Z.; AMARAL, C. L. F.; CASALI, V. W. D. Recursos Genéticos e Perspectivas do Melhoramento Genético de Plantas Medicinais. In:_____.; QUEIROZ, M.A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Org.). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas Para o Nordeste Brasileiro**. 11. ed. Brasília, DF: Embrapa - Sede, 1999.

_____. Recursos genéticos e perspectivas de melhoramento de plantas medicinais. In:_____. QUEIRÓZ, M. A. de; OLIVEIRA, J.E.Z. **Plantas Medicinais e Aromáticas: avanços no melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 2001.

OLIVEIRA JÚNIOR, A.F. **Ação do iprodione e cálcio sobre alguns aspectos fisiológicos da germinação de grãos de pólen do pessegueiro diamante (*Prunus persicae* L. Bastch).** 1999. 58p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, M. S. P.; MAUÉS, M. M.; KALUME, M. A. de A. Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de Açaizeiro. **Acta Botânica Brasílica**, v.15, n.1. p. 27-33. 2001.

ÖZCAN, M.; CHALCHAT, J.C. Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey. **Czechoslovakian Journal of Food Science**, v. 20, n.6, p.223-228, 2002.

PATERNIANI, E. Evolução dos sistemas dos vegetais. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.26, n.5, p. 476-481, 1974.

PEREIRA FILHO, J. Cresce o espaço das plantas na medicina. **Gazeta Mercantil**, São Paulo, p. 8-9, 11 a 17 abr. 2001.

PEZZUTO, J.M. Plant derived anticancer agents. **Biochemical Pharmacology**, v.53, n.2, p.121-133, 1997.

PFAHLER, P.L. *In vitro* germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen: calcium e boron effects. **Canadian Journal of Botany**, Toronto, v. 45, p. 839-845, 1967.

PICKERT, M. In vitro germination and storage of trinucleate *Arabidopsis thaliana* (L.) pollen grains. **Arabidopsis Information Service**, v.3, p. 39-42, 1988.

PIO, L.A.S.; RAMOS, J.D.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, F.C.; RUFINI, J.C.M. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 147-153, jan./fev. 2007.

POPINIGS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: Agriplan, 1985. 285 p.

PRIMACK, R. B. Longevity of individual flowers. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 16, p.15-37, 1985.

RAMAMOORTHY, T.P.; ELLIOTT, M. Mexican Labiatae: diversity, distribution, evolution and endemism. In: T.P. RAMAMOORTHY, R.; BYE,

A.; LOT y J. Fa (Eds.). **Biological diversity in Mexico: origins and distributions**. New York: Oxford University Press, 1993. p. 513-539.

RAMOS, J. D. *et al.* Produção de mudas de plantas frutíferas por semente. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 216, p. 64-72, 2002.

_____. Receptividade do estigma e ajuste de protocolo para germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **INCI**, v.33, n.1, p.51-55. Caracas ene. 2008.

RATHCKE, B.; LACEY, E.P. Phenological patterns of terrestrial plants. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.16, p.179-214, 1985.

RIGAMOTO, R. R.; TYAGI, A. P. Pollen Fertility Status in Coastal Plant Species of Rotuma Island. **South Pacific Journal of Natural Science**, v. 20, p. 30-33, 2002.

ROCHA, R.P. **Avaliação do processo de secagem e produção de óleo essencial do guaco**. 2002. Dissertação (Mestrado) - UFV-MG.

SAEG. **Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1**: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

SALLES, L.A. *et al.* Sacarose e pH na germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n.1, p.170-174, 2006.

SCALON, S.P.Q.; ALVARENGA, A.A.; DAVIDE, A.C. Influência do substrato, temperatura, umidade e armazenamento sobre a germinação de sementes de pau-pereira (*Platygyamus regnelli* Benth). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.15, n.1, p. 143-146, 1993.

SCORZA, R.; *et al.* (Ed.). **Fruit breeding**. New York: John & Sons, 1995. p.325-440.

SILVA, F. *et al.* Basil conservation affected by cropping season, harvest time and storage period. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n.4, p.323-328, 2005.

SILVA, R.P.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V. Influência de diversos substratos no desenvolvimento de muda de maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. v.23, n.2, p.377-381, 2001.

SIMÕES, C.M.O.; *et al.* **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2003.

SIQUEIRA, K.M.M. *et al.* Estudo comparativo da polinização de *Mangifera indica* L. em cultivo convencional e orgânico na região do Vale do Submédio do São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 303-310, 2008.

SOUSA, S.A. **Cultura da Pinheira: caracterização de frutos, germinação e atributos de qualidade requeridos pelo sistema de comercialização**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia. Cruz das Almas, 2005.

SOUSA, V.A.; PINTO JÚNIOR, J.E. Efeito de solventes orgânicos na viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp. Embrapa Florestas. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 24/25, p. 9-17, jan./dez. 1992.

SOUZA M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro - amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa degener*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v. 26, n.6, p.1209-1217, nov./dez. 2002.

SOUZA, V.C. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

STANDLEY, P.; WILLIAMS, L. **Labiatae**. Flora of Guatemala. Fieldiana Botany, v.24, n.9, p.237-317, 1973.

TECHIO, V. H.; *et al.* Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos (capim elefante x milheto). **Acta Scientiarum** (UEM), Maringá, v. 28, p. 7-12, 2006.

TEIXEIRA, J.P.F.; *et al.* Essential oil contents in two cultivars of basil cultivated on NFT-hydroponics. IN: Proceedings of the First Latin-American Symposium on the Production of Medicinal, Aromatic and Condiments Plants, **Acta Horticulturae**, v.569, p.203-208, 2002.

TOLEDO, A.C.O. *et al.* Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, jan./dez. 2003.

UMERIE, S.C.; ANASO, H.U.; ANYASORO, L.J.C. Insecticidal potentials of *Ocimum basilicum* leaf extracts. **Bioresource Technology**, v.64, n.3, p.237-239, 1998.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. **SAEG 9.1: Sistema de Análises Estatística**. Viçosa, MG: Fundação Arthur Bernardes, 2007. (CD-ROM).

VARGAS, D.P. **Mamona (*Ricinus communis* L.): cultura de antera, viabilidade e conservação de pólen**. Dissertação (Mestrado Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, Rs, 2006.

VENÂNCIO, A.M. **Toxicidade aguda e atividade antinociceptiva do óleo essencial do *Ocimum basilicum* L. (manjeriçã), em *Mus musculus* (camundongos)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2006.

VERLET, N. The world herbs and essential oils economy-analysis of the medium term development. **Acta Horticulturae**, v.306, p. 474-481, 1992.

VIANA A.L.; HEIMANN, L.S.; DE LIMA, L.D.; DE OLIVEIRA, R.G.; RODRIGUES, S.H. Significant changes in the health system decentralization process in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 18, (Supl.), p. 139-151, 2002.

VIANNA, A.L.D.; DAL POZ, M.R. A reforma do sistema de saúde no Brasil e o Programa Saúde da Família. **Revista de Saúde Coletiva** v.8, p. 11-48, 1998.

VIDAL, W.N.; VIDAL, M.R.R. **Botânica: organografia; quadros sinóticos ilustrados de Fanerógamos**. 4. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 124 p.

VIEIRA, R.F.; SIMON, J.E. Chemical characterisation of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in markets and used in traditional medicine in Brazil. **Economical Botany**, v.54, p.207-216, 2000.

WANNISSORN, B.; JARIKASEM, S.; SIRIWANGCHAI, T.; THUBTHIMTHED, S. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. **Fitoterapia**, v.76, p.233-236, 2005.